

Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico

Characterization of rhizobacteria associated to maize crop in IAA, siderophores and salicylic acid metabolite production

Annia Hernández*, Narovis Rives**,
Alberto Caballero***, Ana N. Hernández****, Mayra Heydrich*

RESUMEN

Se ha demostrado que las rizobacterias tienen la capacidad de producir metabolitos de interés agrícola, entre los que se destacan el ácido salicílico, los sideróforos y las fitohormonas; dentro de estas últimas, el ácido Indol acético (AIA) es la auxina más conocida y estudiada, la cual desempeña un papel rector en el crecimiento de los cultivos. Esta investigación se realizó con el objetivo de caracterizar rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en cuanto a la producción de AIA, sideróforos y ácido salicílico. Para ello se empleó un conjunto de cepas de *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* previamente aisladas de la rizosfera del maíz variedad Francisco mejorado. Se utilizaron técnicas colorimétricas y cromatográficas para la detección de los metabolitos estudiados, y análisis multivariado de conglomerado jerárquico y ligamiento completo para la selección de las mejores cepas con respecto a la producción de los metabolitos de interés. Los resultados demostraron que la mayoría de las cepas estudiadas produce metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico, destacándose de forma integral las cepas de *Burkholderia cepacia* MBf21, MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 y *Pseudomonas fluorescens* MPp4, por las mayores producciones de los metabolitos en estudio, lo que evidencia que estas cepas pueden ser utilizadas en la promoción del crecimiento vegetal en cultivos de importancia económica.

Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, AIA, sideróforos, ácido salicílico.

ABSTRACT

It has been demonstrated that rhizobacteria are able to produce metabolites having agricultural interest, including salicylic acid, the siderophores and phytohormones. Indol acetic acid (IAA) is the most well-known and studied auxin, playing a governing role in culture growth. The object of this work was to characterise rhizobacteria associated with the maize crop in terms of producing IAA, siderophores and salicylic acid metabolites. *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* strains previously isolated from maize Francisco variety rhizosphere were used. Colorimetric and chromatographic techniques for detecting these metabolites were studied; multi-variable analysis of hierarchic conglomerate and complete ligament were used for selecting the best strains for producing metabolites of interest. These results demonstrated that all rhizobacteria strains studied produced IAA, siderophores and salicylic acid metabolites. *Burkholderia cepacia* MBf21, MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 and *Pseudomonas fluorescens* MPp4 strains have presented the greatest production of these metabolites, showing that these strains could be used in promoting vegetal growth in economically important cultures.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, IAA, siderophore, salicylic acid.

INTRODUCCIÓN

El uso desmedido de fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos ha provocado graves consecuencias ambientales, por lo que se ha prestado especial atención al estudio de los microorganismos asociados a

las raíces de las plantas y a sus beneficios para la agricultura (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) se encuentran entre los principales grupos microbianos estudiados, destacándose por sus

* Doctores en ciencias biológicas, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba. Correo electrónico: annia@fbio.uh.cu

** Microbióloga, Instituto de Investigaciones del Arroz, La Habana, Cuba.

*** Doctor en ciencias agrícolas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba.

**** Maestro en ciencias en microbiología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Morelos. México.

Recibido: enero 30 de 2004. **Aceptado:** mayo 14 de 2004.

efectos beneficiosos tanto para las plantas como para los ecosistemas (Hernández *et al.*, 2003). En este sentido, se ha demostrado la presencia abundante de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Streptomyces* en diferentes condiciones y localidades edafoclimáticas, así como su asociación con las gramíneas (Hebbar *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2000; Rives *et al.*, 2003).

Pseudomonas fluorescens y *Burkholderia cepacia* se destacan por su alta frecuencia de aparición en la rizosfera. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta (González *et al.*, 2000), la producción de reguladores del crecimiento vegetal (De Salmone *et al.*, 2001) y el control biológico de patógenos, dado fundamentalmente por la producción de sideróforos (Alexander y Zuberer, 1991; Barelman *et al.*, 1996), la antibiosis (Picard *et al.*, 2000) y la inducción de resistencia a la planta (Nandakumar *et al.*, 2001).

Diversos autores han demostrado la producción de fitohormonas por rizobacterias (Dibut, 2000). Dentro de ellas el Ácido Indol Acético (AIA) es la auxina más conocida y estudiada, desempeñando un papel rector en el crecimiento de los cultivos (Hernández, 1998).

