



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad Nacional de La Plata  
Ingeniería Agronómica

*Trabajo final de Carrera:*

***“Endófitos antagonistas de patógenos del tomate  
[Solanum lycopersicum L.]”***

**Álvaro González Diez**

Directora: Dra. Silvina M. Y. López

Co-Directora: Dra. Graciela N. Pastorino

2018

## **Resumen**

El incremento en la población mundial ha aumentado la demanda de alimentos, lo que obligó a maximizar la eficiencia en su producción a lo largo de los años. Uno de los factores fundamentales para lograr este aumento productivo en los cultivos fue atenuar las pérdidas causadas por factores bióticos como son las enfermedades fúngicas, reconocidas como el principal grupo de patógenos que los afectan. La investigación sobre tecnologías amigables para el ambiente, como alternativa al manejo con fertilizantes y pesticidas basados en moléculas, ha recibido gran atención en los últimos años y se ha demostrado que los microorganismos son eficientes biocontroladores y/o promotores del crecimiento vegetal, no dañan el ambiente, y contribuyen además, a la seguridad alimentaria y a la salud humana. Estas nuevas tecnologías consisten en utilizar bio-insumos formulados con organismos aislados de la naturaleza en cultivos extensivos e intensivos. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias endófitas de semillas de tomate de dos cultivares comerciales (Elpida y Silverio) con capacidades metabólicas que contribuyan al biocontrol de *Stemphylium lycopersici*, *Corynespora cassiicola* y *Alternaria alternata*. Además se evaluaron los posibles mecanismos involucrados en el biocontrol de estos hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate. Estas evaluaciones incluyeron: la competencia por nutrientes (producción de sideróforos), producción de compuestos antimicrobianos y el efecto de compuestos volátiles sobre el crecimiento del hongo. Las bacterias endófitas presentes en las semillas de tomate, se identificaron a partir de la amplificación y secuenciado del gen *16S rDNA*. En este trabajo encontramos que 6 de los 21 aislados, identificados como *Micrococcus* sp. (E4), *Bacillus* sp. (E7, E9, S15 y SE37) y *Paenibacillus* sp. (E8) inhibieron significativamente el crecimiento micelial en condiciones controladas; con diferentes capacidades para sintetizar algunas moléculas inhibitorias.

## **INDICE**

INTRODUCCIÓN.....	3
Cultivo de tomate .....	3
Problemática asociada al cultivo .....	4
Microorganismos benéficos. Bacterias endófitas.....	6
Uso de las bacterias endófitas como agentes de control biológico.....	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO: .....	9
OBJETIVOS GENERALES: .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS: .....	10
Aislamiento de bacterias endófitas:.....	10
Identificación taxonómica de los endófitos de las semillas de tomate.....	11
Evaluación del potencial para biocontrolar patógenos.....	13
Competencia por nutrientes. Producción de sideróforos .....	14
Producción de compuestos antimicrobianos .....	15
RESULTADOS .....	17
Aislamiento e identificación taxonómica de los endófitos: .....	17
Evaluación del potencial para biocontrolar patógenos.....	19
Producción de sideróforos.....	22
Producción de compuestos antimicrobianos .....	23
Producción y efecto de compuestos volátiles .....	25
DISCUSIÓN.....	28
Conclusiones y perspectivas.....	31
Bibliografía.....	32

## INTRODUCCIÓN

### Cultivo de tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* [L.], pertenece a la familia de las Solanaceae y es una especie originaria de Sudamérica, específicamente de Bolivia, Chile, Ecuador, Colombia y Perú. La producción mundial de tomate fresco aumentó aproximadamente el 40 % en los últimos 10 años y la de tomate industria se mantuvo más o menos estable en 5.538.000 toneladas. El 90 % de la producción mundial se concentra en diez países, siendo el líder Estados Unidos, seguido por China, Italia, y Turquía. La Argentina ocupa el puesto número 13 y participa con el 1 % de la producción mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO, 2016).

La superficie cultivada con hortalizas en la Argentina, es de 226.622 ha a campo y 2.961 ha bajo cobertura o invernáculo. En la Argentina el tomate es el segundo cultivo hortícola después de la papa, con una producción cercana a las 750.000 Tn anuales. La producción se encuentra distribuida a lo largo de todo el país, excepto en el sur de la Patagonia. Las provincias de Mendoza, San Juan, Catamarca, Santiago del Estero y Río Negro se dedican principalmente a la producción de tomate para uso industrial (tomate perita) y el tomate redondo para consumo fresco se produce en Buenos Aires, Salta, Jujuy, Tucumán, Corrientes, Santa Fe y otras provincias (Nakama y Lozano, 2006). El Cinturón Hortícola Platense forma parte del CHGBA (Cinturón Hortícola Gran Buenos Aires), abarca unas 2.600 ha, con unas 738 EHF (Explotaciones Hortiflorícolas) que producen en total 77.000 tn/año (CHFBA, 2005), lo que constituye el 62 % de la producción de la Provincia de Buenos Aires. En la actualidad el 83 % de la superficie cultivada con tomate corresponde al cultivo bajo cubierta, lo que resultó en la aparición de nuevos problemas fitosanitarios. Este tipo de cultivo está caracterizado por la permanente innovación tecnológica y el alto nivel de inversión, es decir que ese trata de un sector productivo importante de la provincia de Buenos Aires en el que la inversión está en constante aumento.

## **Problemática asociada al cultivo**

Los patógenos enferman las plantas cuya producción es afectada en cantidad y calidad, lo que se traduce en pérdidas económicas (Romero, *et al.*, 2016). En el manejo convencional, los patógenos se controlan con moléculas de síntesis (agroquímicos) por lo que quedan residuos en las hortalizas y también en el ambiente. Es importante mencionar que por el momento esta última es la herramienta más utilizada. La investigación sobre tecnologías amigables para el ambiente, como alternativa al manejo con fertilizantes y pesticidas basados en moléculas, ha recibido gran atención en los últimos años y se ha demostrado que los microorganismos son eficientes biocontroladores y/o promotores del crecimiento vegetal, amigables para el ambiente, y contribuyen además a la seguridad alimentaria y la salud humana. Estas nuevas tecnologías consisten en utilizar bio-insumos formulados con organismos aislados de la naturaleza en cultivos extensivos e intensivos.

En un escenario de agricultura sustentable, es importante utilizar como recurso biotecnológico a las bacterias que interactúan con la planta, sean estas rizosféricas o endófitas (microbioma del tomate). El microbioma contiene bacterias que promueven el crecimiento vegetal por diversos mecanismos, que son antagonistas de los patógenos de las plantas y/o que activan en las plantas mecanismos que reducen el estrés ocasionado por factores bióticos o abióticos (Xu, *et al.*, 2014). Uno de los aspectos claves del uso de estos microorganismos como inoculantes es la colonización de los nuevos ambientes en los que se los busca implantar, que está relacionada con la habilidad de las bacterias introducidas con los inoculantes para interactuar con los organismos nativos (Xu, *et al.*, 2014; Santoyo, *et al.*, 2016), a lo que solemos llamar competitividad. Es decir que la eficiencia de un producto biológico está ligada a las condiciones ambientales en las que se aplica, al genoma del hospedante y a los organismos con los que este interactúa. En este sentido, el endobioma (bacterias endófitas) está bajo el efecto homeostático que genera la planta, es decir no está expuesto a estreses debido a cambios ambientales, sin embargo en ese espacio establece interacciones con otros microorganismos que colonizan el mismo ambiente (Santoyo, *et al.*, 2016). El desarrollo de bioinoculantes en base a bacterias endófitas aisladas del endobioma es un campo que demanda estudios de investigación básica orientados a conocer e identificar los

microorganismos, las capacidades de cada uno de ellos y cuáles de estas capacidades se expresan dentro de la planta cuando forman parte del endobioma e interactúan con la planta y el resto de los microorganismos. Es decir que es necesario conocer la biología y el funcionamiento de estos microorganismos que interactúan con los cultivares comerciales de tomate en distintas condiciones ambientales y edáficas. El estudio de las comunidades bacterianas asociadas con las plantas en los sistemas agrícolas es indispensable para hacer un uso adecuado de las bacterias benéficas con el fin de promover la sanidad vegetal e incrementar las producciones. En la actualidad los productores agrícolas en Argentina utilizan inoculantes bacterianos, tanto promotores del crecimiento vegetal como biocontroladores de patógenos, principalmente formulados con representantes de cuatro géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* (Santoyo, *et al.*, 2016; Beneduzi, *et al.*, 2012). Los inoculantes comerciales están formulados en base a unas pocas cepas conocidas. Sin embargo se ha demostrado que las distintas prácticas de labranza, los competidores nativos, los genotipos de los cultivos y las distintas condiciones climáticas y ambientales condicionan la efectividad de los bio-tratamientos (Galli-Terasawa, *et al.*, 2003; de Salomone y Döbereiner, 1996). Son varios los autores que señalan que se debe profundizar la selección de cepas locales y el desarrollo de formulaciones que se adapten a diferentes cultivos, diferentes zonas climáticas y tipos de suelo (Rashid, *et al.*, 2012; Galli-Terasawa, *et al.*, 2003). Por eso es importante no solo seleccionar cepas según su mecanismo de acción, sino que es deseable la selección de comunidades microbianas o complejos microbianos por el ambiente lo que facilita la colonización del ambiente. Entonces, una estrategia posible es la formulación de inoculantes con microorganismos aislados de los ambientes en donde se realizarán los cultivos, ya que de otro modo las bacterias nativas podrían tener ventajas adaptativas sobre las cepas exóticas (Galli-Terasawa, *et al.*, 2003; Ferreira, *et al.*, 2000). En relación a esto, cada cultivar puede contener un microbioma propio y distinto del de otros cultivares. El desarrollo de bio-insumos, entonces, deberá considerar no solo la aplicación sino también el establecimiento y mantenimiento de las bacterias en la planta, en presencia de la competencia ejercida por las poblaciones microbianas nativas.

