

## USO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES NATIVAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN EN *Lotus corniculatus* L.

Pérez, C.<sup>1</sup>, De La Fuente, L.<sup>2,3</sup>, Arias, A.<sup>2</sup> y Altier, N.<sup>4</sup>

Recibido: 08/01/01 Aceptado: 26/07/01

### RESUMEN

Las enfermedades de implantación, causadas por *Pythium* spp., son una limitante para la productividad y persistencia de pasturas. Durante 1996, 1997 y 1998 se realizaron experimentos de campo con el objetivo de evaluar la capacidad de tres cepas nativas de *Pseudomonas fluorescens* (UP61, UP143 y UP148), productoras de HCN, sideróforos y antibióticos, para controlar las enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus*. Se utilizó un diseño de BCA con cinco repeticiones; la unidad experimental consistió en una microparcela donde se sembraron 100 semillas viables previamente inoculadas según los siguientes tratamientos: *Mesorhizobium loti* B816 y cada una de las cepas de *Pseudomonas*, *M. loti* B816 sin *Pseudomonas*, *M. loti* B816 + metalaxil aplicado al suelo. Sólo en 1996 ocurrieron condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades (precipitaciones y bajas temperaturas). En ese año, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, la inoculación con *Pseudomonas* resultó en un mayor número de plantas y una mayor producción de materia seca por parcela, respecto al testigo sin inocular. En 1997 y 1998 la inoculación con *Pseudomonas* no aumentó el número de plantas establecidas pero incrementó el peso seco por parcela, indicando la posible ocurrencia de un efecto promotor del crecimiento. Las tendencias verificadas ameritan la repetición de los experimentos para validar la implementación práctica de esta herramienta de control, en las condiciones de suelos, clima y comunidades microbianas de Uruguay.

**PALABRAS CLAVE:** *Pythium*, *Pseudomonas*, control biológico, *Lotus corniculatus*

### SUMMARY

#### USE OF NATIVE FLUORESCENT *Pseudomonas* FOR CONTROLLING SEEDLING DISEASES OF *Lotus corniculatus* L.

Seedling diseases caused by *Pythium* spp. are one of the main constraints for pasture productivity and persistence. During 1996, 1997 and 1998, experiments were conducted under field conditions to evaluate the ability of three strains of native fluorescent *Pseudomonas* (UP61, UP143, UP148) that produce HCN, siderophores and antibiotics to suppress seedling diseases on *Lotus corniculatus*.

The experimental design was a Randomized Complete Block with five replications. One hundred viable seeds were sown per plot, previously treated as follows: *Mesorhizobium loti* B816 with each one of the strains of *Pseudomonas*; *M. loti* B816 without *Pseudomonas*; *M. loti* B816 + metalaxyl (fungicide) sprayed on the soil. Favorable conditions for the development of damping-off only occurred during 1996 (rainfall and low temperatures). That year, despite differences were not statistically significant, the treatments inoculated with *Pseudomonas* had higher establishment percentage and higher dry matter production per plot than the control without *Pseudomonas*. In 1997 and 1998, the inoculation with *Pseudomonas* did not increase the number of established plants but induced an increase on dry matter production per plot suggesting the possible occurrence of an effect on plant growth promotion. The observed trends indicate that the experiments should be repeated in order to validate the practical implementation of this management strategy, under the various soil and environmental conditions and microbial community structures found in Uruguay.

**KEY WORDS:** *Pythium*, *Pseudomonas*, biocontrol,

<sup>1</sup> Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni", Facultad de Agronomía, Ruta 3 km 363, CC 57072, Paysandú, Uruguay.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Unidad Asociada Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, CC 33085, Las Piedras, Uruguay.

## INTRODUCCIÓN

Las leguminosas forrajeras juegan un papel importante en la producción agropecuaria del Uruguay, constituyendo una fuente de alimento de alta calidad para el ganado. Su capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con rizobios, les confiere la ventaja adicional de suministrar este nutriente al suelo para ser utilizado por otras especies del tapiz o por cultivos siguientes en la rotación.

La mayor limitante que presenta el uso de leguminosas es su baja persistencia productiva, como consecuencia de la interacción de diversos factores. Entre ellos, las enfermedades participan de manera importante afectando a la pastura en distintas etapas de su vida útil (Altier, 1996).