Los sideróforos son pigmentos extracelulares, fluorescentes o no, de bajo peso molecular (500-1000 Da) y solubles en soluciones acuosas a pH neutros (Dybas *et al.*, 1995). Su modo de acción se relaciona con el secuestro de hierro, convirtiendo este elemento en un factor limitante en la rizosfera. También se ha demostrado su papel en la inducción de resistencia en diferentes sistemas planta-patógeno (Maurhofer *et al.*, 1994; Ardon *et al.*, 1998).

El ácido salicílico (AS) es otro metabolito cuyo papel fundamental está relacionado con la inducción de resistencia sistémica (ISR). Se ha demostrado que cepas que pierden la capacidad de producir AS, también pierden su capacidad de inducir resistencia en plantas (De Meyer y Hofte, 1997).

En este sentido, obtener cepas con la capacidad de producir estos metabolitos es un aspecto de interés dentro de la biotecnología agrícola en Cuba, pues de este modo podrán ser utilizados para la obtención de inoculantes microbianos con la seguridad de obtener resultados benéficos en plantas, que se manifiesten de forma permanente durante el ciclo de desarrollo del cultivo.

Este trabajo tiene como objetivos caracterizar rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en cuanto a la producción de AIA, sideróforos y ácido salicílico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos microbianos

Para la realización de este trabajo se utilizó un conjunto de cepas previamente aisladas de la rizosfera del maíz y cepas patrones y de referencia procedentes del Cepario Nacional de Biofertilizantes de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana y de la Colección de Cultivos de la Universidad de Gent en Bélgica (tabla 1).

Tabla 1. Cultivos microbianos utilizados.

Código	Identificación	Procedencia
MBp1, MBp2, MBp3, MBp4, MBp5, MBp6, MBp7, MBp8, MBp9, MBp10, MBp14, MBp15 MBf4, MBf5, MBf6, MBf7, MBf8, MBf9, MBf10, MBf11, MBf12, MBf13, MBf15, MBf16, MBf18, MBf19, MBf20, MBf21, MBf22	<i>Burkholderia cepacia</i>	Cepario de Rizobacterias del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.
MPp4, MPp11, MBp12, MPp13, MPp18, MBp19, MBp20, MPf1, MPf14, MPf17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cepario de Rizobacterias del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.
0057	<i>Burkholderia cepacia</i>	Cepario Nacional de Biofertilizantes, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
J-143	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cepario Nacional de Biofertilizantes, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
7 NSK ₂ , 7NSK ₂ -562, KMPCH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colección de Cultivos de la Universidad de Gent, Bélgica.

Producción de fitohormonas del tipo AIA (Ácido 3 indol acético)

Se utilizó el medio líquido descrito por Grapelli y Rossi (1981). Como inductor se empleó el DL-Triptófano en una concentración de 0,1 g/L (Tien *et al.*, 1979). Los cultivos bacterianos fueron cultivados en zaranda a 150 rpm y 30 °C durante 48 horas, posteriormente se centrifugaron 15 000 rpm durante 20 minutos. Se tomaron 5 mL de los caldos libres de células para la extracción de auxinas según metodología descrita por Tien *et al.* (1979). Para la cuantificación se utilizó el reactivo de Salkowski (Send y Leopold, 1954). La concentración se calculó utilizando una curva patrón con diferentes concentraciones de AIA preparado a partir de 1mg/mL de AIA sintético en metanol.

Producción de sideróforos

Para la determinación cuantitativa de sideróforos se utilizó el medio Caldo Casimino Ácido (CAS) (5g de ácido casimino, 1g de K_2HPO_4 , 5g de hierro y 0.25 g de $MgSO_4$ por litro), los cultivos fueron incubados durante 48 horas a 200 rpm y 30 °C. Se determinó la absorbancia a 595 nm (concentración celular) y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células. En el sobrenadante se determinó la absorbancia a 405 nm en espectrofotómetro. La concentración fue expresada en μM de sideróforos por 10^8 UFC/mL de bacteria (De Meyer, 1999), correspondiente a una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland (Rodríguez, 2003).

Producción de ácido salicílico

Se inocularon erlenmeyers que contenían 25 mL de Caldo Casimino Ácido (CAS) con 100 μL de los cultivos, y se incubaron durante 48 horas a 200 rpm y 30 °C. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células. La extracción y cuantificación de ácido salicílico se realizó según metodología descrita por Buysens *et al.* (1996). Se realizó una curva patrón en salicilato de sodio en concentraciones de 0.5-5 mg/mL en metanol. Para el análisis cualitativo se aplicaron 10 μL de cada muestra de las cepas seleccionadas a placas de cromatografía con Sílica Gel G. Como sistema de solventes se utilizó cloroformo-ácido acético-etanol en una relación 90-5-2.5.