### **Microorganismos benéficos. Bacterias endófitas**

Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas son conocidas como PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) y son utilizadas en la formulación de productos que se adicionan a los cultivos con el fin de obtener mayor productividad (Sarabia, *et al.*, 2010; Johansson, *et al.*, 2004; González-Chávez, 2005).

Las PGPB establecen relaciones con los cultivos que difieren en el nivel de interacción con las plantas, y pueden ser asociativas y/o simbióticas. Por otro lado, en la última década ha surgido un interés creciente hacia los microorganismos endófitos, los cuales al estar menos afectados por el estrés ambiental y más aclimatados con su hospedero podrían presentar una mayor ventaja ecológica (Sturz y Nowak, 2000). "Endófito" es un término topográfico global que incluye a todos los organismos que cumplen una parte o todo su ciclo de vida en el interior de los tejidos, donde viven y se nutren de sus hospedantes sin producir síntomas de enfermedad (Yanni, *et al.*, 2011). Se piensa que las bacterias endófitas al estar en una asociación íntima con las plantas podrían tener efectos beneficiosos de mayor trascendencia en comparación con las bacterias que viven en la zona influenciada por la raíz (rizosféricas), debido a que tienen menor competencia que éstas para tomar sus nutrientes (Holguin y Patten, 1999).

Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron desde las semillas, de la rizósfera, de la microflora, del filoplano o del material utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-Huker y Hurek, 1998). La penetración en la planta puede ocurrir por estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, y también por acción directa de las bacterias que pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (McCully, 2001).

Prácticamente todas las plantas están colonizadas por una diversidad de bacterias conocidas como endófitas, que pueden ser detectadas en un momento particular dentro de los tejidos de plantas aparentemente sanas (Schulz, 2006). La mayoría de las endófitas colonizan diferentes compartimentos de la planta como el apoplasto, incluyendo los espacios intercelulares de las paredes de las células y vasos del xilema. Algunas de ellas son capaces de colonizar los

órganos reproductores de las plantas, flores, frutos y semillas. Los estudios han demostrado que, alrededor de 300.000 especies de plantas están asociada con una o varias poblaciones de especies de bacterias (Ryan, *et al.*, 2008).

En los últimos años, han despertado un mayor interés los aspectos relacionados con la composición, estructura y función de comunidades bacterianas y en particular las unidades fundamentales de las cuales están compuestas (Ward, 2006). Existe una relación compleja entre las bacterias endófitas y las plantas hospederas, se cree que estas estimulan el crecimiento de las plantas a través de la movilización de nutrientes del suelo, produciendo numerosos reguladores del crecimiento vegetal; brindan protección contra fitopatógenos, controlando su desarrollo o inhibiéndolos; mejoran la estructura del suelo y actúan en los procesos de biorremediación de los suelos contaminados por el secuestro de metales pesados tóxicos y compuestos xenobióticos dentro de los tejidos vegetales (Ahemad, 2012).

### **Uso de las bacterias endófitas como agentes de control biológico**

El creciente aumento de la población humana ha obligado a los países a utilizar estrategias para producir alimento a gran escala para satisfacer las necesidades a nivel mundial. La disminución en los rendimientos de los cultivos debido al aumento de las enfermedades sigue siendo uno de los problemas más graves a resolver (Aliye, *et al.*, 2008), principalmente debido a enfermedades causadas por bacterias y hongos que producen daños considerables en la producción.

Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control para fitopatógenos en diversos cultivos. Se ha comprobado que los mecanismos de control biológico mediado por bacterias endófitas están basados en diferentes mecanismos, los cuales incluyen antibiosis, la competencia por los nutrientes y nichos, y la resistencia sistémica inducida (RSI). Las bacterias del suelo y también muchas bacterias endófitas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios que tienen muchas propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes. Por un lado, los compuestos orgánicos volátiles son moléculas pequeñas (<300 Da) que pertenecen a diferentes clases químicas que pueden evaporarse y difundirse fácilmente a través de los poros



llenos de aire y agua. Estas propiedades fisicoquímicas hacen que los volátiles sean metabolitos candidatos ideales para la cooperación y la competencia entre microorganismos del suelo que no viven directamente adyacentes entre sí. Por otro lado, los metabolitos secundarios solubles tienen una mayor polaridad que los hace solubles en agua. Actúan en distancias más cortas, pero generalmente exhiben actividades biológicas más fuertes como toxinas o antibióticos (Tyc, *et al.*, 2017).

La colonización de las plantas por bacterias endófitas como agentes de control biológico, promueve diferentes modificaciones en la pared celular, como la deposición de calosa, pectina, celulosa y compuestos fenólicos que inducen la formación de una barrera estructural en el potencial sitio de ataque del fitopatógeno (Benhamou, 2000).

Otro de los mecanismos comunes de respuesta de las plantas colonizadas con endófitas frente a los fitopatógenos es la inducción de proteínas relacionadas con la defensa como peroxidasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3 gluconasa (Fishal, *et al.*, 2010).

Lo más probable es que exista una combinación de varios mecanismos de biocontrol exhibido por muchas bacterias endófitas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que algunos compuestos antimicrobianos están involucrados tanto en la antibiosis como en la activación de RSI (Ongena, *et al.*, 2007).

La eficacia de los endófitos como agentes de control biológico depende de muchos factores tales como: la especificidad del huésped, la dinámica poblacional, el patrón de colonización, la capacidad de moverse dentro de los tejidos del huésped y la capacidad de inducir resistencia sistémica (Barka, *et al.*, 2002).

### **HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

*“Entre las bacterias endófitas de las semillas se encuentran algunas con actividad biocontroladora, que además difieren en los mecanismos antagonistas contra hongos fitopatógenos.”*

### **OBJETIVOS GENERALES:**

El crecimiento de las plantas resulta de la interacción de las mismas con microorganismos saprófitos, simbióticos y endófitos. Por ello el objetivo general de este plan es identificar organismos endófitos con capacidades metabólicas que contribuyan a la sanidad de las plantas de manera que los mismos sean insumos para la formulación de productos biológicos para los cultivos.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Aislar bacterias endófitas de semillas de tomate.
- 2- Evaluar la capacidad de las bacterias endófitas para el biocontrol de patógenos como *Stemphylium lycopersici*, *Corynespora cassiicola* y *Alternaria alternata*.
- 3- Evaluar posibles mecanismos de biocontrol.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### Aislamiento de bacterias endófitas:

Se emplearon semillas de tomate de las variedades Elpida F1 (Enza Zaden) y Silverio (Syngenta-Rogers). Se desinfectaron superficialmente con etanol (50 %) e hipoclorito de sodio (20 %) y luego se enjuagaron con agua estéril. Para confirmar el protocolo de desinfección superficial, alícuotas de agua estéril usada en el lavado final se sembraron en TSA (Agar tríptico de soja) a 28 °C durante 15 días y las placas fueron examinadas para detectar la presencia de colonias microbianas (Ahmad *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2001).

Las muestras de semillas se maceraron en mortero estéril con 6 ml de solución acuosa (0,9 % NaCl). El extracto se incubó durante 3 horas a 28 °C, para contribuir a la liberación completa de microorganismos endófitos desde el material vegetal. El extracto obtenido se diluyó en una suspensión acuosa (0,9 % de NaCl) y se sembró en placas de Petri que contenían medio TSA, King B y agar nutritivo (pluripeptona 5,0 g, extracto de carne 3,0 g, agar 18 g, 1000 ml agua destilada, pH: 6,9). Las placas se incubaron durante un máximo de 7 días a 28 °C. Las colonias se seleccionaron a los 2 y 5 días de incubación y se purificaron en los medios de cultivo correspondientes. Los cultivos puros se almacenaron en picos de flauta a 4 °C.



**Figura1:** Plántula de tomate crecida en Tubo de Crone a partir de las cuales se aislaron endófitos posteriormente a la maduración de la semilla esterilizada superficialmente.

Parte de las semillas esterilizadas fueron sembradas en condiciones asépticas en tubos con medio de cultivo agar nutritivo semisólido (Figura 1). Se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura hasta el desarrollo de las primeras hojas. En ese momento, las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo, y se procesaron de manera similar a las semillas para el aislamiento de endófitos.

## **Identificación taxonómica de los endófitos de las semillas de tomate**

### Extracción, purificación y cuantificación del ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Wizard®, Promega Co. WN USA. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de los proveedores de dicho kit. Las bacterias se cultivaron en 5 ml de caldo nutritivo a 28 °C por 4 días. Las células se cosecharon por centrifugación a 11.000 g durante 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 600 µl de solución de lisis nuclear, se mezcló en vórtex durante 1-3 segundos y se incubó 5 minutos a 80 °C. Luego, se adicionaron 3 µl de RNasa (10 µg/µl) a temperatura ambiente y se incubó la mezcla a 37 °C durante 30-60 minutos. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 200 µl de Solución de Precipitación de proteínas y se mezcló 20 segundos en vórtex. Luego de centrifugar 3 minutos a 13.000-16.000 g se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. El ADN se precipitó adicionando 1 volumen de isopropanol que se mezcló por inversión y luego se centrifugó a 13.000 -16.000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 600 µl de etanol 70 %.