Durante la germinación y el estado de plántula, las leguminosas son vulnerables y muy susceptibles a diversos organismos causantes de enfermedades que pueden ocasionar reducciones importantes en la emergencia del cultivo y/o alta mortandad de plantas durante la etapa de implantación.

Una pastura mal implantada no sólo produce menos forraje y de menor calidad, sino que además ve comprometida su persistencia. Las malezas comienzan a invadir los espacios libres y a competir por luz, agua y nutrientes, siendo a la vez fuente de inóculo de enfermedades y plagas. Esto estresa a la planta limitando su desarrollo e incluso causándole la muerte.

El proceso de implantación de *Lotus corniculatus* es de baja eficiencia biológica. Considérese como ejemplo que la densidad de siembra recomendada es generalmente 8 kg de semilla/ha, lo que equivale aproximadamente a 670 semillas/m<sup>2</sup>; sin embargo, difícilmente se logra una implantación promedio mayor a 200 plantas/m<sup>2</sup>. Esto se debe a varios factores: calidad de sementera, calidad de siembra, calidad de semilla, enfermedades y plagas, entre otros. Las enfermedades son responsables de un porcentaje de mortandad considerable cuando se dan condiciones de alta humedad en el suelo y bajas temperaturas que favorecen el desarrollo de algunos hongos del suelo y retardan el normal desarrollo de la planta.

Poblaciones de plantas limitantes pueden reducir el potencial de producción irreversiblemente dado que esta especie tiene plantas del tipo discreto y muchas veces la resiembra natural no es efectiva.

Las enfermedades de implantación, comúnmente llamadas "damping-off", son causadas por un complejo de hongos patógenos de suelo donde predominan especies del género *Pythium* y en menor grado de los géneros *Rhizoctonia* y *Fusarium*, que atacan al vegetal en etapas de pre- y post-emergencia temprana. Luego de esta etapa la planta se vuelve resistente ya que lignifica sus tejidos y

el hongo no es capaz de penetrar los mismos (Altier & Thies, 1995).

La eficacia de varios agroquímicos como tratamiento de semillas ha sido evaluada en el control del «damping-off» de leguminosas (Falloon & Skipp, 1982). Entre ellos se destaca el metalaxil, fungicida sistémico activo contra patógenos de la clase Oomycetes, al cual pertenece el género *Pythium* (Margot, 1983). Dicho fungicida, en su formulación comercial Apron (Novartis), se aplica aproximadamente a un 50% de la semilla de alfalfa comercializada en Estados Unidos, para la protección del «damping-off» causado por *Pythium* y *Phytophthora* spp. (Leath *et al.*, 1996). Sin embargo, la eficacia de esta forma de control no es total, ya que existe variabilidad en la sensibilidad al metalaxil y se han descrito aislamientos de *Pythium* resistentes al mismo (Cook & Zhang, 1985; Sanders, 1984).

En los sistemas de producción con pasturas, el empleo de pesticidas químicos está limitado por el costo de aplicación y los probables efectos adversos sobre el ambiente, la salud animal y la calidad de los alimentos de consumo humano. Por otra parte, pese al potencial del metalaxil para controlar las enfermedades de implantación, su formulación para el tratamiento de semillas no está comercialmente disponible en Uruguay. Además se ha demostrado que el uso de otros pesticidas para el tratamiento de semillas de leguminosas forrajeras tiene un efecto perjudicial sobre los rizobios, afectando la fijación biológica de nitrógeno (Altier & Pastorini, 1988).

La resistencia genética de la planta huésped podría ofrecer una alternativa de control de enfermedades efectiva, económica e inocua para el medio ambiente. Sin embargo, hasta el momento, no hay cultivares de leguminosas con mayor resistencia comercialmente disponibles.

En los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de nuevas tecnologías que posibiliten el uso de prácticas de producción sustentables, dirigidas hacia la explotación racional de los recursos naturales y tendientes a reducir el uso de pesticidas sintéticos.

Varios géneros de bacterias y hongos han sido descritos como antagonistas y usados para el control biológico de patógenos de plantas. Entre las bacterias rizosféricas capaces de controlar microorganismos patógenos del suelo, el género *Pseudomonas* es uno de los más promisorios (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Estas bacterias son capaces de controlar diferentes géneros de patógenos tales como *Pythium* (Loper, 1988), *Rhizoctonia* (Howell & Stipanovic, 1979), *Fusarium* (Leath *et al.*, 1989), y *Gaeumannomyces* (Thomashow & Weller, 1988).