Análisis biométricos

Para el estudio de la producción de cada uno de los metabolitos por las diferentes cepas se realizó un análisis de varianza de clasificación simple según un diseño aleatorio, y las medias se compararon a través de la prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

La selección de las mejores cepas se realizó a través de un análisis multivariado de conglomerado jerárquico y ligamiento completo mediante el procesador estadístico "STADISTIC" versión 5.0. Se creó un patrón positivo (concentraciones óptimas de metabolitos) y un patrón negativo (bajas concentraciones de metabolitos) para comparar las cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de AIA

Dentro de los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestar su acción se destacan la producción de compuestos indólicos, atribuyéndose a los mismos incrementos en el desarrollo y rendimiento de diversas especies de plantas.

De acuerdo con las determinaciones realizadas, las cepas estudiadas producen entre 5.30 y 21.53 $\mu g/mL$ de AIA. Los mayores niveles en la producción de esta auxina se obtienen con las cepas de *Burkholderia cepacia* 0057, MBf20, MBf21, MBp1, MBp2, MBp3 y de *Pseudomonas fluorescens* MPf17, destacándose las cepas 0057 y MBf21 por los mayores incrementos (tabla 2). Las concentraciones obtenidas en las cepas promisorias pueden ser suficientes para tener una influencia directa en el crecimiento vegetal, si se tiene en cuenta que los reguladores del crecimiento vegetal actúan en pequeñas concentraciones sobre el crecimiento de las plantas.

Resultados similares fueron obtenidos por Hernández (1994) quien demostró que cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia cepacia* producen diversas hormonas vegetales cuando se cultivan en medios líquidos. Una de las principales es el AIA, demostrando que las cepas más activas en cuanto a la producción de esta auxina producían entre 5 y 20.6 $\mu g/mL$ de AIA. Sin embargo, cuando se comparan los resultados obtenidos con los informados por diversos autores al es-

tudiar la producción de AIA por otras bacterias de la rizosfera, entre las cuales se encuentran cepas del género *Azospirillum* y *Rhizobium* (Pazos *et al.*, 2000;

Rojas y Pérez, 1998), se observa que los niveles producidos por las cepas de *Pseudomonas* y *Burkholderia* son bajos.

Tabla 2. Producción de AIA, sideróforos y ácido salicílico por las cepas en estudio.

Cepas	AIA (µg/mL)	Sideróforos (µM)	Ácido Salicílico (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KMPCH	-	4.48 op	51.00 f
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2-562	-	40.30 a	ND
<i>Burkholderia cepacia</i> 0057	20.10 ab	11.68 i	53.50 e
<i>Pseudomonas fluorescens</i> J-143	14.60 f	31.55 d	7.20 mn
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPf1	5.90 lmnop	34.00 c	3.50 g
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf4	6.67 jklmno	7.30 jklm	7.00 mn
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf5	8.27 hijk	9.43	32.60 g
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf6	5.23 nopp	9.16 j	ND
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf7	4.53 op	5.23 mno	ND
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf8	4.97 nop	6.20 klmno	5.30 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf9	5.50 lmnop	5.57 mno	ND
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf10	7.30 lmnop	5.53 mno	4.90 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf11	6.33 klmnop	5.03 nop	3.30 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf12	4.33 p	3.20 p	4.10 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf13	5.30 mnop	5.83 lmno	ND
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPf14	7.47 hojkl	39.40 a	3.80 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf15	5.93 lmnop	18.13 f	66.10 ab
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf16	5.70 lmnop	17.20 fgh	6.90 mn
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPf17	18.07 cd	30.03 d	5.80 no
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf18	5.93 lmnop	15.97 gh	4.30 nop
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf19	7.50 hijkl	3.10 p	ND
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf20	9.37 gh	15.47 gh	61.50 cd
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf21	21.53 a	8.03 jk	68.70 a
<i>Burkholderia cepacia</i> MBf22	13.80 g	17.47 fg	61.50 cd
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp1	19.07 bc	18.13 f	67.30 a
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp2	17.77 cd	17.37 fg	63.50 bc
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp3	16.50 de	15.20 h	59.90 de
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp4	15.63 ef	27.47 e	35.00 g
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp5	9.13 ghi	7.77 jkl	21.20 h
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp6	8.67 ghij	8.03 jk	13.10 jk
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp7	9.23 gh	7.30 jklm	17.50 i
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp9	7.37 hijklmn	6.43 klmno	11.70 kl
<i>Burkholderia cepacia</i> MBp10	7.07 ijklmn	6.73 klmn	16.50 i
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp11	8.47 ghij	31.00 d	15.20 ij
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp12	9.00 ghi	27.30 e	7.00 mn
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp13	8.13 hijk	27.50 e	14.90 ijk
<i>Burkholderia cepacia</i> MPp14	9.17 ghi	7.33 jklm	13.00 jk
<i>Burkholderia cepacia</i> MPp15	4.77 op	6.47 klmno	5.90 no
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp18	7.57 hijkl	37.07 b	12.03 jkl
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp19	5.70 lmnop	28.17 e	9.60 lm
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MPp20	8.83 ghi	38.53 ab	15.40 ij
Esx	0.63	0.65	1.03
CV (%)	7.76	6.96	7.99

