

INTERACCION ENTRE *G. MOSSEAE* Y *PSEUDOMONAS SYRINGAE* EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE TOMATE

Por

J. M. GARCIA-GARRIDO y J. A. OCAMPO



PUBLICADO EN
ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA
TOMO XLVII - NUMEROS 11-12 - MADRID 1988

BIBLIOGRAFIA

- BAGYARAJ, D. J. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. En: VA mycorrhizas (E. C. LL. Powell & J. Bagyaraj) CRC Press Florida, pp. 131-153.
- BAREA, J. M.; ESCUDERO, J. L. y AZCON-AGUILAR, C. 1980. Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizers. Plant Soil, 54, 283-294.
- BARTSCHI, H.; GIANINAZZI-PEARSON, V. y VEIG, I. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. Phytopathol. Z. 102, 213-218.
- CARON, M.; FORTIN, J. A. y RICHARD, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. Plant Soil 87, 233-239.
- DEHNE, H. W. 1982. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathol. 72, 1115-1119.
- DEHNE, H. W. 1988 VA mycorrhizae and plant health. 2nd European Symposium on Mycorrhizae (Abstracts). Praga, Checoslovaquia. pp. 26-27.
- GARCIA-GARRIDO, J. M. y OCAMPO, J. A. 1987. Interacción entre micorrizas VA y organismos patógenos de plantas. An. Edafol. Agrobiol., 46, 1233-1245.
- GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. 1980. An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84, 489-500.
- HALOS, P. M. y ZORRILLA, R. A. 1979. Vesicular-arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *P. solanacearum*. Phillip. Agr. 62, 309-315.
- LEBEN, c. 1986. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* with cucumber root. Plant Soil. 91, 139-142.
- OCAMPO, J. A.; BAREA, J. M. y MONTOYA, E. 1975. Interactions between *Azotobacter* and phosphobacteria and their establishment in the rhizosphere as affected by soil fertility. Can. J. Microbiol. 21, 1160-1165.
- PHILLIPS, J. M. y HAYMAN, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 158-161.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. (Ed. por R. G. D. Steel y J. H. Torrie). McGraw-Hill International Book Co. Londres.
- SMITH, F. A. y SMITH, 1981. Mycorrhizal infection and growth of *Trifolium subterraneum*: Use of sterilized soil as a control treatment. New Phytol. 88, 299-309.
- WEAVER, D. J. y VEHUNT, E. J. 1975. Effect of soil pH on susceptibility of peach to *Pseudomonas syringae*. Phytopathol. 65, 934-989.

de forma negativa al crecimiento de las plantas de tomate no micorrizadas. La tolerancia de las plantas previamente micorrizadas frente a la acción de *P. syringae* fue superior a la de plantas inoculadas con ambos microorganismos al mismo tiempo. Esta característica también se ha observado con otros microorganismos patógenos de plantas (DEHNE, 1982). La reducción de la enfermedad causada por organismos patógenos por parte de los hongos VA se ha venido asociando con una mayor nutrición (sobre todo fosforada) de las plantas. Según los resultados de este trabajo no se puede descartar que el mecanismo de protección que ejerce *G. mosseae* sobre las plantas de tomate se deba a una mejora nutricional. Sin embargo, el hecho de que la reducción de la población de *P. syringae* sea independiente del intervalo de tiempo transcurrido entre la inoculación de ambos microorganismos, indica la posibilidad de que los hongos VA induzcan en la planta uno o varios componentes inhibidores de *P. syringae*. Esto sugiere que, al igual que se ha observado con otros patógenos (CARON *et al.*, 1985), posiblemente, haya una interacción entre las micorrizas VA y el patógeno en la fase extramatricial del hongo VA.

Nuestros resultados indican que hay que distinguir si el efecto de las micorrizas VA sobre la acción producida por *P. syringae* se debe a que actúan mediante un mecanismo directo sobre el patógeno o si se debe a una acción indirecta mediante la resistencia que los endofitos VA confieren a la planta debido a su efecto sobre el crecimiento y nutrición de la misma.

RESUMEN

Se ha estudiado la interacción entre el hongo formador de micorrizas *Glomus mosseae* y la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*, inoculado mediante la técnica de imbibición de las raíces, en plantas de tomate. *P. syringae* provoca una disminución en el peso seco de las plantas de tomate. Sin embargo, esta disminución desaparece cuando las plantas se inoculan también con *G. mosseae*. *P. syringae* no afectó el porcentaje de longitud de raíces micorrizadas, pero *G. mosseae* produjo una disminución de la población de *P. syringae* en la rizosfera de las plantas de tomate, y esta disminución fue independiente del intervalo de tiempo con que se inocularon ambos microorganismos.

