

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA CELULAR DURANTE LA ACTIVIDAD ANTAGONICA DE *BACILLUS SUBTILIS* CONTRA *RHIZOCTONIA SOLANI* Y *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*.

M.G. Basurto-Cadena^{a*}, M.I. Font San Ambrosio^b, J. García-Jiménez^b, M. Vázquez-Arista^a

^aDepartamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Irapuato, Guanajuato, México.

^b Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

*Corresponding author, E-mail: cadenag@ducinea.ugto.mx, phone: (462)62-42484

Recibido: Septiembre 2009. Aprobado: Febrero 2010.

Publicado: Mayo 2010.

RESUMEN

Este estudio se llevó a cabo para conocer el efecto que producía, a nivel celular, la actividad antagonista de *Bacillus subtilis* contra los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides* usando lupa binocular y microscopio electrónico de barrido. *B. subtilis* No. 21 fue aislado de plantas de fresón sanas y los hongos patógenos *R. solani* y *F. verticillioides* fueron proporcionadas por el Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos de la Universidad Politécnica de Valencia. En México, estos hongos son los responsables de la enfermedad llamada “secadera”, la cual afecta la corona y la raíz del fresón, produciendo muy frecuentemente más del 50% de pérdidas en su producción. En estudios *in vitro*, previamente realizados en Irapuato, se demostró que *B. subtilis* inhibió el crecimiento natural de los hongos *R. solani* y *F. verticillioides*, aislados de plantas enfermas de fresón, y a nivel de invernadero se confirmó este antagonismo. Al final, este estudio demostró que hay liberación de sustancias inhibitorias por parte de *B. subtilis* No. 21, produciendo modificaciones morfológicas sucesivas en las hifas de los hongos patógenos hasta el colapso total de su estructura celular.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, fresón, antagonismo.

ESTRUCTURAL CELL CHANGES DURING THE ANTAGONIST ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* AGAINST *RHIZOCTONIA SOLANI* AND *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

ABSTRACT

This study was carried out in order to know the effects produced, at cell level, by the antagonist activity of *Bacillus subtilis* No. 21 against the pathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium verticillioides* using stereomicroscope and scanning electron microscopy. The strain 21 of *B. subtilis* was isolated from healthy strawberry plants and the fungi *R. solani* and *F. verticillioides* were supplied by the Pathogenic Fungi Research Group of the Valencia Polytechnic University. In Mexico these fungi are responsible of the “secadera” disease, which affect the strawberry crown and roots, producing sometimes more than 50 % of strawberry losses. Previous studies, *in vitro*, performed in Irapuato, demonstrated that *B. subtilis* No. 21 inhibited the natural growth of *R. solani* and *F. verticillioides* isolated from unhealthy strawberry plants, and this antagonism was also confirmed during greenhouse assays. After this study, it was demonstrated that there was secretion of inhibitory substances from *B. subtilis* No. 21, which produce successive morphological modifications on the pathogenic fungi hyphae until the total collapse of the cellular structure.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, strawberry, antagonism.

INTRODUCCIÓN

En las últimas cinco décadas se ha introducido en la literatura el estudio del control biológico fúngico por medio de metabolitos inhibidores de hongos fitopatógenos; este mecanismo de acción, conocido como antibiosis, tiene su base en la producción metabólica de moléculas tóxicas volátiles y enzimas hidrolíticas, como son quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas (Baker y Griffin, 1995). Las enzimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y glucanos de la pared celular de los hongos produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo (Roberts y Lumsden, 1990; Carsolio *et al.*, 1999).

Hasta hace algunos años era difícil el poder observar la acción que los antibióticos pueden producir a nivel celular pero gracias a las técnicas modernas de genética microbiana, microscopía electrónica y análisis químico, se ha puesto en evidencia la antibiosis como un mecanismo de control biológico, además de que los antibióticos aislados de diferentes especies de microorganismos antagonistas han sido cuantificados por cromatografía de capa fina y HPLC (Rodríguez y Pfender, 1997).