ND- Valores por debajo del límite de detección de 3 (µg/mL) de ácido salicílico en el cultivo.
Medias con letras iguales no difieren significativamente para p<0.05.

Velázquez *et al.* (1999) y Hernández (1996) encontraron que la cepa de *B. cepacia* 0057 producía 20.1 µg/mL de AIA. Los autores informaron resultados positivos al inocular plantas de maíz con esta cepa, logrando incrementos en el crecimiento y rendimiento del cultivo, lo que corrobora que la concentración de AIA producida fue adecuada para ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas.

Yahalom (1991) demostró que el efecto de esta hormona sobre las raíces depende de su concentración, encontrando que concentraciones de 10⁻⁸M estimularon el alargamiento radical, mientras que concentraciones mayores a 10⁻⁶M lo inhibieron y redujeron la longitud de la zona de alargamiento. Por otro lado, Strelzelczyk *et al.* (1994) plantearon que las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno atmosférico y estimular el crecimiento de las bacterias en la rizosfera.

Producción de sideróforos

La producción de sideróforos por cepas de rizobacterias pertenecientes a diferentes grupos microbianos y su papel en el biocontrol de enfermedades de plantas ha sido informada por varios autores. En este trabajo se demuestra que todas las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* aisladas de la rizosfera del maíz y utilizadas en este estudio tienen la capacidad de producir sideróforos bajo condiciones limitantes de hierro (tabla 2).

De modo general, los mayores niveles de producción de este metabolito se obtienen en las cepas

de *Pseudomonas fluorescens* MPf1, MPf14, MPf17, MPp4, MPp11, MPp18 y MPp20, destacándose las cepas MPf14 y MPp20 por las mayores producciones. Los resultados corroboraron que la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-143 produce sideróforos ($31.55\mu\text{M}$), coincidiendo con lo informado por Hernández *et al.* (1999) quien demostró que la misma produce un solo tipo de estos metabolitos, el cual en Silica Gel G aparece como una mancha verde carmelitosa fluorescente.

La cepa 7NSK2-562 –mutante en la producción de ácido salicílico y pioquelín– también presentó altos niveles en la producción de estos metabolitos, sin diferencias significativas con las cepas promisorias para $p < 0.05$, lo que demuestra que los sideróforos producidos por las cepas de *P. fluorescens* en estudio son pioverdines. Estos resultados se corroboran al tener en cuenta que la cepa KMPCH, mutante en la producción de pioverdines y productora de ácido salicílico y pioquelín (De Meyer, 1999), produjo valores medios de sideróforos.

En los últimos años se han planteado criterios divergentes acerca del papel de los pioverdines en el control biológico de patógenos que habitan en la rizosfera. Hamdam *et al.* (1991), trabajando con cepas mutadas en cuanto a la producción de diferentes tipos de sideróforos, encontraron que los mutantes deficientes en la producción de pioverdines controlaban enfermedades fúngicas en el trigo de la misma manera que las cepas parentales. Por otro lado, Buysens *et al.* (1996) demostraron la efectividad de este tipo de sideróforos en el control de enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* y *Pythium sp.*

Asimismo, se ha demostrado que *P. fluorescens* cepa CHAO produce pioverdines y AS e induce resistencia en tabaco contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV). La cepa CHA 400, un mutante en cuanto a producción de pioverdines de la cepa CHAO, sólo indujo resistencia parcial contra el TNV, demostrándose que estos metabolitos estaban implicados en la inducción de resistencia contra este virus (Maurhofer *et al.*, 1994).

