

MÉTODO PARA EVALUAR PROTECCIÓN CONTRA *Pythium debaryanum* Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALFALFA POR *Pseudomonas* FLUORESCENTES

Yanes, M.L.¹; Fernández, A.²; Arias, A.¹; Altier, N.²

Recibido: 10/10/04 Aprobado: 29/12/04.

RESUMEN

Las *Pseudomonas* fluorescentes, reportadas como efectivos agentes de control biológico, pueden ser utilizadas para manejar las enfermedades de implantación de la alfalfa (*Medicago sativa* L.), causadas por *Pythium* spp. En este trabajo, se describe una metodología *in vivo* para evaluar la capacidad de protección de enfermedad y de promoción del crecimiento vegetal de aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes, en el sistema alfalfa-*Pythium debaryanum*. El método consiste en un bioensayo en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo. Las semillas de alfalfa se sembraron en sustrato vegetal comercial y se procedió según los siguientes tratamientos: sin *Pseudomonas*, sin *P. debaryanum* (control de germinación); sin *Pseudomonas*, inoculado con *P. debaryanum* (control de enfermedad); cada uno de los aislamientos de *Pseudomonas* co-inoculados con *P. debaryanum*. Se realizaron 12 bioensayos, considerándose en su conjunto un diseño experimental aumentado, con cuatro testigos sistemáticamente evaluados en bloques completos al azar con 4 repeticiones y ampliado el bloque hasta alcanzar un total de 16 tratamientos por bioensayo. El control de enfermedad registró un 33.2% de plantas emergidas al día 15 respecto al control de germinación (100%). Los 101 aislamientos evaluados mostraron un rango amplio de valores de emergencia. Un 12% de los aislamientos presentó una capacidad de protección alta con emergencia superior a 60%. Mediante una estrategia similar, pero en ausencia del patógeno, se evaluó la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los aislamientos bacterianos, registrándose la biomasa total al día 35 como variable discriminante. La metodología aplicada permitió identificar cinco aislamientos con una capacidad de protección significativa y cuatro con capacidad de promoción del crecimiento vegetal, los cuales califican para una posterior validación agronómica en condiciones de campo.

PALABRAS CLAVE: control biológico, *Medicago sativa* L., promoción del crecimiento vegetal, *Pseudomonas*, *Pythium*.

SUMMARY

METHOD TO EVALUATE DISEASE SUPPRESSION AGAINST *Pythium debaryanum* AND ALFALFA GROWTH PROMOTION BY FLUORESCENT *Pseudomonas*

Fluorescent *Pseudomonas* have been extensively reported as effective biocontrol agents and can be used to manage *Pythium* seedling diseases in alfalfa. An *in vivo* methodology was developed to evaluate fluorescent *Pseudomonas* isolates for their ability to suppress disease and promote plant growth in the alfalfa-*Pythium* pathosystem. The standard method consists on a bioassay performed in growth chamber under controlled conditions of temperature and photoperiod. Alfalfa seeds were sown in commercial substrate and subsequently

¹Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay.

²Sección Protección Vegetal, INIA Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 48 Km.10, Canelones, Uruguay.

treated as follows: no *Pseudomonas*, no *Pythium debaryanum* (germination control); inoculated only with *P. debaryanum* (disease control); each one of the *Pseudomonas* isolates co-inoculated with *P. debaryanum*. An augmented experiment design was obtained by selecting a random complete blocks design for four checks systematically evaluated on 12 bioassays, and enlarging the blocks to accommodate up to 16 treatments per assay. Disease control recorded an emergence of 33.2% on day 15 after sowing date, as compared with germination control (100%). The 101 fluorescent *Pseudomonas* isolates showed a wide response on disease suppression ability. Twelve percent of tested isolates reasonably protected alfalfa plants against *P. debaryanum*, recording an emergence over 60%. A similar procedure, in the absence of the pathogen, was used to evaluate alfalfa growth promoting ability of selected *Pseudomonas* isolates. Five isolates exhibited a significant biocontrol activity against *P. debaryanum* and four of them also recorded a significant plant growth promoting effect. Both bioassays were appropriate to identify candidate *Pseudomonas* isolates to be further tested under field conditions.