La microscopía electrónica de barrido (MEB) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, aportando información morfológica del material analizado. Las aplicaciones de la MEB son muy variadas y van desde la industria petroquímica o la metalúrgica hasta la medicina forense; en el campo de la microbiología se pueden hacer estudios de las estructuras celulares en tejidos normales y patológicos, conociendo la morfología y ultraestructura de los microorganismos (Hayat, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Los hongos *Rhizoctonia solani* (aislado del cultivo de judías de la Comunidad Valenciana, provincia de Castellón) y *Fusarium verticillioides* (No. 5988) proceden

de la colección del Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos de la Universidad Politécnica de Valencia. Estos hongos fueron crecidos en PDA durante 1, 2 y 3 semanas a 25 °C.

Cepa bacteriana

La cepa No. 21 de *Bacillus subtilis* fue aislada de plantas sanas del cultivo de fresón, variedad Chandler, del Municipio de Irapuato, Guanajuato. México.

Ensayos "in vitro" de antagonismo de B. subtilis frente a R. solani y F. verticillioides

En placas de PDA, con crecimiento micelial de 2 cm aproximadamente de cultivos puros de *R. solani* y *F. verticillioides*, se sembró la cepa No. 21 de *B. subtilis* en cuatro puntos alrededor de los hongos y a una distancia de 4.5 cm. Las placas se incubaron a 25°C durante 1, 2 y 3 semanas.

Preparación de las muestras para su observación en microscopía electrónica de barrido (MEB)

Fragmentos cuadrados de agar de 7-10 mm de lado con crecimiento fúngico (control) así como de crecimiento fúngico y bacteriano, incluyendo el área de inhibición, fueron fijadas por congelación (crio-fijación) con Nitrógeno líquido durante 10 min a -190°C. Seguidamente las muestras fueron sublimadas (de -190 a -85°C) durante 10-15 min y finalmente las muestras fueron recubiertas con orgetal (oro) en una unidad de alto vacío. Las muestras fueron observadas mediante MEB en un aparato Jeol JSM-5410 Scanning Microscope.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonismo "in vitro" de la cepa No. 21 de B. subtilis frente a F. verticillioides

La **Fig. 1** muestra la comparación de un cultivo puro de *F. verticillioides* y el halo de inhibición de este hongo provocado por la cepa No. 21 de *B. subtilis* en cultivos de 1, 2 y 3 semanas de edad, donde se observa antagonismo a partir de la primera semana de enfrentamiento.

En la **Fig. 2** aparece en detalle la zona de inhibición mediante observación en la lupa binocular (Leica MZ

APO). Se aprecia el halo de inhibición, principalmente en la segunda y tercera semanas de enfrentamiento de *F. verticillioides* con *B. subtilis* No. 21.



Fig. 1. Antagonismo de *F. verticillioides* con *B. subtilis* No. 21, después de 1,2 y 3 semanas respectivamente.

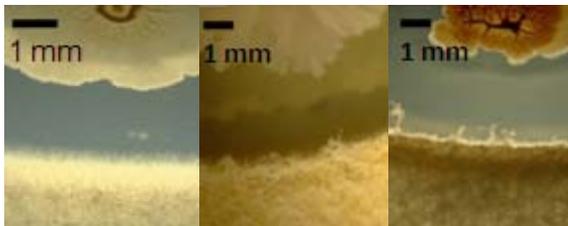


Fig.2. Detalle de las zonas de inhibición de *F. verticillioides* (inferior) con *B. subtilis* No. 21(superior) después de 1,2 y 3 semanas respectivamente.