El ADN se disolvió en un volumen de 50 µl de Solución de Rehidratación incubando las muestras a 65 °C durante 1 hora.

### Visualización y cuantificación del ADN extraído

El ADN se cuantificó mediante la comparación de la intensidad de la banda del ADN genómico con las bandas del marcador molecular (Genoma del fago Lambda digerido con *Hind* III - Promega Biotech), que se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 0.7 % (P/V) suplementado con bromuro de etidio, observándose las bandas en un transiluminador de UV

(Sambrook *et al.*, 1989). Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS (Syngene, A Division of Synoptics Ltd).

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) es una tecnología que consiste en la síntesis de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico) cuyo tamaño está definido por un par de primers que flanquean la secuencia “blanco” en el ADN utilizado como molde para la reacción. El proceso se denomina amplificación porque consiste en aumentar exponencialmente la cantidad del fragmento amplificado, puesto que la enzima, que es termoestable, puede generar en presencia de un exceso de nucleótidos una cantidad creciente de copias. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil que permite detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico posibilitando su identificación.

#### Amplificación del gen 16S rDNA

La secuencia de los genes ribosomales codifican para la síntesis de ARN ribosomal que constituye junto con algunas proteínas las subunidades de los ribosomas. En las bacterias el gen 16S rDNA, posee alrededor de 1,5 kilopares de bases (kpb). Esta secuencia está altamente conservada y organismos no relacionados pueden tener homologías del 97 % en este gen. Por este motivo se la utiliza frecuentemente para establecer homologías con secuencias de las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology International - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La amplificación se llevó a cabo utilizando los cebadores universales 27F (5' - 'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') (Lane, 1991) y 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT -3') (Weisburg, *et al.* 1991). Los cebadores mencionados fueron diseñados para amplificar un fragmento de aproximadamente 1.450 pb a partir del extremo 5' del gen. La reacción se realizó en base a un programa que consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, 45 segundos a 59 °C y 1 minuto a 72 °C, y por último, una elongación final de 5 minutos a 72 °C.

La mezcla de reacción contuvo buffer de reacción 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 a 25 °C; 1 % Tritón X-100) (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 1,5 mM cloruro de

magnesio (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 0,2 mM de cada dNTP (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN), 0,3  $\mu$ M de cada cebador, 1 unidad de T- Plus DNA polimerasa (Highway Molecular Biology-INBIO-UNICEN) y 50 ng de ADN molde por reacción, en un volumen final de 15  $\mu$ l.

Para disponer de producto para mandar a secuenciar, se purificaron los fragmentos amplificados de acuerdo al protocolo de precipitación de productos de PCR, agregando un volumen de isopropanol y 1,5  $\mu$ l de acetato de amonio 8 M a la mezcla de reacción conteniendo el producto a secuenciar. Posteriormente se incubó a -20 °C durante 2 horas, para luego centrifugar las muestras a 15.000 g durante 15 minutos. El ADN que quedó adherido a las paredes del tubo se lavó con etanol 70 %, luego se secó y se resuspendió en agua bidestilada estéril. Las dos hebras del fragmento de ADN amplificado por PCR fueron secuenciadas en MacroGen Inc. Seúl, Korea de acuerdo a la reacción descrita por Sanger *et al.* (1977). El secuenciador automático BigDye™ se basa en la detección de la fluorescencia, permitiendo la lectura de hasta 1000 bases en una única reacción.

Las secuencias se analizaron con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales de secuencias nucleotídicas (nucleotide basic local alignment tool, BLAST [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante comparación con secuencias depositadas en la base de datos Nucleotide collection (nr/nt).

### **Evaluación del potencial para biocontrolar patógenos**

Se realizó un ensayo preliminar *in vitro* para determinar la actividad antifúngica de los aislados obtenidos. Se evaluó el efecto antagónico contra tres hongos fitopatógenos de importancia local seleccionados del cepario del CIDEFI: *Alternaria alternata*, *Corynespora cassiicola* y *Stemphylium lycopersici*, los cuales son modelos de estudio del grupo de trabajo.

Cada hongo fue crecido en medio agar-papa-glucosa (APG), luego con un sacabocado se extrajo un disco del medio de cultivo con el cultivo de cada hongo, y fue sembrado en el centro de placas de APG, divididas en octantes. A las 24 hs se sembraron estrías de las bacterias endófitas de manera equidistante. Se incubaron las placas a 25 °C durante 4-5 días.

Se evaluó el desarrollo fúngico comparando con una placa control (sin bacterias). Las cepas que produjeron inhibición del crecimiento fueron nuevamente evaluadas en un ensayo cuantitativo que se describe a continuación.

La actividad antifúngica se cuantificó en un ensayo similar en el que placas con medio APG se dividieron en 3 espacios iguales y en cada uno de ellos se depositó un disco de cada hongo previamente crecido. En las líneas divisorias de estos espacios se sembró una estría bacteriana de cada cepa seleccionada y se incubaron las placas a 25 °C durante 24 h. Los controles consistieron en placas con la misma disposición de los hongos en las que no se sembraron bacterias. Se evaluó el porcentaje de inhibición de cada aislado bacteriano. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (%) = [(crecimiento en el control - crecimiento en el tratamiento) / crecimiento en el control] \* 100.

### Competencia por nutrientes. Producción de sideróforos

La determinación de sideróforos se realizó en medio de cultivo sólido conteniendo Cromo Azurol S (CAS) (Tabla 1). Los cultivos bacterianos se sembraron y se incubaron a 28 °C durante 5 días. La producción de sideróforos se confirmó por la formación de un halo color naranja alrededor de la colonia bacteriana (Alexander y Zuberer, 1991).

**Tabla 1.** Solución CAS (70 ml) \*

Componentes	Volumen (ml)
Pipes (0,3024g/10ml de solución salina, pH 6,8 con KOH)	10
0,028 g de FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O + 30 µl de HCl, en 100 ml de H <sub>2</sub> O	10
CAS (0,061 g en 50 ml)	50

\* Se agregan 10 ml de la solución CAS cada 100 ml de agar Cetrimida comercial (Britania®). La solución y el medio Cetrimida se esterilizan por separado en autoclave. PIPES: ácido 1,4-piperazinediethanesulfónico – C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>)

## Producción de compuestos antimicrobianos

### Actividad antagonista del sobrenadante libre de células de cultivos de bacterias endófitas:

Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo en agitación a 180 rev.min<sup>-1</sup> a 28 °C en la oscuridad durante 48 h. El sobrenadante del cultivo bacteriano libre de células se colectó por centrifugación a 6.000 g durante 15 minutos, y se filtró secuencialmente a través de membranas de filtro orgánico de 0,45 µm y 0,22 µm (© GVS). La actividad antimicrobiana de los filtrados de cada cultivo se evaluó contra los fitopatógenos detallados previamente. El sobrenadante libre de células se añadió al medio de cultivo (agar nutritivo) fundido con una temperatura no superior a 45 °C, a concentraciones finales del 1 %, 10 % y 20 % (v/v). Luego, se sembró en el centro de cada placa un disco de 5 mm de diámetro de placas de APG donde previamente se había cultivado cada hongo patógeno. Las placas se incubaron durante 4 días a 25 °C y se determinó la actividad antifúngica del sobrenadante como el porcentaje de inhibición de los sobrenadantes a partir de la fórmula:

**Porcentaje de inhibición (%) =**

$$\frac{[(\text{Crecimiento}_{\text{control}} - \text{Crecimiento}_{\text{tratamiento}}) / \text{Crecimiento}_{\text{control}}] * 100}{}$$

### Determinación de actividades antagónicas de compuestos volátiles de bacterias endofíticas:

Se realizó un ensayo en placas selladas utilizando el método descrito por Baysal *et al.* (2013), con modificaciones. Se extendieron 300 µl de cultivos de bacterias en una placa estéril con medio TYB. Se colocaron en el centro de placas con medio APG, discos de 5 mm de diámetro de APG cortados desde una placa de cultivo de cada hongo patógeno. Cada placa de APG con el disco fúngico se invirtió inmediatamente y se colocó sobre la placa de TYB con cultivo bacteriano. Así ambas placas superpuestas se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 °C en oscuridad hasta que el micelio fúngico de los controles se extendió a ¾ de la placa. El control correspondió a placas de APG con los discos fúngicos enfrentados a placas con medio TYB sin cultivo bacteriano. Se



midió el diámetro (mm) de la colonia fúngica. El porcentaje de inhibición se determinó como se describe en el punto anterior.