KEY WORDS: biocontrol, *Medicago sativa* L., PGPR, *Pseudomonas*, *Pythium*.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas forrajeras aportan grandes beneficios a los sistemas de producción agropecuarios. No sólo representan una fuente de alimento de alta calidad para el ganado sino que además suministran nitrógeno a los suelos mediante la asociación simbiótica con rizobio, lo cual puede ser aprovechado por otros componentes de las pasturas mixtas o por cultivos agrícolas en rotación. Dentro de las leguminosas forrajeras, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) presenta cualidades destacadas. Posee un alto contenido nutricional y mantiene elevados valores de calidad durante todo su ciclo. Es un cultivo de crecimiento estival, muy persistente y tolerante a la sequía, lo que le permite alcanzar excelentes rendimientos productivos. Por estos motivos, la alfalfa ha sido revalorizada por los productores agropecuarios, especialmente los lecheros e invernadores intensivos (Rebuffo, 2000).

La instalación de un cultivo de alfalfa requiere una inversión alta, debido al precio de la semilla, las densidades de siembra utilizadas y los requerimientos de herbicidas y fósforo. Por esta razón, la etapa del establecimiento del cultivo es crítica para amortizar el costo de implantación y lograr capitalizar las ventajas que ofrece esta leguminosa (Formoso, 2000; Rebuffo, 2000). Frecuentemente se observan fallas en la emergencia y muerte de la plántula emergida, asociadas a infecciones causadas por oomicetos del género *Pythium*, responsables del "damping-off" (Altier, 1996; Hancock, 1996; Stuteville & Erwin, 1990). En la etapa de pre-emergencia la infección produce la pudrición de la semilla, impidiendo su germinación. La infección de post-emergencia se caracteriza por la necrosis de la radícula e hipocótilo y la pérdida de turgencia, lo cual provoca el colapso de la planta (Hancock, 1996). Estas enfermedades ocurren cuando las condiciones ambientales son desfavorables para una rápida emergencia y establecimiento de

las plantas, como por ejemplo exceso de lluvias, humedad y bajas temperaturas del suelo (Altier, 2000).

Las pérdidas causadas por enfermedades de implantación en alfalfa han justificado investigaciones recientes sobre posibles estrategias de manejo (Altier & Thies, 1995; Jones & Samac, 1996; Larkin *et al.*, 1995). Las enfermedades pueden ser controladas mediante el tratamiento directo de la semilla con agroquímicos como el metalaxil (formulación comercial Apron, Novartis), el cual es un fungicida de acción sistémica que no presenta efectos adversos sobre el rizobio (Leath *et al.*, 1996). Sin embargo, se han reportado aislamientos de *Pythium* resistentes a dicho fungicida (Cook & Zhang, 1985; Sanders, 1984) por lo cual su eficacia se puede ver comprometida. A esto hay que sumarle los efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud animal.

En sistemas de producción integrada y orgánica o aquellos en los cuales se requiere la trazabilidad del producto final, donde la explotación de los recursos naturales se realiza en forma racional y se tiene en cuenta la conservación del medio ambiente, las posibles alternativas para el manejo de enfermedades son el uso de cultivares genéticamente resistentes y el control biológico de los patógenos. La obtención de germoplasma con marcada resistencia a *Pythium* aún no ha dado resultados promisorios (Altier & Thies, 1995; Hancock, 1996). El control biológico resulta, entonces, una alternativa viable y menos agresiva para el medio ambiente que el uso de agroquímicos. Un amplio número de microorganismos han sido descritos como controladores de patógenos de plantas, entre los cuales se destacan los pertenecientes al género *Pseudomonas* (Martin & Loper, 1999). Dentro de este género, algunas especies de *Pseudomonas* fluorescentes pueden ser catalogadas como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal). *P. fluorescens*, *P. putida* y *P.*

aureofasciens se encuentran frecuentemente en la rizósfera y presentan una gran capacidad para colonizar raíces (Palleroni, 1984), lo cual las convierte en buenas candidatas para la producción de inoculantes. Estas bacterias son capaces de controlar diferentes géneros de hongos fitopatógenos tales como *Pythium* (Loper, 1988; Martin & Loper, 1999), *Rhizoctonia* (Bagnasco *et al.*, 1998), *Gaeumannomyces* (Thomashow & Weller, 1988; Weller *et al.*, 2002) y otros, favoreciendo indirectamente el crecimiento vegetal. Las rizobacterias son capaces de promover el crecimiento de las plantas mediante mecanismos más directos como la producción de hormonas vegetales y el aumento de la disponibilidad de nutrientes del suelo, entre otros (Gerhardson & Wright, 2002).

El Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE cuenta con una colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas que fueron aisladas de la rizósfera de plantas sanas de alfalfa, colectadas de tres regiones diferentes de Uruguay, en el marco del proyecto IFS No. C/2945-1 "Native fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents of alfalfa seedling diseases". Los 702 aislamientos que componen la colección fueron caracterizados respecto a la capacidad de antagonismo *in vitro* contra *Pythium* spp. y a la presencia de genes para la biosíntesis de antibióticos con actividad biocontroladora.