Se discuten los mecanismos posibles de defensa por los que *G. mosseae* protege a las plantas de tomate de la acción negativa de *P. syringae*.

de forma negativa al crecimiento de las plantas de tomate no micorrizadas. La tolerancia de las plantas previamente micorrizadas frente a la acción de *P. syringae* fue superior a la de plantas inoculadas con ambos microorganismos al mismo tiempo. Esta característica también se ha observado con otros microorganismos patógenos de plantas (DEHNE, 1982). La reducción de la enfermedad causada por organismos patógenos por parte de los hongos VA se ha venido asociando con una mayor nutrición (sobre todo fosforada) de las plantas. Según los resultados de este trabajo no se puede descartar que el mecanismo de protección que ejerce *G. mosseae* sobre las plantas de tomate se deba a una mejora nutricional. Sin embargo, el hecho de que la reducción de la población de *P. syringae* sea independiente del intervalo de tiempo transcurrido entre la inoculación de ambos microorganismos, indica la posibilidad de que los hongos VA induzcan en la planta uno o varios componentes inhibidores de *P. syringae*. Esto sugiere que, al igual que se ha observado con otros patógenos (CARON *et al.*, 1985), posiblemente, haya una interacción entre las micorrizas VA y el patógeno en la fase extramatricial del hongo VA.

Nuestros resultados indican que hay que distinguir si el efecto de las micorrizas VA sobre la acción producida por *P. syringae* se debe a que actúan mediante un mecanismo directo sobre el patógeno o si se debe a una acción indirecta mediante la resistencia que los endofitos VA confieren a la planta debido a su efecto sobre el crecimiento y nutrición de la misma.

RESUMEN

Se ha estudiado la interacción entre el hongo formador de micorrizas *Glomus mosseae* y la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*, inoculado mediante la técnica de imbibición de las raíces, en plantas de tomate. *P. syringae* provoca una disminución en el peso seco de las plantas de tomate. Sin embargo, esta disminución desaparece cuando las plantas se inoculan también con *G. mosseae*. *P. syringae* no afectó el porcentaje de longitud de raíces micorrizadas, pero *G. mosseae* produjo una disminución de la población de *P. syringae* en la rizosfera de las plantas de tomate, y esta disminución fue independiente del intervalo de tiempo con que se inocularon ambos microorganismos.

Se discuten los mecanismos posibles de defensa por los que *G. mosseae* protege a las plantas de tomate de la acción negativa de *P. syringae*.

las mismas. Sin embargo, cuando se inocularon ambos microorganismos al mismo tiempo, el peso seco de la parte aérea de tomate y su contenido en P fue similar a los tratamientos controles no inoculados. Pero cuando las plantas se inocularon con *P. syringae* tres semanas después de *G. mosseae* la parte aérea y su contenido en P fue similar al de las plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* en ausencia del microorganismo patógeno.

El número de UFC de *P. syringae* por gramo de suelo rizosférico (Tabla II) disminuyó a lo largo de los experimentos, pero su número fue consistentemente inferior en presencia de *G. mosseae*, tanto en la rizosfera de plantas previamente micorrizadas como en la de plantas en las que ambos microorganismos se inocularon al mismo tiempo.

DISCUSION

El hecho más significativo que se ha encontrado en este trabajo es que, bajo las condiciones experimentales en que se ha llevado a cabo, *G. mosseae* protege a las plantas de la acción fitopatogénica de *P. syringae*. Por otro lado, hay que resaltar que las bacterias no tuvieron efecto alguno sobre el porcentaje de infección VA. *P. syringae* afectó

TABLA II

Número de unidades formadoras de colonias (U. F. C.) de *P. syringae* en rizosfera de tomate (*L. esculentum*), por g. de peso seco, inoculado o no con *G. mosseae*.

| Tiempo de inoculación | Tratamiento | U. F. C. (10^3 /g de suelo rizosférico) | | |
|---|--------------|--|------|-----|
| | | Días después de la inoculación | | |
| | | 5 | 20 | 35 |
| <i>P. syringae</i> inoculado al mismo tiempo que <i>G. mosseae</i> | P | 25,3 | 16,6 | 7,6 |
| | M+P | 24,8 | 12,2 | 1,3 |
| | M. D. S. 5 % | 11 | 2 | 1,1 |
| <i>P. syringae</i> inoculado 3 semanas después de <i>G. mosseae</i> | P | 35,3 | 16,6 | 7,5 |
| | M+P | 26,7 | 8 | 1,5 |
| | M. D. S. 5 % | 12 | 3 | 2,3 |

C = Controles no inoculados; P = Plantas inoculadas con *P. syringae*; M = Plantas inoculadas con *G. mosseae*. Cada cifra es la media de cinco repeticiones.