### **Análisis estadístico**

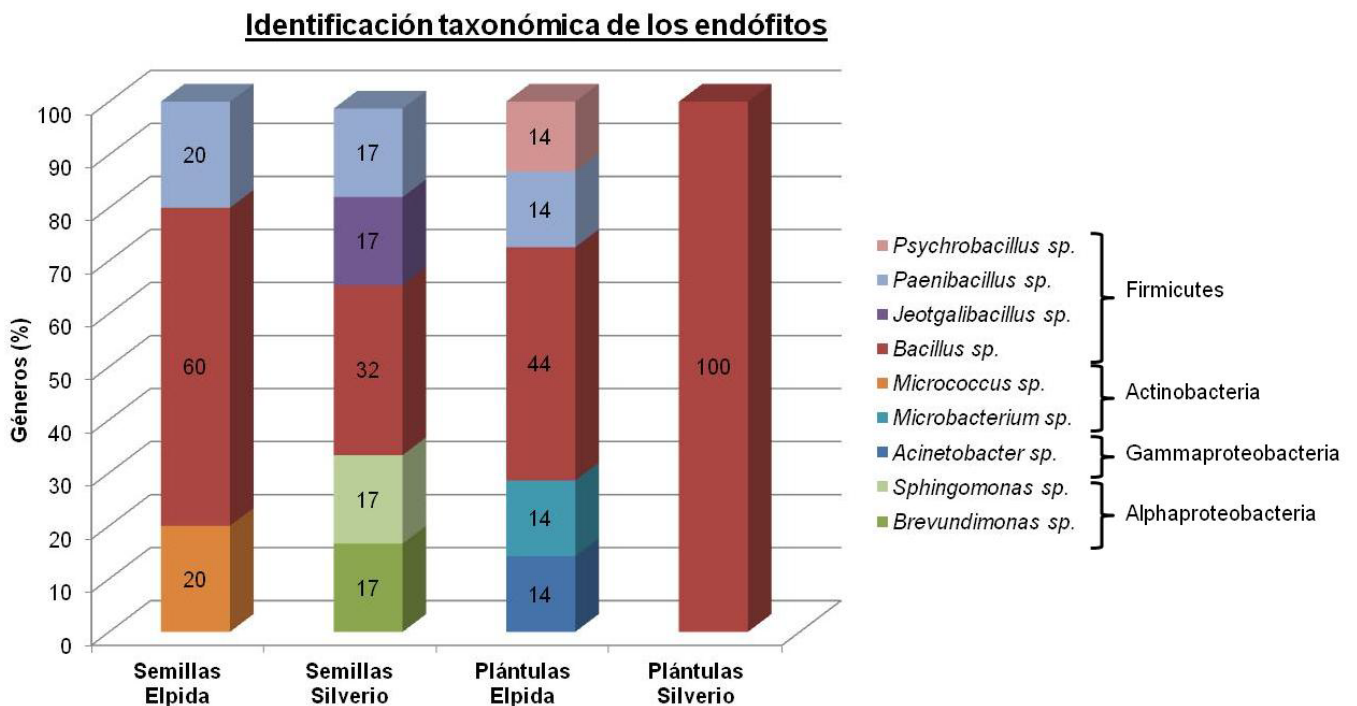
Todas las mediciones fueron analizadas mediante el análisis de varianza ANOVA (análisis de varianza de una vía) con nivel de significancia menor a 0,05 ( $P < 0,05$ ). Se aplicaron test de rangos para identificar grupos homogéneos. El test elegido fue el *test LSD* de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparaciones múltiples.

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación taxonómica de los endófitos:

Se obtuvieron 21 aislados bacterianos. Las secuencias *16S rDNA* de los aislados en estudio fueron analizadas y registradas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), bajo los números de acceso que figuran en la tabla 2. En la dicha tabla se detallan además los géneros identificados en los endófitos aislados de semillas y plántulas, según el alineamiento de secuencias realizado con el software BLAST® (*Basic Local alignment Search Tool*), disponible en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

En la Figura 2 se presentan los endófitos identificados y el porcentaje de representación de cada género proveniente de las semillas de tomate de las variedades Elpida y Silverio respectivamente.



**Figura 2:** Endófitos encontrados en semillas y plántulas de ambos cultivares y el porcentaje de aparición de cada género.

De semillas Elpida se aislaron principalmente Firmicutes (80 %) y Actinobacteria (20 %). De semillas Silverio se aislaron nuevamente un número mayoritario de Firmicutes (67 %) y dos géneros distintos (*Sphingomonas* y *Brevundimonas*) de Alpha-Proteobacterias (33 %). De plántulas obtenidas del cultivar Elpida se aislaron Firmicutes, Actinobacteria y Gamma-Proteobacteria; mientras que de plántulas del cultivar Silverio solo se recuperaron Firmicutes (100 %).

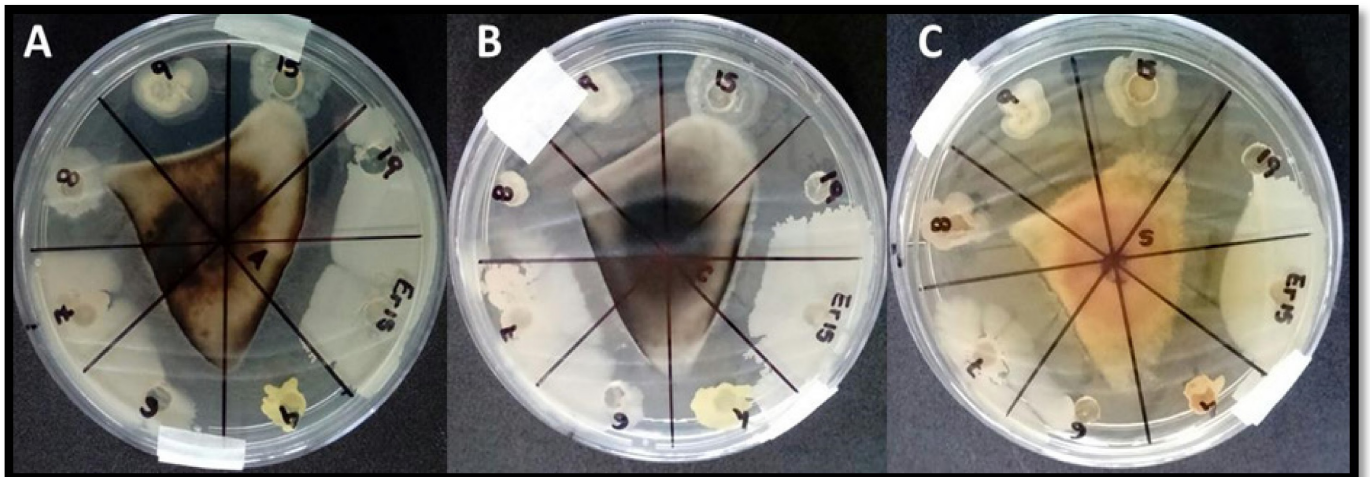
Los géneros de Actinobacteria encontrados fueron *Micrococcus* y *Microbacterium* y de Gamma-Proteobacteria se aisló un integrante del género *Acinetobacter* (Tabla 2). Dentro de los Firmicutes aislados de semillas y plántulas de ambos cultivares se encontraron representantes de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus* y *Jeotgalibacillus* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Identificación de las bacterias aisladas, obtenidas de las semillas de tomate por medio del análisis de la secuencia *16S rDNA*.

Aislado (origen)	NCBI (Numero de acceso)	Identidad (%)
E4 (Semilla Elpida)	<i>Micrococcus</i> sp. (MG963203)	99
E6 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963204)	92
E7 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963205)	99
E8 (Semilla Elpida)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (MG963206)	99
E9 (Semilla Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963207)	98
S15 (Semilla Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963209)	99
S19 (Semilla Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963210)	99
S20 (Semilla Silverio)	<i>Sphingomonas</i> sp. (MG963211)	96
S21 (Semilla Silverio)	<i>Brevundimonas</i> sp. (MG963212)	99
S26 (Semilla Silverio)	<i>Paenibacillus</i> sp. (MG963213)	91
S27 (Semilla Silverio)	<i>Jeotgalibacillus</i> sp. (MG963214)	99
SE28 (Plantin de Elpida)	<i>Acinetobacter</i> sp. (MG963215)	98
SE31 (Plantin de Elpida)	<i>Microbacterium</i> sp. (MG963216)	99
SE33 (Plantin de Elpida)	<i>Paenibacillus</i> sp. (MG963217)	99
SE34 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963218)	99
SE35 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963219)	99
SE36 (Plantin de Elpida)	<i>Psychrobacillus</i> sp. (MG963220)	97
SE37 (Plantin de Elpida)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963221)	98
SS38 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963222)	99
SS39 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963223)	99
SS41 (Plantin de Silverio)	<i>Bacillus</i> sp. (MG963224)	96

### Evaluación del potencial para biocontrolar patógenos

En este ensayo se realizó un *screening*, que permitió seleccionar 11 aislados (E4, E6, E7, E8, E9, S15, S19, SE31, SE33, SE36 y SE37) que inhibieron el crecimiento fúngico (figura 3).



**Figura 3:** Ensayo de antagonismo. Efecto antagónico de 7 aislados de semillas (E4, E6, E7, E8, E9, S15, S19 y Er/S como control), contra tres hongos fitopatógenos de tomate: A) *A. alternata*, B) *C. cassicola*, C) *S. lycopersici*.