La caracterización *in vitro* de las interacciones microbianas no necesariamente refleja los procesos naturales que ocurren en la rizósfera de las plantas, por lo cual es imprescindible desarrollar una metodología estándar que permita realizar la evaluación de la capacidad de protección de enfermedad de los aislamientos bacterianos en un nivel más complejo de interacción planta-patógeno-agente de control biológico. Dicha metodología debe ser eficiente y brindar resultados reproducibles y confiables, y al mismo tiempo mantener condiciones similares al ambiente natural en que se desarrollan dichas interacciones. De esta forma, se puede profundizar en el conocimiento de las rizobacterias nativas - una riqueza natural de nuestro suelo - sobre las cuales existe escasa información (Fabiano *et al.*, 1994). El abordaje de sistemas de estudio que involucran a la planta afectada, al patógeno y al microorganismo benéfico ha sido reportado para alfalfa y soja, co-inoculadas con *Phytophthora* spp. y *Streptomyces* spp. (Xiao *et al.*, 2002). En este trabajo los ensayos se llevaron a cabo en tubos con vermiculita estéril, en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo.

Los objetivos del presente trabajo fueron: (i) desarrollar un método para evaluar la capacidad de protección de enfermedad de aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en el sistema alfalfa-*Pythium debaryanum*; (ii) desarrollar un método para evaluar la capacidad de promoción del

crecimiento vegetal de aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes; (iii) caracterizar la citada colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas utilizando ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

Los 101 aislamientos utilizados en el trabajo fueron seleccionados a partir de una colección de 702 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes nativas, obtenidas de la rizósfera de plantas sanas de alfalfa colectadas en las zonas de influencia de INIA La Estanzuela (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Colonia), EEMAC (Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni", Paysandú) y UEG-INIA Tacuarembó (Unidad Experimental Glencoe, Paysandú), en el marco del proyecto IFS No. C/2945-1 "Native fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents of alfalfa seedling diseases". La selección se realizó en base a la capacidad de inhibir el crecimiento de *Pythium debaryanum in vitro*, y a la presencia de genes para la biosíntesis de antibióticos que han sido reportados en *Pseudomonas fluorescens* como responsables de actividad biocontroladora. Se incluyeron, además, las cepas de *P. fluorescens* UP61, UP143 y UP148, originalmente aisladas de la rizósfera de plantas sanas de *Lotus corniculatus* L. (Bagnasco *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2001). Los aislamientos y las cepas de *P. fluorescens* se mantuvieron en glicerol 25% a -20° C y fueron crecidos en Medio King B (KB, King *et al.*, 1954). La cepa de *Pythium debaryanum* Pyl pertenece a la colección del Banco de microorganismos patógenos del INIA Las Brujas. Dicho aislamiento se mantiene en discos de Corn Meal Agar (CMA, Difco®) en agua estéril.

Preparación de inóculo fúngico

El inóculo fúngico (micelio y esporangios) se obtuvo de la siguiente forma: se extrajo un disco de 3mm de diámetro a partir de micelio de *Pythium debaryanum* crecido 2-3 días en CMA, y se colocó en el centro de una placa de Petri conteniendo 1.5% de Agar Agua (AA). Se incubó a 22° C por 3 días y, una vez colonizada la superficie, el agar fue homogeneizado en licuadora (8 placas/1000 mL de agua estéril).

Preparación de inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano se obtuvo incubando los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en tubos conteniendo 10 mL de KB con agitación a 27° C durante toda la

noche, hasta una concentración de aproximadamente 1.5×10^9 células por mL de cultivo. Finalmente, los 10 mL de cultivo se diluyeron en 140 mL de agua estéril.

Capacidad de protección de enfermedad causada por *P. debaryanum*

Los ensayos de protección de enfermedad se realizaron en cámara de crecimiento a 12°C , con un fotoperíodo de 10 h. Se utilizaron almácigas de espuma-plast (BROMYROS), cuyas celdas poseen una abertura de 4×4 cm, una profundidad de 8 cm y un volumen aproximado de 50 mL. La unidad experimental consistió en 12 celdas con un arreglo rectangular de 4×3 celdas. Se sembraron 10 semillas de alfalfa por celda, conteniendo sustrato vegetal comercial (Floragard, TKS 1 Instant, Alemania). Dicho sustrato, conformado por 100% turba rubia de estructura fina, posee todos los nutrientes y oligonutrientes necesarios a bajas concentraciones [N (70-150 mg/L), P_2O_5 (80-180 mg/L), K_2O (140-220 mg/L), sal (0.5-1.1 g/L)], un pH óptimo de 5.2-6.0 (CaCl_2), y un sistema *instanti* (patentado) que permite la absorción inmediata y distribución uniforme del agua.

