

POBLACIONES DE *STREPTOMYCES* EN SUELOS CON CULTIVOS DE CEREALES Y LEGUMINOSAS. II – PROPIEDADES ANTAGONICAS SOBRE CEPAS DE *FUSARIUM* TOXICOGENICAS *

A. L. Borghi; C. J. Delgado y B. J. C. de Bracalenti

Centro de Referencias de Micología (CEREMIC). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U. N. de Rosario. Suipacha 531. 2000 Rosario. Santa Fe.

RESUMEN

Como una etapa preliminar de estudios sobre posibles recursos para control biológico de hongos toxicogénicos, se procuró determinar el grado de antagonismo entre cepas de *Streptomyces* y hongos del género *Fusarium*, de los cuales, para el presente trabajo, se utilizaron dos: *F. graminearum* NRRL 2830, productor de zearalenona, y *F. tricinctum* NRRL 3299, productor de toxina T-2. Las cepas de *Streptomyces* provenían de muestras de suelos que habían sido cultivados con cereales y/o leguminosas, con agregado, en la mitad de las parcelas, de fertilizante inorgánico.

La capacidad antagonica fue determinada por los métodos del estriado en placa y del agar-anillo. Sobre un total de 258 cepas aisladas, un 35 % mostraron propiedades antagonicas frente a *F. graminearum*, y sus efectos fueron clasificados como de inhibición completa (11 %), fuerte (6 %) o débil (17 %). Las 27 cepas correspondientes al máximo antagonismo fueron luego ensayadas frente a *F. tricinctum*, con los siguientes resultados: inhibición completa 44 %, fuerte 15 %, débil 4 % y nula 37 %. No se observó correlación alguna entre cantidad de inhibidores y tamaño o diversidad poblacional, parámetros que habían sido estimados en un trabajo previo.

De un cultivo especial de una de las cepas que presentaban inhibición completa para ambos hongos, se obtuvo un extracto líquido, a partir del cual se separaron cuatro fracciones: tres con solventes orgánicos y una con agua. El poder inhibitorio se mantuvo solamente en esta última —cuyos componentes activos aún no han sido identificados—, y fue similar para *F. graminearum* y *F. tricinctum*, pese a que este último había exhibido, en general, una mayor resistencia al antagonismo.

Palabras clave: poblaciones de *Streptomyces*, propiedades antagonicas, *Fusarium* toxicogénicos, control biológico.

STREPTOMYCES POPULATIONS FROM SOILS CULTIVATED WITH CEREALS AND LEGUMES: II ANTAGONIC PROPERTIES ON TOXICOGENIC *FUSARIUM*.

ABSTRACT

As a preliminary study on possible sources for a biological control of toxicogenic fungi, an attempt was made to determine the degree of antagonism between strains of *Streptomyces* and fungi of *Fusarium* genus: *F. graminearum* NRRL 2830 —producer of zearalenone, and *F. tricinctum* NRRL 3299 —producer of T-2 toxin. *Streptomyces* strains were taken from samples of soils cultivated with cereals and legumes with inorganic fertilizers in 50 % of the plots.

The stripe and agar-ring methods were used to determine the antagonistic capacity. On 258 isolated strains, 35 % showed antagonistic properties against *F. graminearum*, and their effects were classified as follows: complete inhibition (11 %), high inhibition (6 %), and low inhibition (17 %). The strains corresponding to the maximum antagonism were then tested against *F. tricinctum* with these results: complete inhibition 44 %, high inhibition 15 %, low inhibition 4 %, and no inhibition 37 %. No correlation was observed between quantity of inhibitors and population size or diversity; these parameters had been estimated in a previous study. A liquid extract was obtained from a special culture of one of the strains that showed complete inhibition for both fungi. Four fractions were separated from the liquid extract: three with organic solvents and one with water. The inhibitory power remained only in the aqueous fraction, whose active components are still unidentified, and it was similar for *F. graminearum* and *F. tricinctum* despite the fact that, in general, *F. tricinctum* had showed a greater resistance to antagonism.

Key words: *Streptomyces* populations, antagonistic properties, toxicogenic *Fusarium*, biological control.