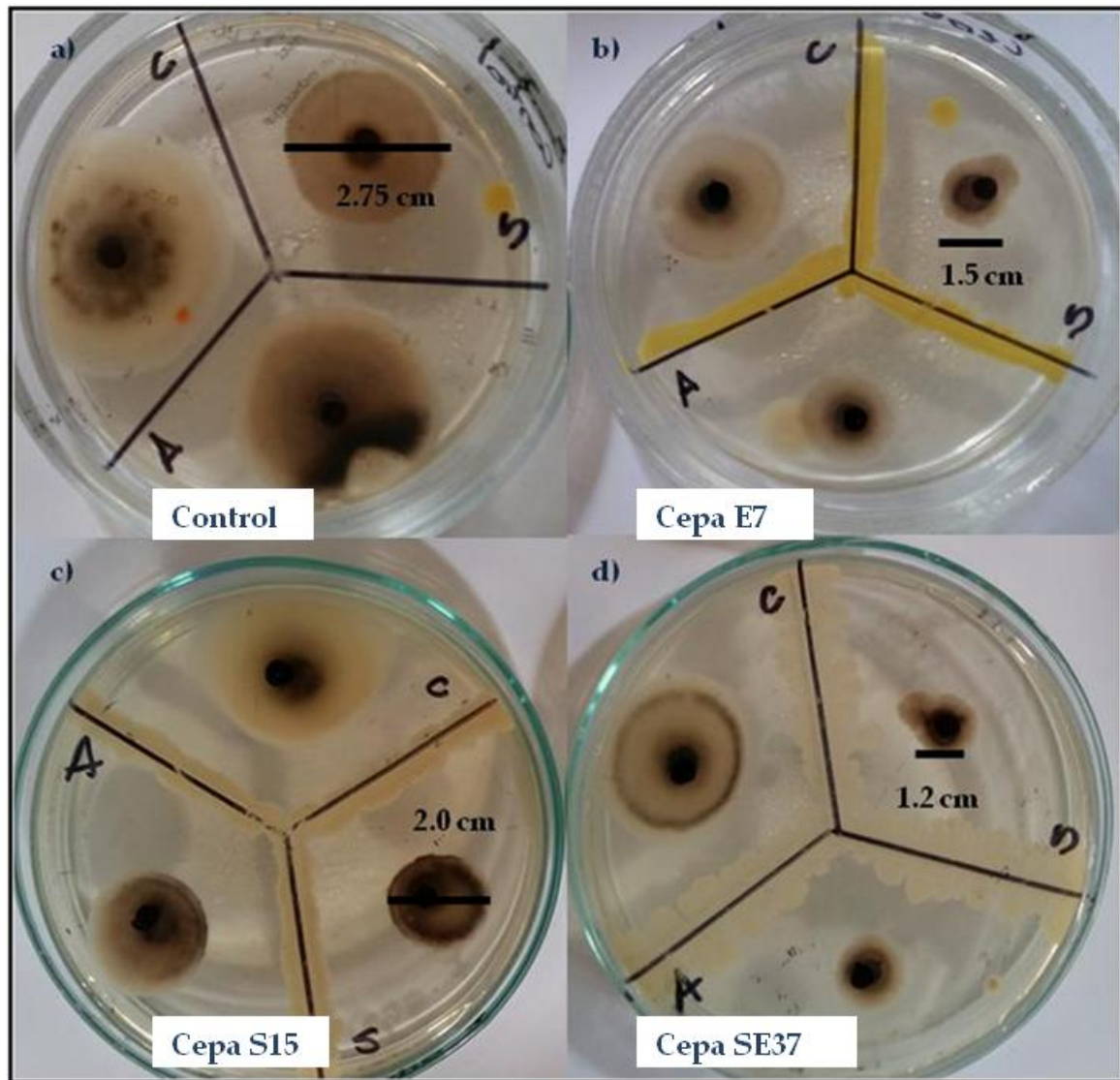
Luego se realizó un ensayo cuantitativo con los aislados seleccionados en los que se determinó el diámetro de las colonias fúngicas enfrentadas a cada bacteria (por triplicado), comparado con el crecimiento del hongo en el medio sin inocular bacterias (Figura 4 y Tabla 3).

**Tabla 3.** Evaluación cuantitativa del efecto antifúngico de las bacterias endófitas contra los hongos *A. alternata*; *C. cassicola* y *S. lycopersici*.

Cepa	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Corynespora cassicola</i>	<i>Stemphylium lycopersici</i>
SE37	1,65 ± 0,289 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,4 ± 0,231 <sup>a</sup>
E4	2,05 ± 0,289 <sup>ab*</sup>	2,55 ± 0,289 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,231 <sup>a</sup>
E8	2 ± 0,115 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,115 <sup>ab</sup>	1,55 ± 0,06 <sup>ab</sup>
E7	2,35 ± 0,173 <sup>bc</sup>	2,85 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,06 <sup>bc</sup>
Er/S	2,45 ± 0,404 <sup>bc</sup>	3 ± 0,08 <sup>bc</sup>	1,9 ± 0,115 <sup>bc</sup>
S15	2,55 ± 0,173 <sup>bc</sup>	3,25 ± 0,289 <sup>c</sup>	2 ± 0,115 <sup>cd</sup>
E9	2,75 ± 0,289 <sup>cd</sup>	2,7 ± 0,115 <sup>ab</sup>	2,25 ± 0,06 <sup>cde</sup>
E6	2,9 ± 0,115 <sup>cde</sup>	3,6 ± 0,115 <sup>d</sup>	2,35 ± 0,404 <sup>def</sup>
S19	2,9 ± 0,08 <sup>cde</sup>	3,7 ± 0,115 <sup>d</sup>	2,6 ± 0,115 <sup>efg</sup>
SE31	3,15 ± 0,289 <sup>def</sup>	3,7 ± 0,115 <sup>d</sup>	2,6 ± 0,115 <sup>efg</sup>
Control	3,6 ± 0,08 <sup>f</sup>	4,05 ± 0,06 <sup>e</sup>	2,75 ± 0,06 <sup>fg</sup>
SE33	3,35 ± 0,06 <sup>ef</sup>	4,05 ± 0,06 <sup>e</sup>	2,9 ± 0,115 <sup>g</sup>
SE36	3,25 ± 0,289 <sup>def</sup>	4,3 ± 0,08 <sup>e</sup>	2,95 ± 0,06 <sup>g</sup>

\*Aquellas medias que comparten entre sí una letra no presentan entre sí diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según el test de Tukey

En la tabla 3 se muestran las diferencia del crecimiento de los 3 hongos (*Alternaria alternata*, *Corynespora cassicola* y *Stemphylium lycopersici*). Los aislados E4, E7, E8, E9, S15 y SE37 inhibieron el crecimiento de los tres hongos, lo que fue evidenciado por un diámetro de colonia menor que el que se midió en las placas controles sin presencia bacteriana. A partir de estos resultados los aislados que inhibieron el crecimiento de los 3 hongos se seleccionaron para posteriores ensayos en los que se determinarán posibles mecanismos de antagonismo.



**Figura 4:** Ensayo de antagonismo. Efecto antagónico de 7 aislados de semillas (E4, E6, E7, E8, E9, S15, S19 y Er/S como control), contra tres hongos fitopatógenos de tomate: A) *A. alternata*, B) *C. cassicola*, C) *S. lycopersici*.

## Mecanismos

### Producción de sideróforos

Solo los aislados E7 y SE28 produjeron sideróforos, evidenciado por un halo naranja (Figura 5). En este ensayo se utilizó como control positivo una cepa de *Bacillus subtilis* del cepario del CIDEFI, Er/S. Esta cepa ha sido confirmada además, como biocontroladora de hongos fitopatógenos en ensayos previos y por este motivo se utilizó como control en todos los ensayos de este trabajo.



**Figura 5:** Producción de sideróforos. Placa con medio CAS donde se observa el halo anaranjado de producción de sideróforos de los aislados E7 y SE28. La cepa identificada como control corresponde a Er/S *Bacillus subtilis* del cepario del CIDEFI.