Los tratamientos fueron los siguientes: sin *P. debaryanum* y sin *Pseudomonas* (control de germinación); con *P. debaryanum* y sin *Pseudomonas* (control de enfermedad); cada uno de los 101 aislamientos de *Pseudomonas* y las cepas de *P. fluorescens* UP61, UP143 y UP148 coinoculadas con *P. debaryanum*.

Para la inoculación con *P. debaryanum* se aplicaron 5 mL de inóculo/celda el día previo a la siembra y 3 mL de inóculo/celda el día posterior a la siembra. Para la inoculación con *Pseudomonas* se aplicaron 3 mL de inóculo/celda (aproximadamente 3×10^8 bacterias) el día de la siembra. El riego se realizó diariamente con agua corriente.

Se realizaron 12 bioensayos, considerándose en su conjunto un diseño experimental aumentado (Federer, 1991; Federer & Raghavarao, 1975). Este se obtuvo mediante la selección de cuatro tratamientos sistemáticamente evaluados en los 12 ensayos, en bloques completos al azar con 4 repeticiones (correspondientes a cada estante de la cámara de crecimiento). El bloque fue ampliado para ubicar los aislamientos de la colección hasta alcanzar un total de 16 tratamientos por bioensayo. Los tratamientos sistemáticamente evaluados fueron: el control de germinación, el control de enfermedad, el aislamiento T683 con alta capacidad de protección de enfermedad y el aislamiento T655 con baja capacidad protectora.

Se registró el número de plantas emergidas sanas a los 7, 9, 11, 13, 15 y 22 días pos-siembra. El valor que registró el control de germinación se expresó como base 100, y la emergencia obtenida para cada aislamiento bacteriano se expresó como porcentaje relativo a la base 100.

Capacidad de promoción del crecimiento vegetal

Los ensayos de promoción del crecimiento de la alfalfa se realizaron en cámara de crecimiento a 12°C , con un fotoperíodo de 11 h. Se utilizó la misma metodología que la descrita para el ensayo de protección de enfermedad: almácigas de espuma-plast, unidad experimental de 12 celdas (arreglo rectangular de 4×3 celdas), diseño experimental de bloques completos al azar con 4 repeticiones, y siembra de 10 semillas de alfalfa por celda en sustrato vegetal comercial.

En este caso los tratamientos fueron: control de germinación (sin *Pseudomonas*) y 14 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes que mostraron el mejor comportamiento en cuanto a capacidad de protección de enfermedad. Para la inoculación con *Pseudomonas* se aplicaron 3 mL de inóculo/celda (aproximadamente 3×10^8 bacterias) el día de la siembra. El riego se realizó diariamente con agua corriente. Se realizaron dos ensayos consecutivos con los mismos aislamientos, por lo que no se consideró diseño experimental aumentado. Las plantas de alfalfa se mantuvieron durante 35 días bajo las condiciones descriptas, momento en el cual fueron cosechadas, separándolas cuidadosamente del sustrato. Se registró el número de plantas emergidas (NP) y la biomasa por unidad experimental (peso fresco, PF). El material fue secado en estufa a 60°C durante 48 horas para obtener el peso seco (PS) por unidad experimental.

Análisis estadístico

Para el ensayo de protección de enfermedad, las variables analizadas fueron emergencia al día 15 (D15) y emergencia al día 22 (D22). Para el ensayo de promoción del crecimiento las variables fueron número de plantas al día 35 (NP), peso fresco por unidad experimental (PF) y peso seco por unidad experimental (PS).