M. D. S. = Mínima diferencia significativa.

TABLA I

Porcentaje de longitud de raíces micorrizadas y peso seco (Parte aérea y raíz) de tomate (*L. esculentum*) en presencia o ausencia de *G. mosseae* e inoculadas o no con *P. syringae*.

| Perfodo de inoculación | Tratamientos | Peso seco (mg) | | % Longitud de raíz micorrizada | Contenido de P (% peso seco) |
|--|--------------|----------------|------|--------------------------------------|------------------------------------|
| | | P. aérea | raíz | | |
| <i>P. syringae</i> inoculado al mismo tiempo que <i>G. mosseae</i> | C | 140 | 122 | | 0,08 |
| | P | 100 | 86 | | 0,07 |
| | M | 167 | 96 | 51 | 0,09 |
| | M+P | 142 | 117 | 46 | 0,11 |
| M. D. S. | 5 % | 26 | 34 | 10 | 0,01 |
| <i>P. syringae</i> inoculado 3 semanas después de <i>G. mosseae</i> | C | 142 | 120 | | 0,07 |
| | P | 111 | 82 | | 0,09 |
| | M | 172 | 135 | 58 | 0,11 |
| | M+P | 174 | 141 | 64 | 0,14 |
| M. D. S. | 5 % | 22 | 59 | 11 | 0,01 |

C = Controles no inoculados; P = Plantas inoculadas con *P. syringae*; M = Plantas inoculadas con *G. mosseae*. Cada cifra es la media de cinco repeticiones. M. D. S. = Mínima diferencia significativa.

horas a 27 °C, en solución acuosa con agua destilada estéril. La solución bacteriana contenía aproximadamente $2,5 \times 10^7$ bacterias/ml.

Las raíces de las plántulas se cortaron en sus extremos y se sumergieron en la suspensión bacteriana durante 30 minutos. Como control se utilizó agua destilada.

Se utilizaron cuatro tratamientos:

- 1) Control no inoculado.
- 2) Plantas inoculadas con *P. syringae*.
- 3) Plantas inoculadas con *G. mosseae* y
- 4) Plantas inoculadas con ambos microorganismos.

Las plantas se inocularon con *G. mosseae* en el momento del transplante o después de tres semanas de crecimiento. La bacteria se inoculó cuando las plantas tenían tres semanas.

Durante el experimento cada quince días se tomaron muestras de suelo rizosférico, aproximadamente 1,5 g de cada maceta, y se hicieron diluciones seriadas (OCAMPO *et al.*, 1975). El primer muestreo se realizó cinco días después de la inoculación bacteriana.

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *P. syringae* en las diluciones apropiadas de cada muestra, tomadas de cada una de las cinco repeticiones por tratamiento, se contaron en un medio sólido diferencial (LEBEN, 1986). Como base para referencia del número de colonias, el suelo de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} se recuperó mediante filtración, se secó a 105 °C y se pesó. El número de UFC se expresó por gramo de suelo rizosférico seco.

Las plantas se cosecharon después de ocho semanas y se determinó el peso seco de las mismas. Parte del sistema radical se clarificó y se tiñó (PHILLIPS y HAYMAN, 1970) y se evaluó el porcentaje de la longitud de raíces infectadas mediante el método de intersección de líneas en placa cuadrículada (GIOVANNETTI y MOSSE, 1980). El contenido de P de la parte aérea se analizó en el departamento de análisis de la Estación Experimental del Zaidín mediante un autoanalizador tecnicon. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento, con las medias obtenidas se calculó la mínima diferencia significativa al 5% (STEEL y TORRIE, 1980).

RESULTADOS

Como puede observarse en la Tabla I el porcentaje de longitud de raíces de tomate infectadas con *G. mosseae* fué similar tanto en presencia como en ausencia de *P. syringae* en todos los tratamientos que se han ensayado. La inoculación con *G. mosseae* en ausencia del microorganismo patógeno incrementó el peso seco de la parte aérea de las plantas y su contenido en P. La inoculación de *P. syringae* produjo la aparición de clorosis en las hojas de tomate y un marchitamiento progresivo de las plantas con la consiguiente disminución en el tamaño de

las plantas de tomate micorrizadas fueron más resistentes a *P. solanacearum* que los controles no micorrizados (HALOS y ZORRILLA, 1979).