Las cepas de *B. cepacia* produjeron niveles medios y bajos de este metabolito, si se comparan con la cepa de referencia de *B. cepacia* 0057 utilizada en este estudio. Se destacan por los mayores valores las cepas MBf15, MBf16, MBf18, MBf20, MBf22, MBp1, MBp2 y MBp3. Velázquez *et al.* (1999)

demonstraron que en condiciones limitantes de hierro la cepa de *B. cepacia* 0057 produce dos tipos de sideróforos del tipo hidroxomato que se diferencian fundamentalmente en el tamaño y la composición de la cadena polipeptídica que se encuentra unida al cromóforo fluorescente.

Diversos estudios han demostrado que *Burkholderia cepacia* produce diferentes tipos de sideróforos. En este sentido, Meyer *et al.* (1995) plantearon que las cepas ATCC 25416 y ATCC 17759 producían pioquelín, cepabactin y ornibactin. Barelman *et al.* (1996) encontraron que la cepa PHP7 producía ornibactin y cepaciaquelín, un sideróforo de tipo hidroxomato y otro catecol, constituyendo éste el primer caso informado de miembros de este grupo con la capacidad de producir ambos sideróforos. Es importante señalar que el análisis de los tipos de sideróforos producidos por las cepas puede ser una vía para discriminar entre las especies *B. cepacia* y *B. vietnamiensis*, ya que esta última sólo tiene la capacidad de producir ornibactin.

Hasta el momento la mayor cantidad de reportes de aplicación de sideróforos para combatir enfermedades que afectan a cultivos de interés económico ha estado relacionada con productos obtenidos a partir de *Pseudomonas* fluorescentes. Sin embargo, varios autores han demostrado la efectividad de cepas de *Burkholderia cepacia* en el biocontrol, cuestión que podría estar relacionada con los diferentes tipos de sideróforos que esta especie produce. Resultados obtenidos por Miranda *et al.* (2000) con diferentes cepas de *Burkholderia cepacia* para el biocontrol de *Phytophthora infestans* en el cultivo de la papa demuestran mayores porcentaje de inhibición en medios con condiciones limitantes de hierro que en medios donde se añade FeCl_3 al medio de cultivo, lo que demuestra el papel rector de los sideróforos en este sistema.

Hebbar *et al.* (1998) lograron suprimir los síntomas provocados por el ataque de los hongos fitopatógenos *Phytium* y *Fusarium sp.* al cultivo del maíz mediante la aplicación de la cepa de *Burkholderia cepacia* PHQM, planteando que en este efecto pudieron estar involucrados diferentes mecanismos de acción, entre los cuales se señalan la producción de sideróforos y la inducción de resistencia en la planta.

Finalmente, teniendo en cuenta todo lo planteado, se puede señalar que por el importante papel que

desempeñan los sideróforos en el control de patógenos de plantas, la búsqueda de nuevas cepas productoras y medios donde la producción de los mismos sea óptima, resulta de gran interés.

Producción de ácido salicílico (AS)

Diversos autores han señalado el papel que desempeña el ácido salicílico en la inducción de resistencias en las plantas contra el ataque de diferentes patógenos, constituyendo uno de los principales determinantes involucrados en la inducción de resistencia sistémica (ISR) por rizobacterias (Van Loon *et al.*, 1998; Maurhofer *et al.*, 1998; Grill y Himmelbanch, 1998).

La producción de AS *in vitro* por las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* (controles) fue analizada cuantitativamente por espectrofotómetro mediante la detección del complejo púrpura formado por la unión del hierro y el AS (tabla 2). Los resultados demostraron diferentes niveles en la producción de AS para las cepas estudiadas con diferencias significativas entre ellas para un $p < 0.05$. La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* KMPCH, utilizada como control positivo, mostró niveles altos de producción de este metabolito, lo que corrobora los buenos resultados obtenidos con esta cepa en la inducción de resistencia en frijol ante el ataque de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum* (De Meyer y Hofte, 1997).