Para ambos ensayos la media fue estimada y ajustada de acuerdo a un modelo mixto que considera fijo el efecto tratamiento y aleatorios el efecto ensayo, el efecto bloque anidado en ensayo y el efecto interacción tratamiento \times ensayo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k(\alpha_j) + (\tau\alpha)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

El modelo fue analizado mediante el procedimiento MIXED del SAS, que utiliza REML (*Restricted Maximum Likelihood*) para estimar los componentes de varianza de los efectos aleatorios. Para la redacción del programa de diseño aumentado, se utilizó "PROC MIXED for Recovering Interblocking Information" (Wolfinger *et al.*, 1997). Las

medias de los tratamientos fueron separadas usando LSD de Fisher protegida ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Capacidad de protección de enfermedad causada por *P. debaryanum*

Los cuatro tratamientos que fueron repetidos en cada uno de los 12 experimentos se diferenciaron significativamente entre sí, registrando un amplio rango de valores de emergencia (Cuadro 1). No se registró interacción significativa entre tratamiento y experimento, señalando un patrón de comportamiento repetible en cuanto a exactitud y precisión de las variables evaluadas. La correlación entre los registros observados al día 15 y al día 22 fue muy alta ($R^2 = 0.914$); este resultado indica que el número de plantas al día 15 puede ser utilizado como variable discriminante, reduciendo sensiblemente la duración del experimento.

El control de enfermedad (inoculado con *P. debaryanum*) registró una emergencia de 33.2%, comparado con el con-

trol sin inocular (base 100). Los 101 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes nativos mostraron una gran diversidad en cuanto a su capacidad protectora, expresada como porcentaje de emergencia al día 15 (Figura 1). Aproximadamente el 12% de los aislamientos mostraron una capacidad protectora alta que permitió registros de emergencia de alfalfa superiores al 60% (Figura 2). Los cinco tratamientos que registraron el mayor porcentaje de emergencia al día 15, P388, T633, P271, C119 y T688, fueron significativamente superiores al control de enfermedad, inoculado sólo con *P. debaryanum*. Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* UP61, UP143 y UP148, cuya capacidad protectora fue reportada para enfermedades de implantación de *Lotus corniculatus* (Bagnasco *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2001), no exhibieron características protectoras para la alfalfa frente al ataque de *P. debaryanum* (Fig. 2). Por otra parte, un importante porcentaje de los aislamientos no se diferenció significativamente del control de enfermedad, a pesar de que en ensayos *in vitro* previos, habían mostrado poseer características biocontroladoras.

Cuadro 1. Emergencia (%) de plantas de alfalfa al día 15 y 22 post-siembra, para los cuatro tratamientos evaluados sistemáticamente en 12 bioensayos con un diseño experimental aumentado; valores promedio del análisis conjunto. Control de germinación: sin *Pseudomonas*, sin *Pythium debaryanum* (base 100=98.2 plantas/unidad experimental); control de enfermedad: inoculado sólo con *P. debaryanum*; aislamientos T683 y T655 de *Pseudomonas* fluorescentes coinoculados con *P. debaryanum*, con alta y baja capacidad protectora del "damping-off", respectivamente.

Tratamiento	% emergencia	
	día 15	día 22
Control de germinación	100.0 a	100.0 a
Control de enfermedad	33.2 d	26.4 d
T683	65.9 b	56.3 b
T655	43.0 c	36.1 c
LSD (5%)	9.1	9.0

Los tratamientos seguidos de la misma letra no difieren significativamente.

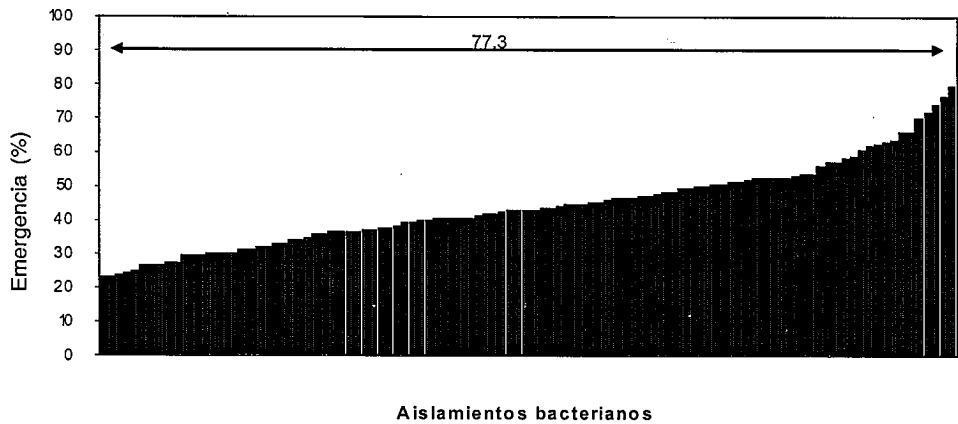


Figura 1. Variabilidad de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en cuanto a la capacidad de protección del “damping-off” causado por *P. debaryanum* en alfalfa. Número de plantas de alfalfa emergidas a los 15 días post-siembra, expresado en porcentaje. Valores promedio del análisis conjunto de 12 bioensayos (diseño experimental aumentado). La base 100 corresponde a la emergencia de plantas de alfalfa del control de germinación sin inocular (98.2 plantas/unidad exp.)