Las microfotografías de las **Figs. 3, 4, 5 y 6** tomadas por medio del MEB, muestran las diferencias en la estructura celular de las hifas procedentes del cultivo puro de *F. verticillioides* frente a la cepa No. 21 de *B. subtilis* después de 1, 2 y 3 semanas de edad. Inicialmente se observan células hinchadas (swollen cells) y después deformación de las hifas de *F. verticillioides* hasta llegar al colapso. Estas “swollen cells” podrían ser confundidas con clamidosporas, descritas en este hongo, pero su presencia es mucho más abundante en los cultivos enfrentados a *B. subtilis* que en los cultivos puros.

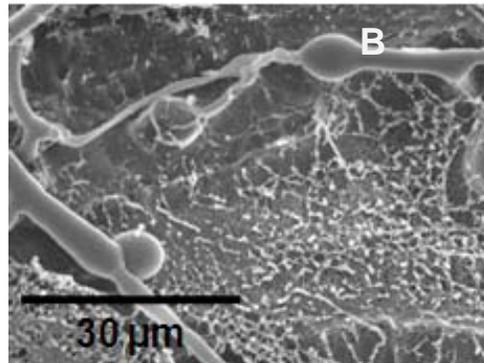
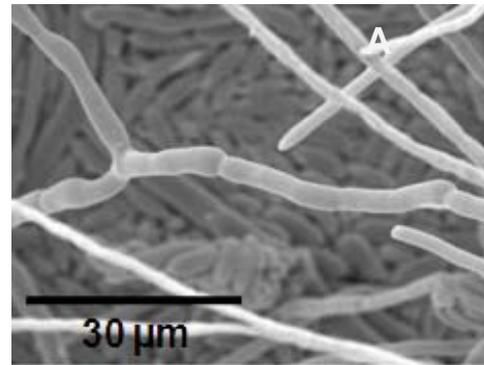


Fig. 3. Micrografías de la estructura celular de hifas de *F. verticillioides* de 1 semana de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

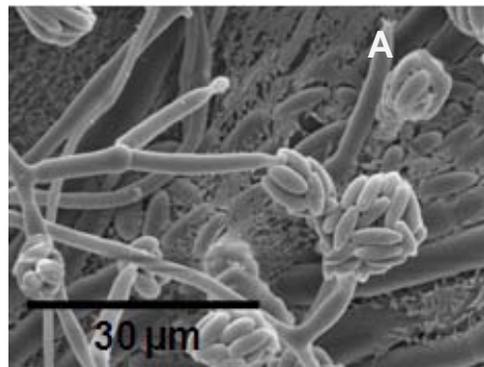


Fig. 4. Micrografías de la estructura celular de hifas de *F. verticillioides* de 2 semanas de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

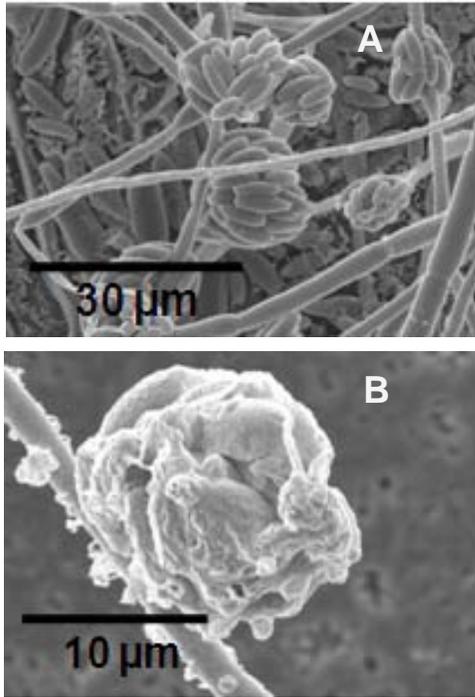


Fig. 5. Micrografías de hifas y conidióforos de *F. verticillioides* de 3 semana de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