## Producción de compuestos antimicrobianos

### Efecto inhibitorio del sobrenadante libre de células bacterianas

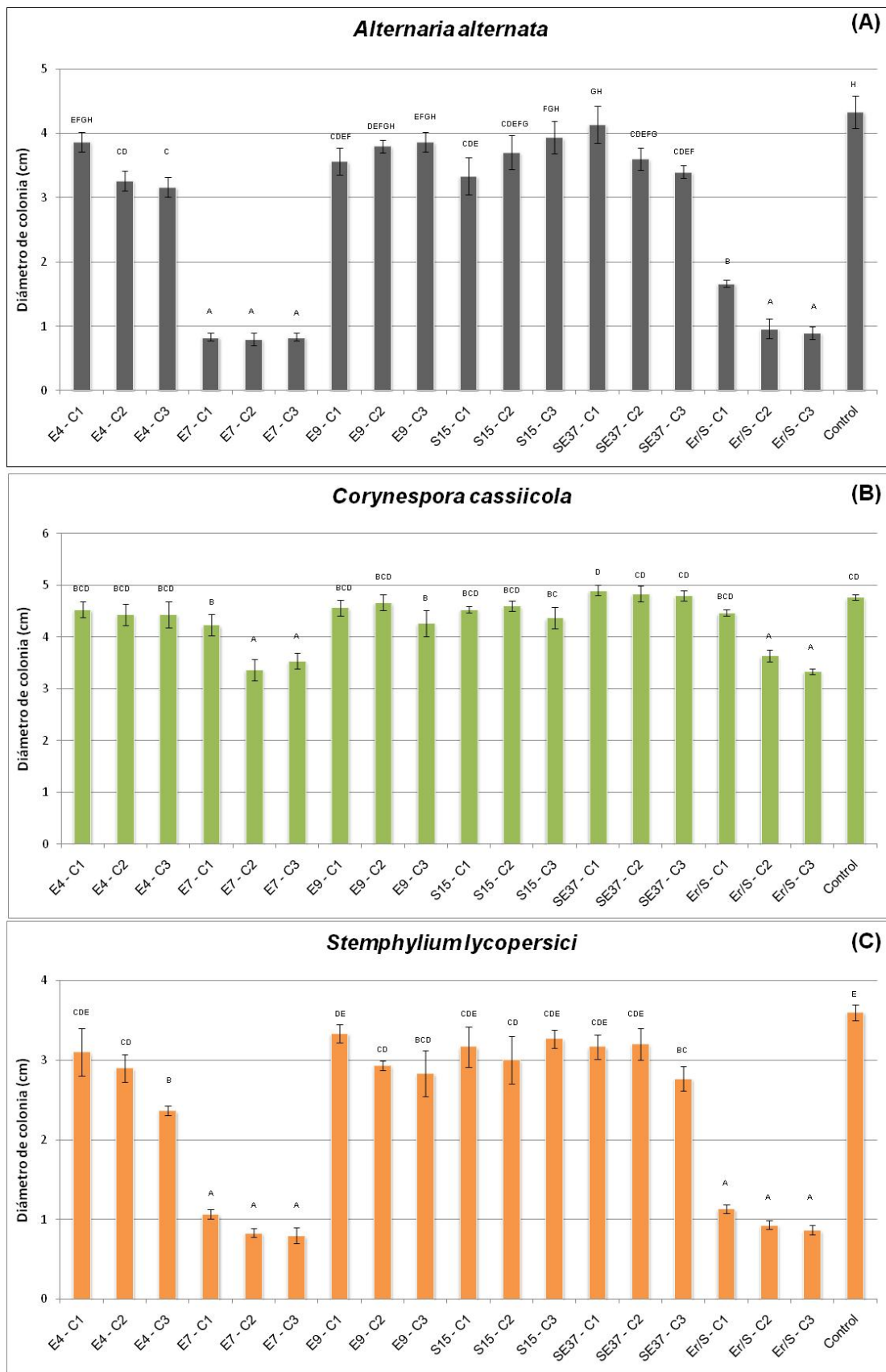
Se evaluó el efecto inhibitorio de las sustancias liberadas al medio de cultivo por los aislados crecidos en caldo nutritivo, a partir de los sobrenadantes libres de células bacterianas. Estos sobrenadantes se adicionaron en tres concentraciones diferentes al medio APG donde se crecieron los tres hongos fitopatógenos. Los resultados se grafican en la figura 6 como diámetro de las colonias fúngicas desarrollados en las tres concentraciones de sobrenadantes aplicadas de los aislados E4, E7, E8, E9, S15 y SE37 y de la cepa control Er/S. E8 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento fúngico por lo que no fue incluido en el gráfico.

En la tabla 4 se muestran los tratamientos que produjeron un porcentaje de inhibición superior al 20 % en el crecimiento de los tres hongos. Estos resultados muestran que tanto el sobrenadante de la cepa control como el aislado 7, en las tres concentraciones que fueron aplicados, inhibieron el crecimiento de los tres fitopatógenos.

**Tabla 4:** Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico producido por el sobrenadante de cultivos bacterianos libres de células aplicado en 3 concentraciones al medio de cultivo del hongo (1, 10 y 20 % v/v). Se muestran los valores que superaron un porcentaje de inhibición del 20 % para los tres hongos.

Cepa/tratamiento	<i>A. alternata</i>	<i>C. cassiicola</i>	<i>S. lycopersici</i>
E7 - C1	70,59	20,78	68,67
E7 - C2	71,76	38,96	72,29
E7 - C3	71,76	33,77	73,49
Cepa Er/S - C1	70,59	23,38	74,70
Cepa Er/S - C2	72,94	46,75	67,47
Cepa Er/S - C3	70,59	40,26	73,49

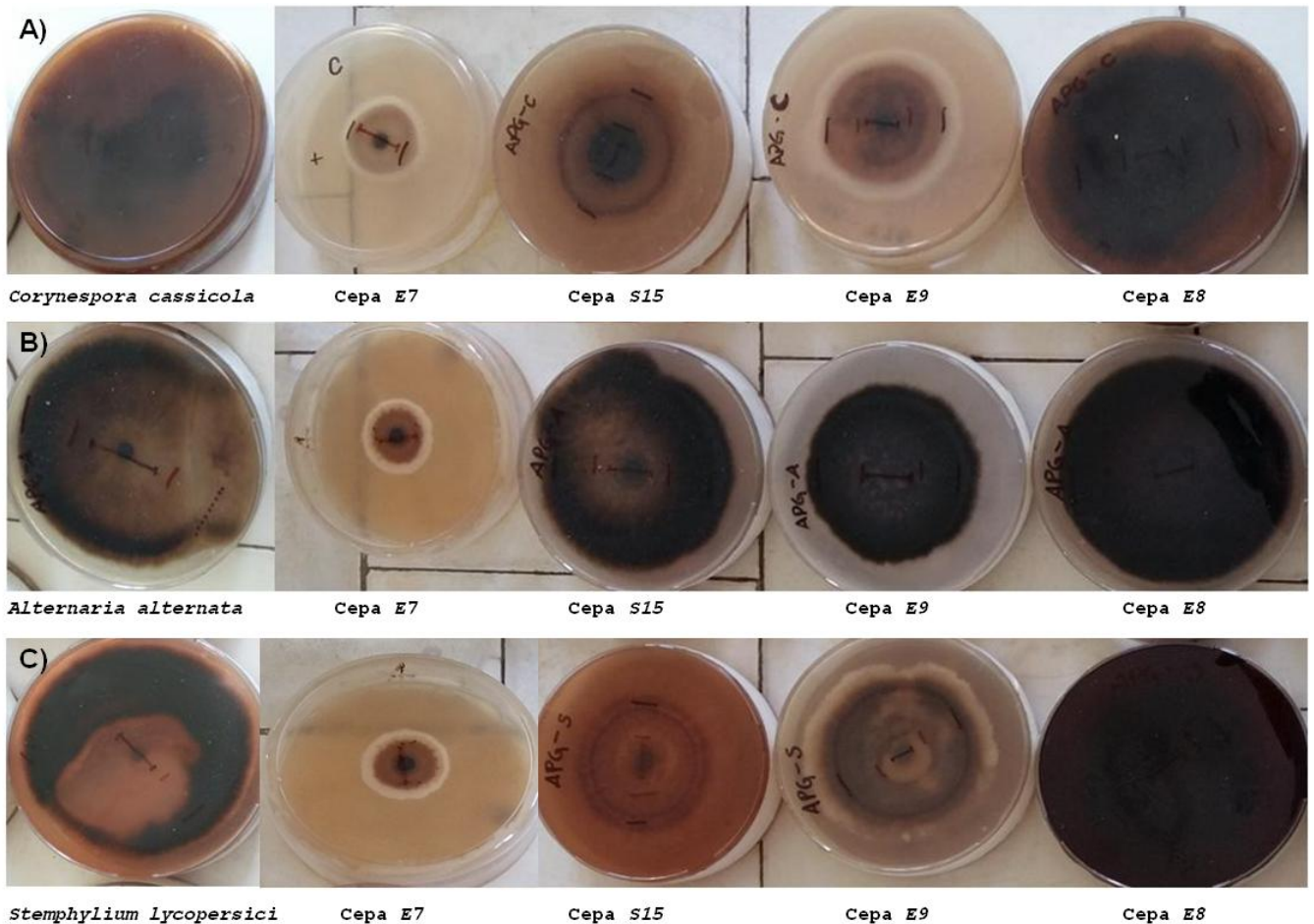




**Figura 6:** Ensayo de antagonismo: Efecto contra hongos fitopatógenos del sobrenadante de cultivo bacteriano (E4, E7, E9, S15, SE37 y Er/S), aplicado en tres concentraciones. A) *A. alternata*, B) *C. cassicola*, C) *S. lycopersici*.

## Producción y efecto de compuestos volátiles

En la figura 7 se muestran las placas selladas en las que se determinó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés).



**Figura 7:** Ensayo de inhibición del crecimiento fúngico por VOCs liberados por bacterias endófitas (E7, S15, E9, E8). A) *C. cassicola*, B) *A. alternata*, C) *S. lycopersici*.