No se detectó producción de AS por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562 utilizada como control negativo. Esto confirma que esta cepa no tiene la capacidad de producir AS y corrobora los resultados obtenidos por De Meyer y Hofte (1997) quienes demuestran que es un mutante en la producción de ácido salicílico y piochelin. Tampoco se detectó la producción de este metabolito en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* MPf13 y en las cepas de *Burkholderia cepacia* MBf6, MBf9 y MBf19. Las cepas de referencia 0057 y J-143 también mostraron altos niveles en la producción de AS. Se han encontrado efectos beneficiosos en la estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol de patógenos al inocular estas cepas en diferentes cultivos de interés agrícola (Hernández *et al.*, 1995).

En comparación con la cepa KMPCH, utilizada como control positivo en este estudio, las cepas de *B. cepacia* MPBp1 y MBf15 producen altos niveles de este metabolito, mientras que las otras cepas producen niveles intermedios o bajos. Es importante señalar que las cepas que se destacan por las mayores producciones de este metabolito están identificadas como *B. cepacia*. Este comportamiento podría estar relacionado con los tipos de sideróforos que producen estas bacterias. Se han encontrado altos niveles en la producción de AS de cepas pioverdines negativos que indican que el AS compensa la ausencia del pioverdin. Este fenómeno ha sido observado en la cepa de *Pseudomonas fluorescens* CHAO y la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* KMPCH, ambas deficientes en la producción de este tipo de sideróforo (Meyer *et al.*, 1992).

El análisis de Conglomerado Jerárquico y de Ligamiento Completo, sobre la base de la distancia euclidiana, permitió agrupar las cepas por su capacidad de producir los metabolitos en estudio (distancia de unión de 25) en dos grupos (Figura 1), dentro de los cuales se encontraban los patrones creados.

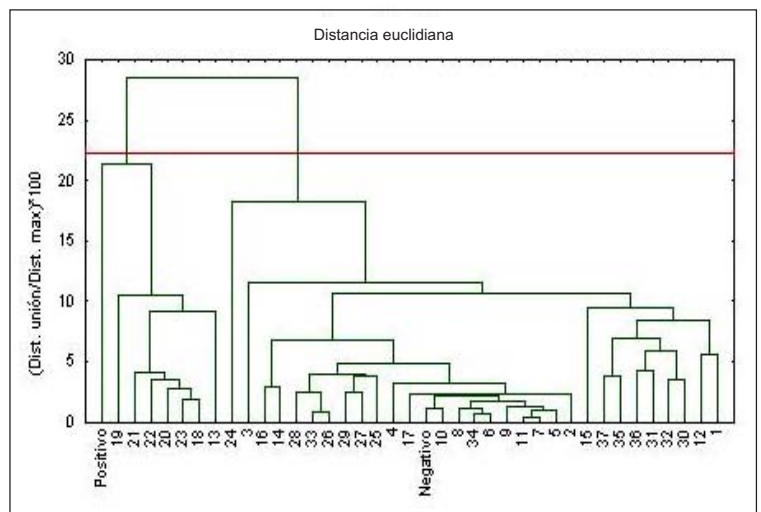


Figura 1. Dendrograma para el agrupamiento de las cepas de acuerdo con la producción de AIA, sideróforos y AS. Dendrograma calculado a partir del análisis de las concentraciones de los metabolitos en estudio. El control positivo está formado por las concentraciones más altas de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y AS producidas por las cepas, y el control negativo por las concentraciones más bajas.

Dentro del grupo I quedó incluido el patrón positivo, formado por las mayores concentraciones de AIA, sideróforos y AS, junto a las cepas de *B. cepacia* MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 y de *P. fluorescens* MPp4; el resto de las cepas y el patrón negativo (concentraciones más bajas obtenidas de los metabolitos en estudio) quedaron incluidos dentro del segundo grupo. A partir de estos resultados se seleccionaron las cepas del grupo I como las de mejor comportamiento integral pues producían las mejores concentraciones de los metabolitos estudiados (tabla 2).

La mayoría de las cepas seleccionadas pertenece a la especie *Burkholderia cepacia*, lo que corrobora la interacción entre cepas pertenecientes a este grupo microbiano y el cultivo del maíz. Al respecto, Hernández *et al.* (1995) y Hernández (2002) encontraron que las cepas de *Pseudomonas cepacia* eran las de mayor frecuencia de aparición en el cultivo del maíz y las que mayores efectos benéficos producían al ser inoculadas a las plantas.