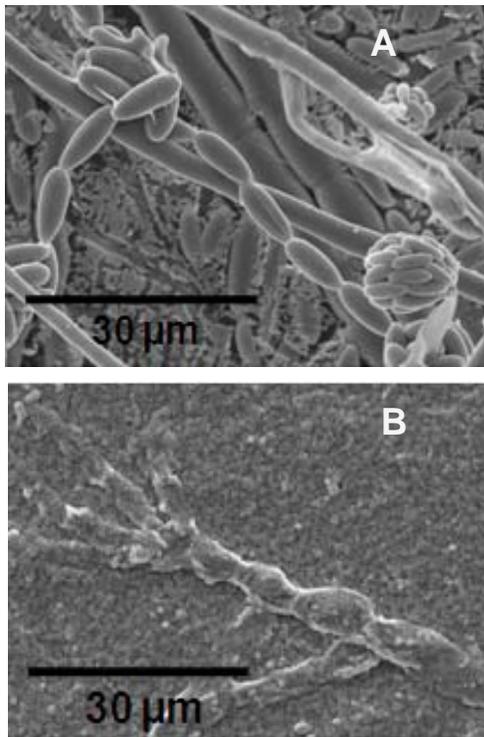


Fig. 6. Micrografías de la estructura celular de hifas de *F. verticillioides* de 3 semanas de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

Antagonismo “in vitro” de la cepa 21 de B. subtilis frente R. solani

La **Fig. 7** muestra detalle del halo de inhibición en observación bajo lupa binocular en la comparación de un cultivo puro de *R. solani* con la cepa 21 de *B. subtilis* en cultivos de 1, 2 y 3 semanas de edad. Puede observarse la formación de un halo de inhibición a partir de la segunda semana de enfrentamiento como en el caso de *F. verticillioides*. Este halo se enmascara en la tercer semana de enfrentamiento debido al crecimiento aéreo de las hifas de *R. solani*.

En lo que respecta a las observaciones mediante MEB, las microfotografías de las **Figs. 8, 9 y 10** muestran la morfología de las hifas del cultivo puro de *R. solani* frente a la cepa 21 de *B. subtilis* después de 1,2 y 3 semanas. Se observan hifas anormales hipertrofiadas, las cuales forman cuerpos vesiculares esféricos, plasmólisis de las hifas hasta el colapso total.

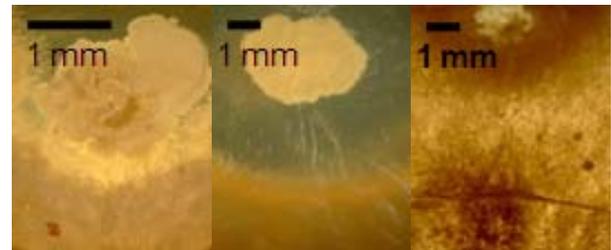


Fig.7. Detalle del antagonismo de *R. solani* (inferior) con *B. subtilis* No. 21(superior), después de 1,2 y 3 semanas respectivamente.

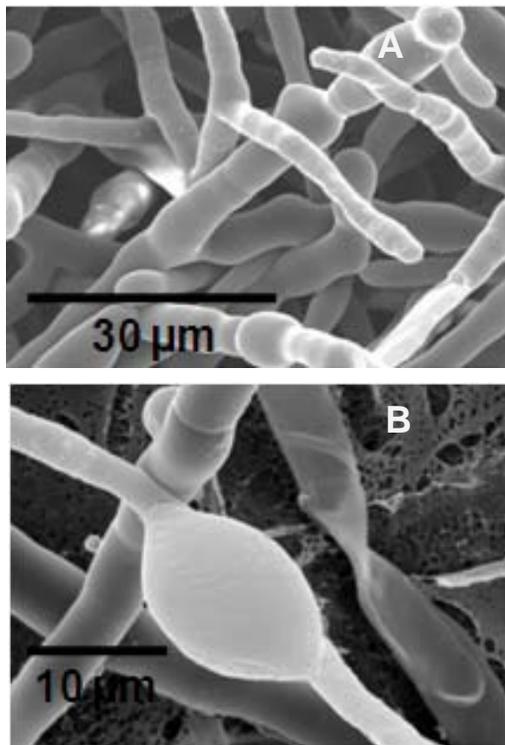


Fig. 8. Micrografías de la estructura celular de hifas de *R. solani* después de 1 semana de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