* Trabajo subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

INTRODUCCION

El ciclo de vida de muchos hongos patógenos de plantas es tal que sus poblaciones son gobernadas por una continuidad de interacciones con varios componentes de la microflora, moderadas por el medio ambiente abiótico. Un organismo antagonista, si es acertadamente manipulado, podrá fácilmente reducir la incidencia de la enfermedad por un período de tiempo, pero no permitirá una suspensión sostenida durante años o, tal vez, durante más de una sola estación.

Se deberá usar, probablemente, una combinación de antagonistas para efectivamente inhibir un organismo durante diferentes fases de su ciclo de vida y cambiando sus condiciones ambientales, tales como el tipo de suelo y la temperatura.

Es altamente improbable que un mismo microorganismo sea antagonista a las diferentes estructuras morfológicas que están presentes en el ciclo de vida de un patógeno como *Fusarium*, por ejemplo (Schroth y Hancock, 1981), o que tal microorganismo pueda permanecer activo durante todos los cambios ambientales que conducen al crecimiento del patógeno (Borghi et al., 1988).

Cuando se efectúa un relevamiento para hallar los potenciales antagonistas, su eficacia no deberá estar basada solamente en la capacidad del organismo candidato para reducir los síntomas de la enfermedad de un patógeno mayor, sino también en su aptitud para proveer una respuesta en la capacidad de crecimiento de la planta. Por lo tanto, un antagonista puede controlar un número de enfermedades menores que pueden tener un considerable valor económico, pero puede fallar en su capacidad para inhibir un patógeno mayor.

El principal material para los estudios de control biológico de estos hongos está referido a un grupo de microorganismos, los actinomicetes. El género más importante en suelos es *Strepto-*

myces y su importancia deriva de su alto potencial metabólico y su capacidad comprobada como antagonista de hongos *in vitro*. (Stessel et al., 1953; Pridham, 1956; Gupta y Tandon, 1977).

Como una etapa preliminar de estudios sobre posibles alternativas de control biológico de hongos toxicogénicos y/o fitopatógenos, se trató de seleccionar cepas antagonistas capaces de producir sustancias inhibitorias que pueden llegar a afectar a la viabilidad y/o a la capacidad de diseminación de hongos del género *Fusarium*.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 258 aislamientos de *Streptomyces*, obtenidos de suelos provenientes de tres lotes (I, II y III), cada uno de ellos dividido en seis parcelas cultivadas con cereales (avena y trigo), leguminosas (vicia y lupino) o combinación de ambos (trigo + vicia y trigo + lupino) y un área testigo, de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Oliveros (Santa Fe). Las características del suelo, la incorporación de fertilizante y abono verde y el tratamiento estadístico se indican en la primera parte de este trabajo (Borghi et al., 1990).

Las muestras fueron tratadas según la técnica de Panthier et al. (1979), utilizando el medio de aislamiento preferencial para actinomicetes de Porter et al. (1960), modificado.

Los hongos empleados fueron *Fusarium graminearum* NRRL 2830, productor de zearaleno, y *Fusarium tricinctum* NRRL 3299, productor de toxina T-2.

Para evaluar los efectos antagonistas se utilizaron el método de estrías descripto por Johnson et al. (1960) y el método del agar-anillo de Williams y Willis (1962) con algunas modificaciones:

En el primer método, se sembraron en la superficie de una caja de Petri con medio de agar-

papa-dextrosa (APD), 0,1 ml de una suspensión de 10^6 conidias de *Fusarium*. Simultáneamente se sembraron los *Streptomyces* aislados, efectuándose estrías en la superficie del medio y colocando hasta 5 cepas por caja como máximo. Después de 5 días de incubación a 28°C se midió la zona de inhibición entre el límite de la colonia fúngica y la zona de estrías del *Streptomyces*.