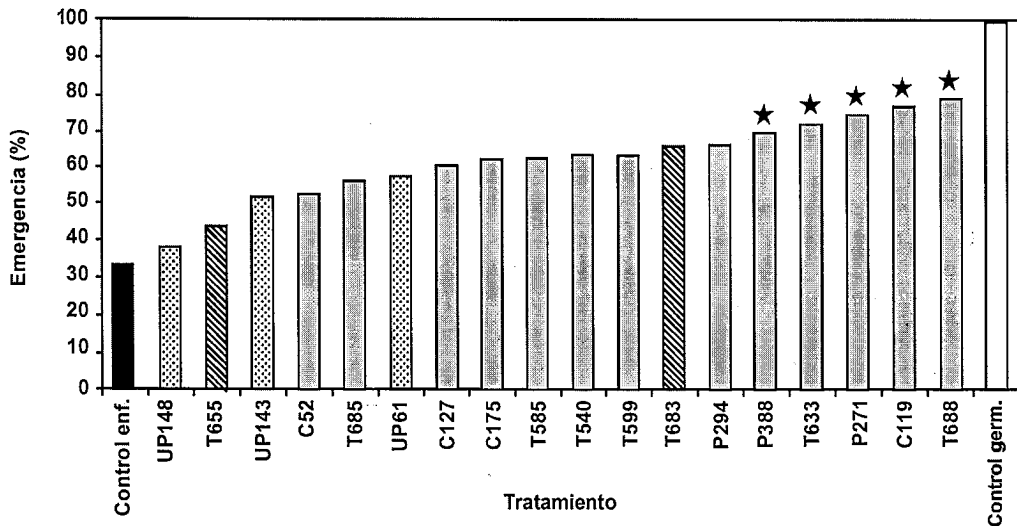


Figura 2. Efecto de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en la emergencia de alfalfa, en presencia de *P. debaryanum*. Número de plantas de alfalfa emergidas a los 15 días post-siembra, expresado en porcentaje. Barra blanca: control de germinación, sin inocular (Base 100=98.2 plantas/unidad exp.); barras grises: aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes nativas con mejor comportamiento; barras punteadas: cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de plantas de *Lotus corniculatus*; barras a rayas: testigos de alta (T683) y baja (T655) capacidad de protección; barra negra: control de enfermedad, inoculado sólo con *P. debaryanum*. Los aislamientos que produjeron un incremento significativo en el número de plantas emergidas respecto al control de enfermedad, se indican con un asterisco (LSD, $P \leq 0.05$).

Capacidad de promoción del crecimiento vegetal

Para las tres variables evaluadas (NP, PF y PS) la interacción tratamiento por experimento no fue significativa; por tanto, la repetición de los ensayos sumó robustez al análisis.

Ninguno de los tratamientos de *Pseudomonas* fluorescentes presentó efectos negativos sobre la implantación de la alfalfa, dado que no se observaron diferencias significativas con el control en cuanto al número de plantas emergidas al cabo de 35 días (Fig. 3A). La biomasa expresada como peso fresco o peso seco permitió caracterizar los aislamientos de *Pseudomonas* en cuanto a su capacidad de promoción del crecimiento. Si bien se observó escasa diversidad entre los aislamientos evaluados, tres aislamientos (T633, P271, P388) mostraron una capacidad promotora significativamente superior (biomasa expresada como peso fresco), cuando fueron comparados con el control sin bacterizar. Cuando se analizó la biomasa expresada como peso seco, el aislamiento P388 no se diferenció significativamente respecto al control, y sí lo hizo el aislamiento T688 (Fig. 3B y C).