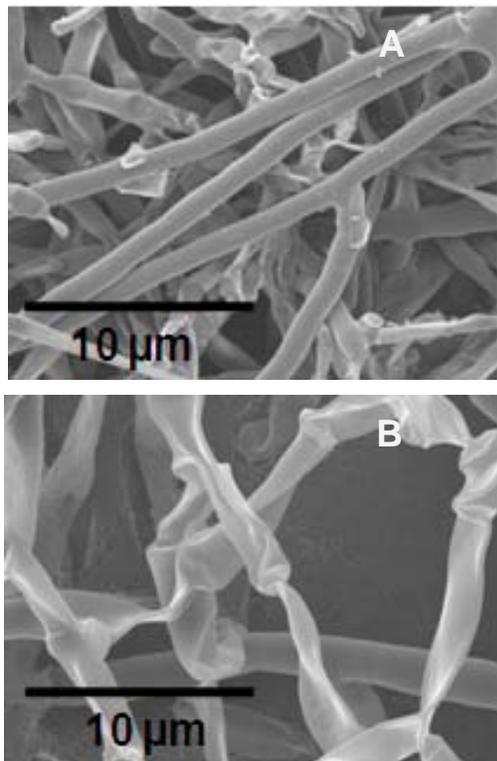


Fig. 9. Micrografías de la estructura celular de hifas de *R. solani* después de 2 semanas de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

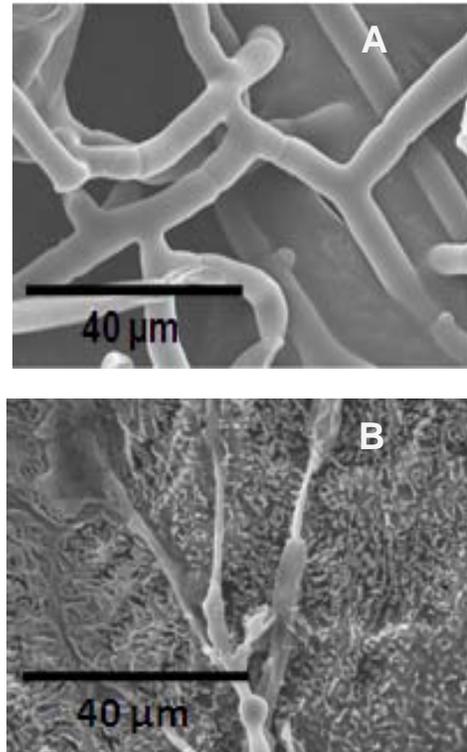


Fig. 10. Micrografías de la estructura celular de hifas de *R. solani* después de 3 semanas de crecimiento. (A: control; B: enfrentado a *B. subtilis* No. 21).

CONCLUSIONES

Algunos de las principales géneros bacterianos que se han citado para el control biológico de hongos fitopatógenos son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Weller, 1988), siendo los géneros mas estudiados por su producción de antibióticos *Bacillus* y *Pseudomonas*.

La especie bacteriana estudiada en este trabajo es del género *Bacillus*, la cual se encuentra normalmente distribuida en el suelo con una alta densidad de población que sobrevive durante largos períodos de tiempo, tolera temperaturas altas, mejor que otros organismos, y por su capacidad antagonica (Tschen, 1987).

Se ha comprobado que *B. subtilis* tiene un amplio espectro de actividad antifúngica debido, entre otros compuestos, a la presencia de un metabolito termoestable extracelular

que tiene una estructura típica de péptido cíclico (Rodgers, 1989), dentro de la familia de las iturinas (Gueldner *et al.*, 1988).