En el método del agar-anillo, se coloca una lámina de papel de aluminio en el fondo de una caja de Petri (9 cm de diámetro). Luego se deposita sobre la lámina un anillo de aluminio (1 cm de altura por 7 cm de diámetro). Después de la esterilización, se vierte APD en el interior del anillo cubriendo hasta la mitad del mismo. Luego se siembra el antagonista en la superficie del medio y después de 48 horas de incubación a 28°C se retira el anillo y se invierte la lámina con el medio, quitándose la misma. Finalmente se siembran los hongos cortando discos de un cultivo desarrollado en APD durante 3 a 7 días y colocándolos en la superficie del agar. Los efectos inhibitorios observados fueron clasificados de acuerdo a las siguientes categorías: *Inhibición completa*: sin crecimiento del hongo estudiado después de 10 días de incubación. *Inhibición fuerte*: pocas hifas creciendo hasta 5 mm alrededor del disco de agar. *Inhibición débil*: ligero desarrollo de colonias, el grado de crecimiento considerablemente reducido; alrededor de 10 mm de diámetro en 10 días. *Sin inhibición*: el crecimiento de los hongos ensayados es similar al de los controles.

Para determinar los efectos del filtrado de los cultivos de *Streptomyces* sobre los hongos sometidos a ensayo se empleó el método descrito por Arjunarao (1971) con algunas modificaciones: las cepas antagonistas se hicieron crecer en un medio líquido (Gregory et al., 1952): 20 g de harina de soja, 20 g de glucosa, 5 g CaCO_3 , 100 ml líquido de macerado de maíz y 900 ml de agua destilada, a 28°C en un agitador mecánico durante 7 días, filtrándose por filtro Millipore de 0,22 μm .

Se prepararon placas de APD, y se sembraron en superficie suspensiones de 10^5 conidias de *Fusarium*, practicándose tres perforaciones con sacabocado estéril de 6 mm de diámetro, agregándose en ellas diluciones del filtrado 1:4, 1:10, y 1:15. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta que las colonias de control estuvieran completamente desarrolladas. Se midió el diámetro del halo de inhibición, tomándose promedios de por lo menos tres repeticiones. Los controles se efectuaron simultáneamente en el mismo medio.

RESULTADOS

Sobre 258 aislamientos estudiados, un 35 % mostraron propiedades antagonicas frente a *F. graminearum* y sus efectos fueron clasificados (Fig. 1) como de inhibición completa (IC) 11 %, inhibición fuerte (IF) 6 %, inhibición débil (ID) 17 % y sin inhibición (SI) 66 %.

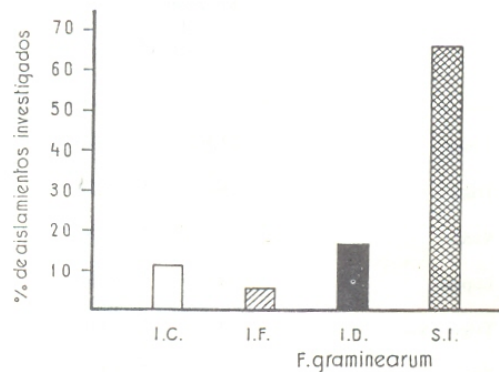


Fig. 1. Inhibición de *F. graminearum* por 258 aislamientos de *Streptomyces* seleccionados; porcentaje de distribución de los aislamientos sobre la base de su actividad inhibitoria.

Los 27 aislamientos que exhibieron máximo antagonismo fueron después ensayados frente a *F. tricinctum* con el siguiente resultado: (IC) 44 %, (IF) 15 %, (ID) 4 %. Los restantes (37 %) no presentaron inhibición (Fig. 2).

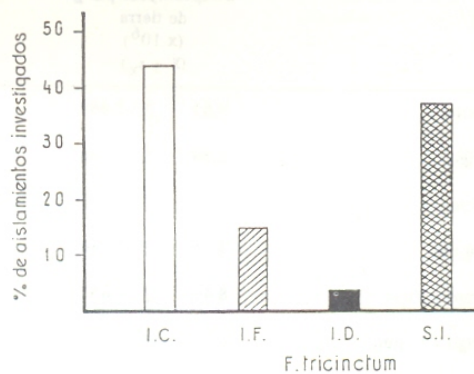


Fig. 2. Inhibición de *F. tricinctum* por 27 aislamientos que exhibieron (IC) frente a *F. graminearum*; porcentaje de distribución de los aislamientos.