En los estudios que se han realizado sobre la interacción entre micorrizas VA y organismos patógenos, se ha observado que la infección VA induce cambios fisiológicos que hacen a las plantas más resistentes a la acción de los fitopatógenos. Entre esos cambios cabe señalar el aumento de la lignificación de las paredes celulares de la raíz y la estimulación de la actividad quitinolítica (DEHNE, 1988). Pero el principal efecto que tienen los hongos VA sobre estos organismos parece atribuirse a su acción sobre el crecimiento y mejor nutrición de las plantas (DEHNE, 1982). Por tanto, la resistencia que inducen los hongos VA en sus hospedadores parece depender del período de tiempo que transcurre entre la inoculación del hongo VA y la del fitopatógeno (BARTSCHCHI *et al.*, 1981). Sin embargo, hay que tener en cuenta que tanto los hongos VA como los organismos patógenos se encuentran, frecuentemente, de forma simultánea en la rizosfera.

El objeto de este trabajo es determinar la relación entre *G. mosseae* y *P. syringae* y examinar alguno de los posibles mecanismos involucrados en la resistencia inducida por las micorrizas VA en plantas de tomate.

MATERIAL Y METODOS

El ensayo se llevó a cabo en macetas de 300 ml de capacidad, en suelo de tipo calcáreo pardo-rojizo con un pH = 7,6, recolectado en la provincia de Granada (BAREA *et al.*, 1980). El suelo se esterilizó a vapor fluyente y se mezcló con arena esterilizada en la proporción 1:9 (V/V).

Se utilizaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Marglove). Las semillas germinaron en arena húmeda y cuando las plántulas tenían 2 semanas se transplantaron a las macetas y se cultivaron en invernadero a temperatura de 25-19 °C con luz suplementaria (Se utilizaron lámparas Sylvania incandescentes con 400 nmol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm) estableciendo un fotoperíodo de 16 horas y manteniendo la humedad relativa al 80%. Las plantas se regaron por capilaridad y se aplicó semanalmente 2 ml de una solución nutritiva carente de fósforo (SMITH y SMITH, 1981).

El inóculo VA consistió en 5 g de suelo rizosférico que contenía esporas, micelio y fragmentos de raíces infectadas con *G. mosseae*. Parte de este suelo se filtró (Filtro Whatman no. 1) y se añadió a los tratamientos en los que no se inoculó el endofito VA. El filtrado contenía los microorganismos comunes del suelo pero sin propágulos de micorrizas.

P. syringae se preparó a partir de cultivos crecidos previamente en agar nutritivo (g/l: agar nutritivo Difco 23; sacarosa 10), durante 47

INTERACCION ENTRE *G. MOSSEAE* Y *PSEUDOMONAS SYRINGAE* EN LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE TOMATE

Por

J. M. GARCIA-GARRIDO y J. A. OCAMPO

SUMMARY

INTERACTION BETWEEN *G. MOSSEAE* AND *P. SYRINGAE* ON TOMATO PLANT RHIZOSPHERE

The interaction between the VA mycorrhizal fungus *G. mosseae* and the pathogenic bacteria *P. syringae*, inoculated by the root dipping technique, have been studied.

P. syringae decreased the dry matter of tomato plants. However, when the bacteria was inoculated at the same time than *G. mosseae*, this decrease dissappeared. On the other hand, the percentage of VA root length infection was unaffected by *P. syringae*. Nevertheless, the population of *P. Syringae* decreased in presence of *G. mosseae* irrespective of the time elapsed between the inoculation of both microorganisms.

The possible mechanisms by which *G. mosseae* protect tomato plants against the negative effect of *P. syringae* are discussed.

INTRODUCCION

Los hongos formadores de micorrizas endotróficas vesículo-arbusculares (VA) ocupan el tejido cortical de la raíz de la mayoría de las plantas. Estos microorganismos están en una posición ecológica única ya que se encuentran dentro y fuera de la planta hospedadora por lo que pueden reforzar las defensas naturales de la raíz frente a la invasión por organismos patógenos compitiendo con ellos para ocupar el nicho ecológico que representa la raíz de la planta.

En efecto, en varias investigaciones se ha puesto de manifiesto que las micorrizas VA influyen en la acción negativa que tienen algunos microorganismos patógenos sobre el crecimiento de las plantas (DEHNE, 1982). La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio sobre la interacción entre micorrizas VA y nematodos, hongos y virus fitopatógenos, sin embargo, son muy pocos los que han estudiado el efecto de las micorrizas VA sobre bacterias fitopatógenas (BAGYARAJ, 1984; GARCIA-GARRIDO y OCAMPO, 1987). Se ha encontrado que la infección VA no influía en la susceptibilidad de melocotonero a la acción de *P. syringae* (WEAVER y VEHUNT, 1975), sin embargo