Se comprobó, por medio de la lupa, que la alteración del crecimiento vegetativo de los patógenos empezó a notarse a partir de la primera semana de confrontación con *B. subtilis* No. 21 (**Fig. 1**) y que esta alteración se debe a la presencia de metabolitos secundarios (halo de inhibición) secretados por la bacteria (**Figs. 2 y 7**). En el caso de *R. solani* se observó una sombra más ligera por la producción de sustancias inhibitorias y además en la segunda semana de enfrentamiento con la bacteria el halo de inhibición se pierde porque va siendo invadido por el micelio aéreo del hongo, por encima de la colonia bacteriana, pero no a través del medio de cultivo (**Fig. 7**).

También se demostró, por medio de MEB, toda una serie de cambios estructurales de las hifas y conidios, en el caso de *F. verticillioides*, que los hongos fitopatógenos experimentaron cuando se les enfrentó a *B. subtilis* No. 21. Estos cambios empezaron, para los dos hongos fitopatógenos, con abultamientos o hinchamiento de las hifas (swollen cells), para posteriormente sufrir lisis (**Figs. 3b, 4b, 8b y 9b**), hasta llegar al colapso total celular (**Figs. 6b y 10b**). Sin embargo, después de 3 semanas del enfrentamiento de *F. verticillioides* con *B. subtilis* No. 21, el hongo parece responder a la acción de los compuestos liberados por la bacteria al cubrir sus estructuras reproductoras (conidios) con una película biológica antes de colapsarse (**Fig. 5b**).

La desintegración de las paredes miceliales da como resultado la destrucción total de las estructuras celulares de los hongos patógenos, demostrando con ello la particular habilidad del antagonista para inhibir el crecimiento del patógeno.

Los resultados obtenidos en este estudio mediante MEB parecen sugerir que el mecanismo de antagonismo que presenta la cepa 21 de *B. subtilis* contra los hongos *R. solani* y *F. verticillioides* es, en primer instancia, por la presencia de sustancias de origen enzimático o de toxinas

que son producidas por la cepa bacteriana de *B. subtilis* No. 21, que logran lisar el micelio de ambos hongos.

A la vista de estos resultados se hace evidente la necesidad de profundizar en estudios posteriores para identificar la sustancia o sustancias implicadas en este proceso con la cepa No. 21 de *B. subtilis*, así como de implementar ensayos en condiciones de campo que comprueben la efectividad de esta bacteria, para que así, sea incluida en programas de control integrado de enfermedades contra los hongos patógenos de cultivos, no solo de fresón sino de cualquier otro de importancia económica para México.

REFERENCES

- [1] Baker, R. & Griffin, G.J. (1995) "Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens". In: Novel Approaches to Integrated Pest Management. Ed. Lewis Pub. Inc. Chelsea, M.I. 21: 9-17.
- [2] Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutierrez, A., Chet, I. & Herrera, A. (1999) "Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech 42 in mycoparasitism" *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3): 929-935.
- [3] Gueldner, R., Reilly, C., Pusey, P., Costello, C., Arrendale, R., Cox, R. Himmelsbach, D., Crumly, G., & Cutler, H. (1988) "Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*" *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36: 366-370.
- [4] Hayat, M.A. (2000) *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. University Press. Cambridge. 564 pp.
- [5] Roberts, D.P. & Lumnsden R.D. (1990) "Effect of extracellular metabolites from *Gliocadium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*" *Phytopathology* 80:461-465.
- [6] Rodgers, P.B. (1989) "Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for

agrochemical and pharmaceutical product development” *Pesticide Science* 27: 155-164.

- [7] Rodríguez, F. & Pfender, W.F. (1997) “Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta” *Phytopathology* 87: 614-621.
- [8] Tschien, J.S.M. (1987) “Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*” *Transactions of the Mycological Society of Japan* 28: 483-493.
- [9] Weller, D.M. (1988) “Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria” *Annu. Rev. Phytopathol* 26: 379-407.