Al realizar el análisis cromatográfico de producción de AS, los resultados corroboran la producción de este metabolito por las cepas seleccionadas (figura 2). Se observa que a diferencia de las cepas nativas en estudio y las cepas KMPCH, 0057 y J-143, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-562 no produce manchas en las placas para cromatografía, lo que indica que no produce este metabolito, corroborando los resultados obtenidos y los informados por otros autores (De Meyer, 1999; Bigiramana *et al.*, 2000).

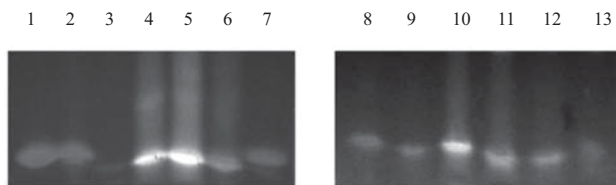


Figura 2. Análisis cromatográfico del ácido salicílico secretado por las 9 cepas seleccionadas. El ácido salicílico obtenido a partir del sobrenadante de las bacterias crecidas hasta la fase estacionaria en medio Casimiro ácido fue corrido en placas de Sílica Gel G., utilizando cloroformo/ácido acético/agua (90/5/2.5) como sistemas de solventes. Las manchas de AS fueron visualizadas en las placas mediante luz ultravioleta. Los números representan: 1, Patrón de AS; 2, KMPCH (control positivo); 3, 7NSK2-562 (control negativo); 4, MBf15; 5, MBf20; 6, MBp2; 7, MBp3; 8, MPp4; 9, MBp1; 10, MBf22; 11, 0057; 12, J-143.

De manera general, los resultados confirmaron la capacidad de las rizobacterias para producir metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico

que pueden influir en la estimulación del crecimiento vegetal y el biocontrol de patógenos en diferentes cultivos de importancia económica.

CONCLUSIONES

La mayor parte de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* estudiadas producen metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. Las cepas de *Burkholderia cepacia* MBf21, MBp1, MBp2, MBf22, MBp3, MBf20, MBf15 y *Pseudomonas fluorescens* MPp4 se destacaron de forma integral por las mayores producciones de los metabolitos de interés, demostrándose que las mismas son eficientes en la promoción del crecimiento vegetal en cultivos de importancia económica, por lo que constituyen fuentes de reserva para la producción de inoculantes microbianos factibles desde el punto de vista ecológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, D. B.; Zuberer D. A. 1991. Siderophore producing bacteria of iron-efficient and inefficient grass: 308. In D. L. Keister and P. B. Crigan (eds.). *The Rhizosphere and plant growth*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Ardon, O.; Weizman, H.; Libman, J.; Shanzler, A.; Chen, I.; Hadar Y. 1998. Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path. *J. Bacteriol.* 180: 2021-2026.
- Barelman, I.; Meyer J. M.; Taraz, K.; Budzikiewicz H. 1996. Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Z. Naturforsch.* 51: 627-630.
- Bigiramana, J.; Fontaine, R.; Hofte, M. 2000. Bean anthracnose: virulence of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Burundi, Central Africa. *Plant Dis.* 84:491.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. and M. Hofte. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium* induced damping off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol.* 62: 865-871.
- De Meyer, G. 1999. Role of salicylic acid in systemic resistance to disease induced by the root-colonizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Thesis submitted in the fulfillment of the requirements for the degree of Doctor (Ph. D.) in Applied Biological Sciences-Agronomy. Gent University.
- De Meyer, G.; Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by + *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology.* 87:588-593.
- De Salmone, I. E. G.; Hynes, R. K.; Nelson, L. M. 2001. Cytoquinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology.* 47(5):404-411.
- Dibut, B. 2000. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). La Habana. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