En los estudios efectuados usando el método del agar-anillo, con los 27 aislamientos que exhibieron máximo antagonismo frente a *F. graminearum* se repitieron los mismos resultados que

con el método de estrías, probablemente debido a los metabolitos difundidos por los *Streptomyces* aislados.

Tabla 1. Aislamientos de inhibidores "IC" e "IF" para suelo sin fertilizante.

Siembra	Nº de colonias de <i>Streptomyces</i> por g de tierra ($\times 10^6$) ($\bar{x} \pm s_x$)	Nº total de aislamientos	Nº inhibidores (IC-IF) frente a <i>F. graminearum</i>	Nº inhibidores (IC-IF) frente a <i>F. tricinatum</i>
Avena	22,60 \pm 3,429	22	5	5
Trigo	18,60 \pm 0,014	12	3	0
Vicia	21,59 \pm 12,204	13	1	1
Lupino	12,17 \pm 3,790	22	0	0
Trigo + Vicia	14,69 \pm 0,600	20	7	1
Trigo + Lupino	7,56 \pm 4,624	26	5	3
S/sembrar (testigo)	11,87 \pm 0,548	17	2	1
Media	15,58 \pm 5,553	18,85	3,29	1,14

Tabla 2. Aislamientos de inhibidores "IC" e "IF" para suelo con fertilizante.

Siembra	Nº de colonias de <i>Streptomyces</i> por g de tierra ($\times 10^6$) ($\bar{x} \pm s_x$)	Nº total de aislamientos	Nº inhibidores (IC-IF) frente a <i>F. graminearum</i>	Nº inhibidores (IC-IF) frente a <i>F. tricinatum</i>
Avena	9,61 \pm 7,469	33	1	1
Trigo	2,86 \pm 2,988	16	1	1
Vicia	16,43 \pm 6,913	8	2	0
Lupino	3,11 \pm 1,746	23	7	2
Trigo + Vicia	8,41 \pm 7,657	16	2	1
Trigo + Lypino	8,70 \pm 8,777	15	4	2
S/sembrar (testigo)	3,73 \pm 1,803	15	3	1
Media	7,55 \pm 4,856	18	2,86	1,14

De la observación de las Tablas 1 y 2 se desprende que no existe correlación entre el número de inhibidores frente a cualquiera de los dos hongos y los números de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC. g⁻¹), como tampoco con el número total de aislamientos. Con respecto a las muestras testigo, tanto con fertilizante como sin él, las distintas siembras exhibieron números de inhibidores mayores, iguales o menores.

Uno de los aislamientos, el C/33-6, que presentaba inhibición completa frente a ambos hongos, fue cultivado en el medio de Gregory, y con el filtrado del cultivo se efectuaron diluciones en APD, obteniéndose los siguientes resultados:

a) con la dilución 1:4 y 1:10 tanto *F. graminearum* como *F. tricinatum* fueron inhibidos y no se detectó el desarrollo de ninguna colonia.

b) en presencia de una dilución 1:15 las colonias crecieron lentamente.

Con el mismo filtrado se obtuvieron cuatro fracciones: A, B, C y D. La fracción A se obtuvo por fraccionamiento con acetato de etilo con un rendimiento de 7 mg, la B con diclorometano: 11 mg, la C con n-butanol saturado con agua: 7 mg. La fracción D, soluble en agua, produjo 220 mg. Esta última fue ensayada retomando el extracto con 45 ml de agua destilada y colocando en cada hoyo 0,2 ml de la dilución (aproximadamente 1 mg del extracto). Después de 7 días de cultivo a 28° C se obtuvieron zonas de inhibición de 25 mm de diámetro promedio. Esta fracción acuosa se mantuvo por congelamiento a -35° C durante 6 meses; cuando se efectuaron controles posteriores, se observó que mantenía intacto su poder inhibitorio original.