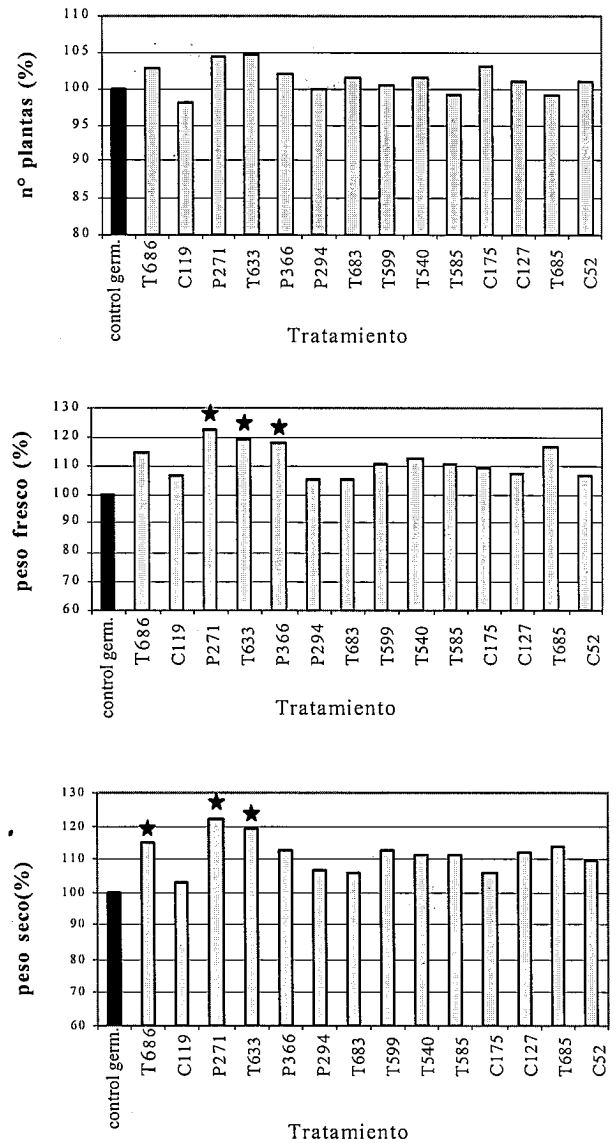


Figura 3. Efecto de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en la emergencia y el crecimiento de plantas de alfalfa, en ausencia del patógeno. **A:** número de plantas de alfalfa emergidas, expresado en porcentaje. En negro se indica el control de germinación, sin bacterizar (Base 100=93.6 plantas/unidad exp.). **B:** biomasa expresada como peso fresco de las plantas de alfalfa a los 35 días post-siembra. En negro se indica el control de germinación (Base 100=4.10g/unidad exp.) Los aislamientos que produjeron un incremento significativo en el peso fresco de la alfalfa se indican con un asterisco (LSD, $P \leq 0.05$). **C:** biomasa expresada como peso seco de las plantas de alfalfa a los 35 días post-siembra. En negro se indica el control de germinación (Base 100=0.34g/unidad exp.). Los aislamientos que produjeron un incremento significativo en el peso seco de la alfalfa se indican con un asterisco (LSD, $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

La metodología aplicada resultó adecuada para caracterizar aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes, en cuanto a su capacidad de protección de enfermedad y a su capacidad de promoción del crecimiento vegetal. Es eficiente en cuanto al uso de recursos, ya que permite trabajar con un alto número de aislamientos en un breve período de tiempo, y genera resultados reproducibles y confiables. El análisis estadístico de las variables evaluadas confirma que las mismas fueron discriminantes y que el diseño experimental aumentado propuesto por Wolfinger *et al.* (1997) es una herramienta correcta, si se basa en la selección de tratamientos testigos de comportamiento conocido.

Mediante los bioensayos en almácigas bajo condiciones de temperatura controlada (12° C) y humedad, se impone un crecimiento lento de las plantas que favorece la acción del patógeno, reproduciendo la situación de ocurrencia de enfermedad en el campo (Altier, 2000). En estas condiciones, es posible seleccionar aquellos aislamientos que presentan un efecto protector de enfermedad. De los 101 aislamientos evaluados, T633, P271, P388, T688 y C119 calificaron como promisorios para ser evaluados en ensayos de invernáculo, utilizando distintos tipos de suelos y posteriormente en ensayos de campo. Los cuatro primeros no sólo son capaces de proteger a las plantas de alfalfa del "damping-off", causado por *P. debaryanum*, sino que además promueven el crecimiento de las mismas.

Asimismo, la metodología permitió descartar una proporción importante de los aislamientos evaluados, que originalmente habían sido seleccionados por poseer características biocontroladoras en ensayos *in vitro*. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores, en cuanto indican que la experimentación *in vitro* resulta deficiente como método único para identificar antagonistas (Xiao *et al.*, 2002).

En la actualidad existe escaso conocimiento sobre los procesos microbianos que ocurren a nivel de la rizósfera, donde la población microbiana presenta una mayor densidad respecto al resto del suelo (Fabiano *et al.*, 1994). La metodología reportada en este trabajo ofrece una herramienta más para interpretar las interacciones que allí se llevan a cabo, las cuales pueden aportar importantes beneficios al sistema productivo agropecuario. Asimismo, puede aplicarse a otros sistemas planta-rizobacteria-patógeno, modificando las condiciones en cada caso, para evaluar las interacciones benéficas o perjudiciales que pueden darse entre los organismos participantes.