- Dybas, M. J.; Tarara, G. M.; Criddle, C. S. 1995. Localization of de carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2):p758-762.
- González, A.; Lacasa, A.; Rodríguez, R.; Fernández, J. A.; Franco, J. A. 2000. Rizobacterización de plántulas de pimiento: influencia en la fase de semillero y en la producción del cultivo. *Agrícola Vergel*, pp. 727-735.
- Grapelli, A.; Rossi W. 1981. The effect of phytohormones produced by *Arthrobacter* sp. on the phosphatase activity in plants roots. *Folia Microbiol.* 26: 137-141.
- Grill, H.; Himmelbanch, J. 1998. Systemic acquired resistance by rhizobacteria. In Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Hamdam, H.; Weller, D. W.; Tomashow, I. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *G. Graminis* var. *tritici* by *P. fluorescens* 2-79 and M4-Bor. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (11): 3270-3277.
- Hebbar, K. P.; Martel, M. H.; Heulin, T. 1998. Suppression of pre and post emergence damping off in corn by *Burkholderia cepacia* Eur. *J. Plant. Pathol.* 104:29-36.
- Hernández, A. N. 1996. Selección de rizobacterias para la biofertilización en el cultivo del maíz. La Habana. Tesis (en opción al título de magíster en ciencias biológicas); Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hernández, A. 1998. Caracterización de cepas de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. La Habana. Tesis (en opción al grado científico de magíster en ciencias biológicas); Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hernández, A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.). La Habana. Tesis (en opción al grado científico de doctor en ciencias biológicas), Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hernández, A. N.; Hernández, A.; Heydrich, M. 1995. Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales* (CU) 16 (3): 5-8.
- Hernández, A. N.; Martínez, J.; Velázquez, M. 1999. Identificación de alcaloides en cultivos de *Burkholderia cepacia*. Memorias XXX Congreso Nacional de Microbiología. Oaxtepec, Morelos, México.
- Hernández, A.; Caballero, A.; Pazos, M.; Ramírez, R.; Heydrich, M. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología* (CO) V (1): 45-55.
- Hernández, M. 1994. Síntesis de ácido 3-indol acético a partir de fuente microbiana. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Maurhofer, M.; Hase, C.; Meuwly, P.; Métraux, J-P.; Défago, G. 1994. Induction of systematic resistance of Tobacco to Tobacco Necrosis Virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the gac A Gene and of Pyoverdine production. *Phytopathology.* 84 (2): 562-570.
- Maurhofer, M.; Reimann, C.; Schmidli-Sacherer, P.; Heeb, S.; Haas, D.; Défago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology.* 88: 678-684.
- Meyer, J. M.; Azelvandre, P.; Georges, C. 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: Salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *BioFactors.* 4. 23-27.
- Meyer, J. M.; Trân Van, V.; Stinzi, A.; Berge, O.; Winkelmann, G. 1995. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formally *Pseudomonas cepacia*). *BioMetals.* 8: 309-317.
- Miranda, S.; Hernández, A.; Marqués, R. 2000. Estudio del efecto antagónico de productos bacterianos ante *Phytophthora infestans*. En: Programa y resúmenes XII Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (11: 2000: La Habana).
- Nandakumar, R.; Babu, S.; Viswanathan, R.; Raguchander, T.; Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry.* 33(4-5): 603-612.
- Pazos, M.; Hernández, A.; Paneque, V. M.; Santander, J. L. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales* (CU) 21 (3): 19-23.
- Picard, C.; Di Cello, F.; Ventura, M.; Fani, R.; Guckert, A. 2000. Frequency and Biodiversity of 2,4 Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of Plant Growth. *Applied and Environmental Microbiology.* 66 (3): 948-955.
- Rives, N.; Hernández, A.; Heydrich, M.; Rodríguez, A. J.; Manzano, J. 2003. Bacterias asociadas al arroz como una alternativa en la búsqueda de la sustentabilidad agrícola. IV Taller de la Cátedra de Medio Ambiente, julio.
- Rodríguez, A. J. 2003. Caracterización fisiológica de cepas de la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar. La Habana. Tesis (en opción al título de magíster en ciencias biológicas), Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Rodríguez, A. J.; Rojas, M. M.; Trujillo, I. D.; Manzano, J.; Heydrich, M. 2003. Caracterización de la comunidad microbiana endófitas de la caña de azúcar. En: Memorias. V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos FITOGEN 2003. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba.
- Rojas M. M.; Pérez, L. C. 1998. Mejoramiento de las condiciones de cultivo para la producción de ácido-3-indol acético por *R. meliloti*. *Biología* (CU) 12: 65-70.
- Send, S. P.; Leopold, A. C. 1954. Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. *Physiol. Plant.* 7: 98-108.
- Strezelczyk, E.; Kampert, M.; Le, C. I. 1994. Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum* sp. in media with carbon sources. *Acta Microbiol. Polonica.* 43: 89-95.
- Tien, T. M.; Gaskin, M. H.; Hubbell, D. H. 1979. Plant Growth Substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 219-226.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Velázquez, M.; Hernández A.; Heydrich, M.; Hernández, A. N. 1999. Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 41: 17-23.
- Yahalom, E. 1991. Bacterial Production of auxins. En: Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra.* 14 (2): 159-192.