Las fracciones A, B y C fueron disueltas en 5 ml de acetona cada una, embebiéndose discos de papel de filtro con concentraciones similares de cada extracto por disco. Se colocaron luego, simultáneamente, en la superficie de un cultivo sembrado en APD con 10⁵ conidias de una suspensión de *F. graminearum*. Después de 7 días de cultivo a 28° C, no se comprobó ningún efecto inhibitorio con las fracciones A, B y C, comparando con testigos sembrados simultáneamente.

DISCUSION

Extractos de suelos no estériles son frecuentemente fungistáticos debido a la presencia de sustancias químicas inhibitorias solubles en agua. Esta acción es atribuida a antibiosis. Eventualmente,

estos metabolitos se tornan nocivos, inhibiendo la germinación de los esporos fúngicos y causando cambios morfológicos en las hifas (Park, 1961).

Se ha demostrado que se puede controlar el marchitamiento del algodón producido por *Fusarium vasinfectorum* con Actinomycetes antagonistas (Arjunarao, op. cit.) y también controlar enfermedades de las raíces, causadas por varios hongos, infectando el suelo con dichos Actinomycetes. La población de una cepa fitopatógena de *Fusarium oxysporum* declinó rápidamente luego del agregado de un gran inóculo del hongo en suelo no esterilizado (Stover, 1954). Se ha comprobado una notoria incapacidad de ciertos hongos para competir en suelos recolonizados por los antagonistas (Schroth y Hancock, op. cit.).

Se comprobó, con los métodos utilizados, de acuerdo a los porcentajes de inhibición para 258 aislamientos de *Streptomyces*, que el *F. tricinatum* exhibiría una mayor resistencia al antagonismo que *F. graminearum*. Ambos métodos cuantitativos empleados para determinar el grado de antagonismo fueron coincidentes en sus resultados, y se obtuvo un alto grado de actividad antagonista *in vitro* con varios cultivos de *Streptomyces*. Su posterior comprobación *in vitro* se efectuó como parte de otro trabajo realizado en nuestro laboratorio (Fulgueira et al., 1989).

Una de las cepas antagonistas seleccionadas, la C/33-6, produce filtrados antibióticamente activos de los cultivos en el medio líquido indicado por Gregory et al. (op. cit.), y demostró un alto grado de antagonismo contra los hongos estudiados. Los metabolitos de los *Streptomyces* antagonistas serían responsables de la inhibición de la germinación de las conidias de los hongos *F. tricinatum* y *F. graminearum* (Borghi et al., op. cit.; Turhan, 1981). La investigación por medio del fraccionamiento de un extracto de un cultivo con fuerte poder inhibitorio nos permitió comprobar que en la fracción soluble en agua se conservó el factor inhibitorio, y no ocurrió lo mismo con las fracciones obtenidas con solventes orgánicos.

Tanto la falta de correlación observada entre número de inhibidores y número de UFC. g⁻¹ o de aislamientos, como el hecho de que las cantidades de inhibidores superaron, igualaron o incluso estuvieron por debajo de las correspondientes a las muestras testigo, impiden elaborar formulaciones muy concluyentes. No obstante, podemos destacar que sin fertilizante, la mayor cantidad de inhibidores correspondió a las dos siembras combinadas en conjunto (trigo + vicia y trigo + lupino), con 12 para *F. graminearum* y 4 para *F. tricinatum*, y en cambio con fertilizante la mayor

cantidad se obtuvo con las leguminosas en conjunto (vicia y lupino), que presentaron 9 para *F. graminearum* y 2 para *F. tricinctum*. También se observó que, para cada tratamiento en particular, el número de inhibidores completos y fuertes (IC + IF) para *F. tricinctum* puede guardar una cierta proporción con el de inhibidores frente a *F. graminearum*.

Hay evidencias de que la aparición de antibióticos específicos se produce en partes de sustratos naturales con una relativamente alta concentración de nutrientes. La producción de inhibidores puede favorecer al microorganismo productor en su competición con otros, en los sitios donde está ocurriendo la colonización activa (Griffin, 1972).