Este trabajo fue financiado por el Fondo "Profesor Clemente Estable", Proyecto No. 7132 "Caracterización de una colección de *Pseudomonas* fluorescentes para el control biológico de enfermedades de implantación en alfalfa".

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Sergio Ceretta (M.Sc.), por el apoyo brindado en el análisis estadístico y por su valioso aporte en la discusión de resultados. Al Lic. Bioq. (M.Sc.) Leonardo De La Fuente, por su contribución al conocimiento de la colección de *Pseudomonas fluorescentes* utilizada en este trabajo (Proyecto IFS No. C/2945-1 "Native fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents of alfalfa seedling diseases").

BIBLIOGRAFÍA

- ALTIER, N. 1996. Enfermedades de leguminosas forrajeras: diagnóstico, epidemiología y control. Montevideo, INIA. Serie Técnica No.74:87-104.
- ALTIER, N. 2000. Reconocimiento y manejo de enfermedades en alfalfa. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación No.69:125-143.
- ALTIER, N. & THIES, J.A. 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedlings diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Dis.* 79:341-346.
- BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F. & ARIAS, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biological agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30:1317-1322.
- COOK, C.C. & ZHANG, B.X. 1985. Degrees of sensitivity to metalaxyl withing the *Pythium* spp. pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 69:686-688.
- FABIANO, E.; GUALTIERI, G.; PRITCH, C.; POLLA, G. & ARIAS, A. 1994. Extent of a high affinity iron transport system in field isolates of rhizobia. *Plant and Soil* 164: 177-185.
- FEDERER, W.T. 1991. Statistics and society. Section 7.11. 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- FEDERER, W.T. & RAGHAVARAO, D. 1975. On augmented designs. *Biometrics* 31:29-35.
- FORMOSO, F. 2000. Manejo de la alfalfa para producción de forraje. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación No.69:53-74.
- GERHARDSON, B. & WRIGHT, S. 2002. Bacterial associations with plants: beneficial, non N-fixing interactions. En: K. Sivasithamparam *et al.* (eds.), *Microorganism in plant conservation and biodiversity*. pp. 79-103. Kluwer Academia Press, London.

- HANCOCK, J.G. 1996. Fungal and bacterial diseases of North American forage crops. En: S. Chakraborty *et al.* (eds.), Pasture and forage crop pathology. pp. 165-186. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- JONES, C.E.R. & SAMAC, D.A. 1996. Biological control of alfalfa diseases with a pathogen-suppressive *Streptomyces* strain. Biol. Control 7:196-204.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44:301-307.
- LARKIN, R.P.; ENGLISH, J.T. & MIHAIL, J.D. 1995. Identification, distribution and comparative pathogenicity of *Pythium* spp. associated with alfalfa seedlings. Soil Biol. Biochem. 27:357-364.
- LEATH, T.H.; WELTY R.; PRATT, R. & SONODA, R. 1996. Pasture/forage crops and diseases in the United States. En: S. Chakraborty *et al.* (eds.), Pasture and forage crop pathology. pp. 33-58. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- LOPER, J. E. 1988. Role of fluorescent siderophores production in biocontrol of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. Phytopathology 78:166-172.
- MARTIN, F.N. & LOPER, J.E. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology and prospects for biological control. Crit. Rev. Plant Sci. 18:111-181.
- PALLERONI, N.H. 1984. Pseudomonadaceae. En: N.R. Krieg y J.G. Holt. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. pp. 141-199. Williams and Wilkins, Baltimore.
- PÉREZ, C.; DE LA FUENTE, L.; ARIAS, A. & ALTIER, N. 2001. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. Agrociencia. Vol.V No.1:41-47.
- REBUFFO, M. 2000. Implantación. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación No.69:29-36.
- SANDERS, P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turfgrass in Pennsylvania. Plant Dis. 68:776-777.
- STUTEVILLE, D.L. & ERWIN, D.C. 1990. Compendium of alfalfa diseases. APS Press, St. Paul, MN.
- THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3499-3508.
- WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; McSPADDEN GARDENER, B.B. & THOMASHOW, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40:309-348.
- WOLFINGER R.D.; FEDERER, T. & CORDER-BRANA, O. 1997. Recovering information in augmented designs, using SAS PROC GLM and PROC MIXED. Agron. J. 89: 856-859.
- XIAO, K.; KINKEL, L.L. & SAMAC, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biol. Control 23:285-295.