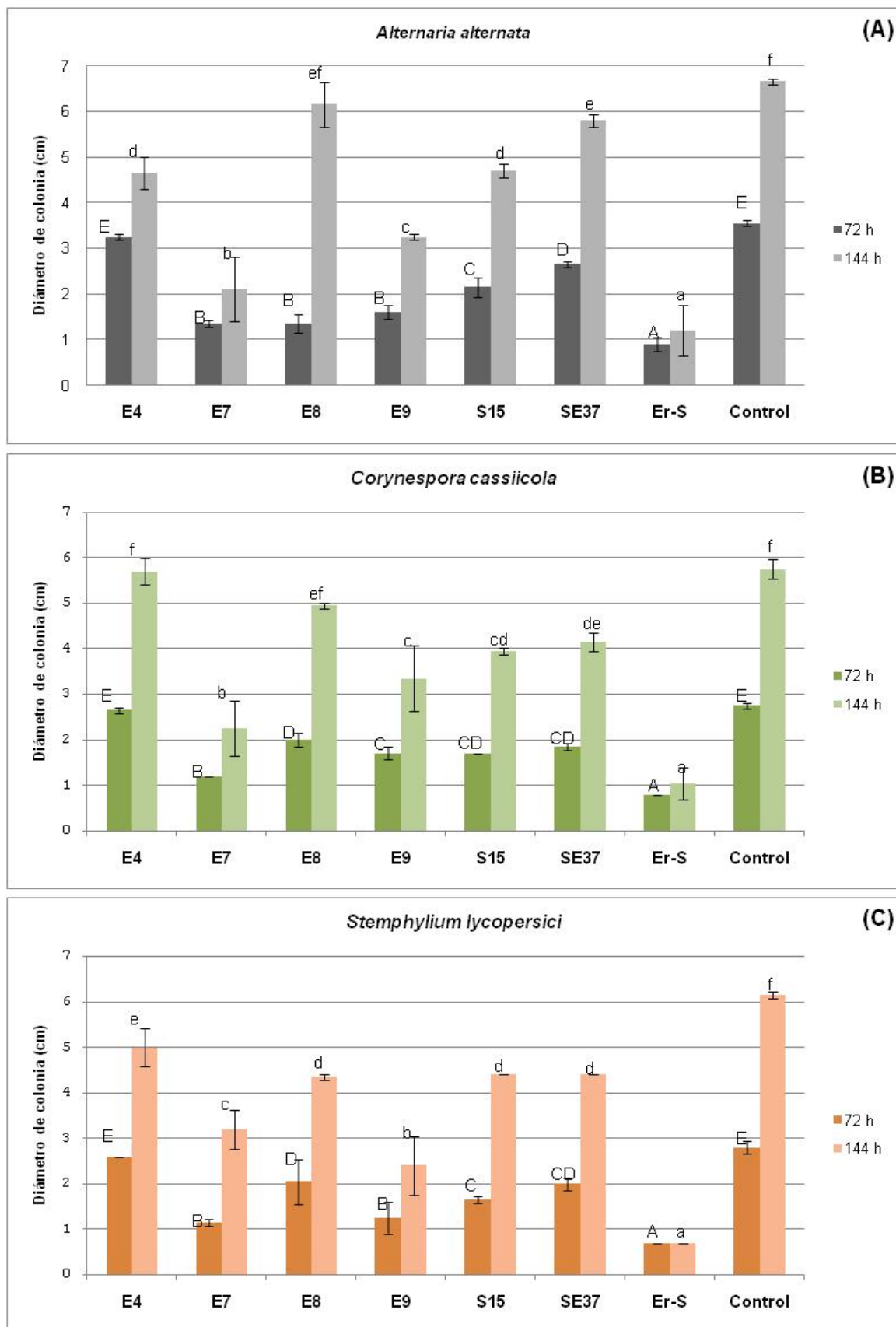
En este caso también se presentan los resultados completos en la figura 8, donde se grafican los diámetros de las colonias fúngicas determinados a dos tiempos posteriores a la iniciación del ensayo (72 y 144 h).

El cálculo del porcentaje de inhibición se realizó nuevamente como se indica más arriba y en la tabla 5 se muestran los datos correspondientes a tratamientos que superaron el 20 % de inhibición del crecimiento de los tres hongos. En esta tabla se observa que los aislados E7, E8, E9,

S15 y SE37 a las 72 h producen VOCs que inhiben el crecimiento de los tres hongos, sin embargo este efecto solo se mantiene para los aislados E7, E9 y S15 luego de 144 h de incubación.

**Tabla 5:** Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico producido por compuestos volátiles en los dos tiempos de evaluación (72 y 144 hs). Se muestran los valores que superaron un porcentaje de inhibición del 20 % para los tres hongos.

Tiempo de evaluación: 72 h			
Cepa	<i>A. alternata</i>	<i>C. cassiicola</i>	<i>S. lycopersici</i>
E7	61,97	56,36	58,93
E8	61,97	27,27	26,79
E9	54,93	38,18	55,36
S15	39,44	38,18	41,07
SE37	25,35	32,73	28,57
Er-S	74,65	70,91	75,00
Tiempo de evaluación: 144 h			
Cepa	<i>A. alternata</i>	<i>C. cassiicola</i>	<i>S. lycopersici</i>
E7	68,42	60,87	47,97
E9	51,13	41,74	60,98
S15	29,32	31,30	28,46
Er-S	81,95	81,74	88,62



**Figura 8:** Ensayo de antagonismo: Efecto contra hongos fitopatógenos de VOCs bacterianos (E4, E7, E8, E9, S15, SE37 y Er/S), determinado a las 72 y 144 hs de incubación. A) *A. alternata*, B) *C. cassiicola*, C) *S. lycopersici*.

## DISCUSIÓN

Las bacterias endófitas son microorganismos que pueden colonizar los tejidos de las plantas intercelularmente y coexisten con ellas de manera benigna dentro de los tejidos (Kloepper y Beauchamp, 1992). Las semillas constituyen la principal estructura de las plantas para la supervivencia de las especies a lo largo del tiempo y desempeñan un papel clave en la agricultura (Guan, 2009). También son el vehículo de una variedad de patógenos y bacterias beneficiosas (Nelson, 2004). Cuando las semillas germinan, se produce el desarrollo de estas comunidades microbianas endófitas que pueden enriquecerse con microorganismos originados en los suelos (Bacilio-Jimenez, *et al.*, 2001; Cottyn, *et al.*, 2001).

En este Trabajo Final de Carrera analizamos bacterias endófitas cultivables, aisladas de semillas y plántulas de dos variedades comerciales de tomate. No se encontró una gran diversidad de especies bacterianas, en coincidencia que lo observado en semillas de otras especies de plantas (Mano, *et al.*, 2006; Compant, *et al.*, 2011; Liu, *et al.*, 2017). Por otro lado, las bacterias cultivables aisladas tanto de semillas como de plántulas de ambos cultivares de tomate, fueron similares en cuanto a los phyla identificados. Esto indicaría que las semillas de tomate podrían tener un subconjunto de bacterias que forman parte de las semillas a lo largo del desarrollo reproductivo y que podrían emitir señales que disparan procesos específicos en la promoción del crecimiento de las plántulas. Las semillas fueron en su mayoría colonizadas por Firmicutes. Este phylum se encontró también, en mayor proporción dentro de las plántulas, lo que sugiere que el proceso de germinación de las semillas proporciona alguna ventaja competitiva nutricional. Dentro de este phylum los géneros que se identificaron fueron: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacillus* y *Jeotgalibacillus*, todos ellos capaces de formar endosporas, lo que podría explicar su alta representación en semilla. En efecto, la capacidad de formar endosporas confiere una ventaja a los colonizadores de semillas ya que esto asegura su supervivencia durante el almacenamiento (Compant, *et al.*, 2011; Truyens, *et al.*, 2015). Probablemente el proceso de maduración de la semilla no seleccione las bacterias en función de sus características, pero la diversidad, al menos de las cultivables, parece estar influenciada por su capacidad de esporular. Evidentemente, se producen algunos cambios a lo largo de la germinación de la semilla y del desarrollo de las

plántulas que promueven de forma diferencial ciertos grupos de microorganismos (Truyens, *et al.*, 2015). El proceso de germinación de semillas puede generar un alto requerimiento de nutrientes, de manera que se genera un ambiente estresante para las bacterias y como resultado de esto solo aquellos que pueden esporular sobreviven mucho mejor en este ambiente.

En general, los géneros bacterianos que se han descrito en las semillas son *Bacillus* y *Pseudomonas*. También se encuentran a menudo *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pantoea* y *Acinetobacter* como endófitos de semillas (Cankar, *et al.*, 2005; Mano, *et al.*, 2006; Compant, *et al.*, 2011; Xu, *et al.*, 2014; Tuyens, *et al.*, 2015). En este trabajo se encontró que las semillas de tomate albergan especies bacterianas endofíticas similares a las reportadas para otras especies de plantas, lo que sugiere que podría ser una estrategia de dispersión dentro del medio ambiente.

Los endófitos probablemente brinden beneficios a las plantas hospedadoras a través de varios mecanismos, como la síntesis de sustancias antimicrobianas o la síntesis de promotores del crecimiento vegetal. En este trabajo encontramos que 6 de los aislados estudiados, identificados como *Micrococcus* sp. (E4), *Bacillus* sp. (E7, E9, S15 y SE37) y *Paenibacillus* sp. (E8) inhibieron significativamente el crecimiento micelial en condiciones controladas; sin embargo, difieren en su capacidad para sintetizar algunas moléculas inhibitorias.

La síntesis de sideróforos es un mecanismo de biocontrol vinculado a la competencia por nutrientes, ya que los sideróforos complejan el hierro dejándolo menos disponible para los demás microorganismos. Solo dos cepas produjeron sideróforos, E7 (*Bacillus*) y SE28 (*Acinetobacter*). Sin embargo este mecanismo de biocontrol de patógenos solo podría asociarse al efecto biocontrolador de E7 sobre los patógenos, ya que la cepa SE28 no tuvo efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos estudiados.