CONCLUSIONES

En 258 aislamientos de *Streptomyces* de sue-

los de la provincia de Santa Fe, se encontró un grupo que demostró poseer capacidad inhibitoria frente a dos cepas de *Fusarium* productoras de toxinas en cereales. De aquellas cepas con fuerte capacidad inhibitoria se seleccionó la C/33-6 que demostró capacidad para ser usada en el control biológico de *F. tricinctum* y *F. graminearum*, ya sea por inoculación de semillas o en el tratamiento de los suelos proporcionando protección. De acuerdo a lo observado, el aumento en el número de inhibidores podría tener una relación con la mayor cantidad de microorganismos desarrollados en los suelos donde la concentración de nutrientes fue la más adecuada.

El éxito del control de *Fusarium* con agentes biológicos dependerá de las prácticas de producción, la biología de estos hongos toxicogénicos y los métodos usados para la selección y aplicación de los antagonistas.

REFERENCIAS

- Arjunarao, V., 1971. Biological control of cotton wilt II. "In vitro" effects of antagonists on the pathogen *Fusarium vasinfectum* ATK. Proc. Indian Acad. Sci. 74: 16-28.
- Borghi, A.; C. L. Fulgueira y B. J. C. de Bracalenti, 1988. Inhibición de *Fusarium graminearum* NRRL 2830 por una cepa de *Streptomyces* sp. Bol. Micológico 4: 237-242.
- Borghi, A.; C. J. Delgado y B. J. C. de Bracalenti, 1990. Poblaciones de *Streptomyces* en suelos con cultivos de cereales y leguminosas. I. Variaciones por diversos tratamientos. C. del Suelo, 8: 167-173.
- Fulgueira, C.; A. L. Borghi y B. J. C. de Bracalenti, 1989. Efectos de las interacciones entre *Streptomyces* y hongos toxicogénicos sobre semillas de trigo. En IV C. Arg. de Micología y XIV Jornadas Arg. de Micología. Huerta Grande, Octubre 1989. (Resúmenes) 81 p.
- Gregory, D.; D. Allen; A. Riker y W. Petersen, 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. Am. J. Bot. 39: 405-451.
- Griffin, D. M., 1972. Ecology of Soil Fungi. Syracuse University Press, Syracuse, 191 p.
- Gupta, R. C. y R. N. Tandon, 1977. Growth inhibition of fungi by volatiles from *Streptomyces*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 68: 438-439.
- Johnson, L. F.; E. A. Curl; J. H. Bond y H. A. Fribourg, 1960. Methods for studying soil microflora-plant disease relationships, 2^o ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis. 310 p.
- Panthier, J. J.; H. G. Diem y Y. Y. Dommergues, 1979. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic toward rhizobia. Soil. Biol. Biochem., 2: 443-445.
- Park, D., 1961. Morphogenesis, fungistasis and cultural staling in *Fusarium oxysporum*. Snyder and Hansen. Transactions of the British Mycological Society 44: 377-390.
- Pridham, T. G. y L. A. Lindenfesler, 1956. Antibiotics against plant diseases I. Laboratory and greenhouse survey. Phytopathology, 46: 568-575.
- Porter, J. N.; J. J. Wilhem y H. D. Tresner, 1960. Method for preferential isolation of actinomycetes from soil. Applied Microbiology, 8: 174-178.
- Schroth, M. y J. J. Jancocck, 1981. Selected topics in Biological Control. Ann. Rev. Microbiol., 35: 453-76.
- Stessel, G. J.; C. Leben y G. W. Keit, 1953. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. Mycologia, 45: 325-334.
- Stover, R. H., 1954. Flood-fallowing for eradication of *Fusarium oxysporum* f. cubense. II Some factors involved in fungus survival. Soil Sci. 77: 401-404.
- Turhan, G., 1981. A new race of *Streptomyces ochraceicleroticus* in the biological control of some soil-borne plants pathogens. I. Effects of the isolate C/2-9 on some of the most important soil-borne in fungi in vitro. Journal of Plant Diseases and Protection, 88: 373-381.
- Williams, L. E. y G. N. Willis, 1962. Agar ring method for in vitro studies of fungistatic activity. Phytopathology, 52: 368-369.