Varios estudios han demostrado que los metabolitos secundarios producidos por las bacterias pueden servir como herramientas antimicrobianas, proporcionando una ventaja a las cepas productoras cuando compiten contra otros microorganismos en el mismo nicho ecológico (Foster y Bell, 2012). Un buen ejemplo de esto es la supresión de fitopatógenos de suelos por compuestos antimicrobianos de bacterias rizosféricas beneficiosas para las plantas. Esta

observación sugiere que la capacidad de inhibir el crecimiento de competidores microbianos favorece evolutivamente a los microorganismos productores de antibióticos frente a los susceptibles (Tyc, *et al.*, 2017). Las moléculas antifúngicas sintetizadas por microorganismos se pueden usar para controlar biológicamente a los patógenos (Baysal *et al.*, 2013; López, *et al.*, 2018). La mayoría de los productos de control biológico sintetizados por algunas especies de *Bacillus* son pequeños polipéptidos, como las iturinas y las bacillomicinas, que inhiben el crecimiento de varios hongos (Baysal *et al.*, 2013). También se conocen los terpenos que son compuestos volátiles producidos por algunos taxones de bacterias de suelo (Song, *et al.*, 2015; Tyc, *et al.*, 2017), que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Rhizoctonia solani* (Song, *et al.*, 2015). Los compuestos volátiles de azufre son otro ejemplo y se originan de la homocisteína en bacterias (Nawrath *et al.*, 2010) desempeñando un papel importante en las interacciones entre microbios y plantas e interacciones interespecíficas entre microbios (Tyc *et al.*, 2015). Entre ellos, el Dimetildisulfuro, se identificó como un compuesto que estimula el crecimiento bacteriano e inhibe por completo el crecimiento fúngico (Garbeva, *et al.* 2014). En este trabajo, 4 de los *Bacillus* aislados (E7, E9, S15 y SE37) y una cepa de *Paenibacillus* (E8) que fueron seleccionados como biocontroladores, produjeron VOCs como posible mecanismo para la inhibición del crecimiento fúngico. Adicionalmente, encontramos que *Bacillus* sp., E7 inhibió el crecimiento de tres hongos patógenos de plantas, *A. alternata*, *C. cassicola* y *S. lycopersici*, y en los ensayos posteriores comprobamos no solo la producción de sideróforos, sino además la inhibición del crecimiento fúngico mediada por compuestos solubles liberados al medio de cultivo y compuestos volátiles. Por lo tanto, esta bacteria tiene diferentes estrategias, aunque no podemos evaluar cuál es la más importante en la naturaleza. En comparación con los compuestos solubles que se acumulan alrededor de las células, los compuestos volátiles pueden difundir fácilmente a través de los poros llenos de aire en el suelo y jugar un papel en las interacciones microbianas a larga distancia. Es plausible que los VOCs sean relativamente más importantes en las interacciones entre las bacterias del suelo cuando disminuyen los niveles de humedad del suelo y hay más poros llenos de aire disponibles, pero esto aún no ha sido estudiado experimentalmente (Tyc, *et al.*, 2017). Los compuestos volátiles bacterianos ofrecen un gran potencial para la protección sostenible de cultivos

como biofertilizantes gaseosos ecológicos y alternativas a los pesticidas nocivos, un potencial que también tienen las sustancias solubles sintetizadas por estos endófitos.

### **Conclusiones y perspectivas**

Los bioproductos hoy en día son una herramienta de gran importancia para incrementar la eficiencia de producción en cualquier cultivo de manera más sustentable, por medios como el biocontrol de patógenos y la promoción del crecimiento en las plantas. Entre las bacterias endófitas de las semillas se encuentran microorganismos con actividad biocontroladora, que utilizan diferentes mecanismos e incluso combinación de ellos que generan efectos antagonistas contra hongos fitopatógenos. Las bacterias endófitas dentro de todos los microorganismos estudiados tienen la ventaja de colonizar los tejidos vegetales, lo que les provee un ambiente menos estresante para sobrevivir. En particular, las cepas identificadas en este trabajo como biocontroladoras son capaces de formar esporas como estructuras de resistencia lo que les confiere una ventaja adicional para ser empleadas en la formulación de inoculantes comerciales.

*Bacillus* E7, es una bacteria que coloniza las plántulas de tomate, que demostró tener una capacidad excepcional para proteger a las plantas contra los patógenos fúngicos. Puede ser que los aislados bacterianos en interacción con las plantas y constituyendo su endobioma, sinteticen moléculas antimicrobianas como las mencionadas anteriormente, lo que actualmente constituye un escenario de gran interés.

Los resultados obtenidos generan perspectivas futuras de trabajo, vinculadas al estudio a gran escala, es decir a campo, del efecto de estas bacterias seleccionadas sobre los hongos patógenos contra los que fueron ensayadas y que producen enfermedades muy comunes en los cultivos de tomate.



## Bibliografía

- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1), 1-20.
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Alexander, D. B., y Zuberer, D. A. (1991).** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.
- Aliye, N., Fininsa, C., y Hiskias, Y. (2008).** Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 47(3), 282-288.
- Araújo, W. L., Maccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., y Azevedo, J. L. (2001).** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian journal of microbiology*, 47(3), 229-236.
- Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. C., y Belarbi, A. (2002).** Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, 24(2), 135-142.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., y Passaglia, L. M. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.
- Benhamou, N., Gagné, S., Le Quéré, D., y Dehbi, L. (2000).** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1), 45-56.
- Cankar, K., Kraigher, H., Ravnikar, M., y Rupnik, M., (2005).** Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS microbiology letters*. 244(2), 341-345.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., y Sessitsch, A. (2011).** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62(1), 188-197.

- de Salomone, I. G., y Döbereiner, J. (1996).** Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and fertility of soils*, 21(3), 193-196.
- FAO, I. (2016).** WFP (2015), The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Food and Agriculture Organization Publications, Rome.
- Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L., y Araújo, W. L. (2008).** Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS microbiology letters*, 287(1), 8-14.
- Fishal, E. M. M., Meon, S., y Yun, W. M. (2010).** Induction of tolerance to *Fusarium* wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp.(UPMB3). *Agricultural Sciences in China*, 9(8), 1140-1149.
- Foster, K.R. y Bell, T. (2012).** Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.* 22, 1845–1850.
- Galli-Terasawa, L. V., Glienke-Blanco, C., y Hungria, M. (2003).** Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 933-939.
- Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., y De Boer, W. (2014).** Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS microbiology ecology*, 87(3), 639-649.
- González-Chávez, M. D. C. Á. (2005).** Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29-37.
- Holguin, G., y Patten, C. L. (1999).** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. World Scientific.
- Johansson, J. F., Paul, L. R., y Finlay, R. D. (2004).** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology ecology*, 48(1), 1-13.
- Kloepper, J. W., y Beauchamp, C. J. (1992).** A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(12), 1219-1232.

- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M., y Schenk, P.M., (2017).** Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8.
- López, S., Pastorino, G., Franco, M., Medina, R., Lucentini, C., Saparrat, M., y Balatti, P. (2018).** Microbial endophytes that live within the seeds of two tomato hybrids cultivated in Argentina. *Agronomy*, 8(8), 136.
- Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., y Morisaki, H., (2006).** Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 21(2), 86-100.
- McCully, M. E. (2001).** Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology*, 28(9), 983-990.
- Nakama y Lozano, (2006).** Producción y mercado de tomate en Argentina. Informe frutihortícola.
- Nawrath, T., Gerth, K., Müller, R., y Schulz, S. (2010).** The Biosynthesis of the Aroma Volatile 2-Methyltetrahydrothiophen-3-one in the Bacterium *Chitinophaga Fx7914*. *ChemBioChem*, 11(13), 1914-1919.
- Nelson, E. B. (2004).** Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 271-309.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B. y Thonart, P. (2007).** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Rashid, S., Charles, T. C., y Glick, B. R. (2012).** Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*, 61, 217-224.
- Reinhold-Hurek, B., y Hurek, T. (1998).** Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 29-54.

- Romero, F. M., Marina, M., y Pieckenstain, F. L. (2016).** Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in microbiology*, 167(3), 222-233.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., y Dowling, D. N. (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. y Glick, B. R. (2016).** Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.
- Sarabia, O. M., Madrigal, P. R., Martínez, T. M. y Carreón, A. Y. (2010).** Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones, *Biologicas*.
- Schulz, B. (2006).** Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 261-279). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Song, C., Schmidt, R., de Jager, V., Krzyzanowska, D., Jongedijk, E., Cankar, K. y Garbeva, P. (2015).** Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *Bmc Genomics*, 16 (1), 1103.
- Sturz, A. V. y Nowak, J. (2000).** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil ecology*, 15(2), 183-190.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A. y Vangronsveld, J., (2015).** Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*. 7(1), 40-50.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M. y Garbeva, P. (2017).** The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292.
- Tyc, O., Zweers, H., de Boer, W. y Garbeva, P. (2015).** Volatiles in inter-specific bacterial interactions. *Frontiers in microbiology*, 6, 1412.

- Vílchez, J. I., Niehaus, K., Dowling, D., González-López, J. y Manzanera, M. (2018).** Protection of pepper plants from drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by modulation of the plant's glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate content: A comparative metabolomics approach. *Frontiers in Microbiology*, 9, 284.
- Vincent, J. M. (1970).** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Weller, D. M. (1988).** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S. y Shen, L. (2014).** Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 835-845.
- Yagi, K., Matsumoto, T., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Minamisawa, K. y Yamane, H. (2000).** Isolation and Characterization of Low-indole-3-acetic Acid-producing Mutants from *Bradyrhizobium elkanii*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(7), 1359-1364.
- Yanni, Y. G., Dazzo, F. B., y Zidan, M. I. (2011).** Beneficial endophytic rhizobia as biofertilizer inoculants for rice and the spatial ecology of this bacteria–plant association. In *Bacteria in agrobiology: Crop ecosystems* (pp. 265-294). Springer, Berlin, Heidelberg.