El control biológico de enfermedades de implantación en leguminosas se presenta como una alternativa válida en un sistema de control integrado, por las siguientes ra-

zonas: a) los antagonistas pueden ser fácilmente aplicados a la semilla con la tecnología existente para rizobio, siendo introducidos directamente en la zona de infección potencial, b) en la mayor parte de los casos la protección es necesaria por un tiempo corto hasta que la planta desarrolla defensas contra patógenos causantes del «damping-off».

Desde 1996, en un trabajo conjunto del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), la Facultad de Agronomía y el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), se está estudiando la viabilidad del control biológico de enfermedades de implantación en lotus mediante el uso de *Pseudomonas* fluorescentes. En el Depto. de Bioquímica del IIBCE, 600 cepas de *Pseudomonas fluorescens* fueron aisladas de la rizósfera de plantas de lotus recolectadas en distintas regiones del país. Tres cepas (UP61, UP143 y UP148) fueron seleccionadas por su comprobada capacidad antagónica frente a *Pythium* en condiciones controladas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagónica de estas tres cepas en condiciones de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de campo fueron realizados en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, localizada en el Departamento de Paysandú, en un suelo Brunosol sub-éutrico de la unidad San Manuel sobre formación Fray Bentos, según la Carta de Suelos 1:1000000 del MGAP. Se sembraron en tres años consecutivos en las fechas 15/5/96, 1/7/97 y 26/3/98, con un diseño de bloques completos al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en una microparcela delimitada por un tubo de PVC de 0.07m<sup>2</sup> de sección.

La siembra se realizó en forma manual utilizando 100 semillas viables de *Lotus corniculatus* cv. San Gabriel por microparcela. La semilla fue inoculada con el rizobio y la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en forma conjunta utilizando la metodología comercial (adherente + turba) y la dosis comercial de *Mesorhizobium loti*. Para la preparación del inoculante del agente biocontrolador se utilizó como vehículo turba esterilizada por radiación gamma. Se siguió la técnica descrita previamente (Bagnasco *et al.*, 1998) y la concentración de *Pseudomonas* fue aproximadamente de 1x10<sup>9</sup>-1x10<sup>10</sup> UFC/g de turba húmeda.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- testigo con *M. loti* B816 (inoculante comercial)
- *M. loti* B816 + *P. fluorescens* UP61
- *M. loti* B816 + *P. fluorescens* UP143
- *M. loti* B816 + *P. fluorescens* UP148
- *M. loti* B816 + fungicida

El fungicida utilizado fue metalaxil + folpet aplicado al suelo inmediatamente post-siembra (dosis: equivalente a 80g de folpet + 20g de metalaxil/ha). El uso de metalaxil, fungicida sistémico específico para el control de Oomycetes, tuvo como objetivo estimar el impacto de dichos patógenos sobre la implantación.

## Presencia de *Pythium* en el suelo

En 1997 y 1998, previo a la siembra se realizó un muestreo de suelo (aprox. 4 g/parcela) para diagnosticar la presencia de *Pythium* spp. en el mismo. Durante tres días las muestras de suelo se incubaron junto a plántulas de alfalfa, utilizadas como anzuelo para *Pythium*, siguiendo el método propuesto por Altier & Thies (1995). Las raíces de alfalfa se lavaron durante 12 horas en agua corriente, y se sembraron cinco raíces por placa de agar-agua. Luego de dos días se evaluó el número de raíces por placa de las que emergía una colonia de *Pythium* spp. y se expresó como porcentaje del total de raíces evaluadas.

## Evolución poblacional de *Pseudomonas* en el suelo

En 1998, la densidad poblacional de *Pseudomonas* fluorescentes en el suelo fue cuantificada en tres oportunidades: al momento de la siembra, al mes de iniciado el experimento y al momento de la cosecha.

Al momento de la siembra se tomó una muestra de suelo no-rizosférico y se realizó el recuento de *Pseudomonas* fluorescentes en medio King B (KB, King *et al.*, 1954), conteniendo cicloheximida (100mg/ml), ampicilina (50 mg/ml) y cloramfenicol (12,5mg/ml). Al mes de la siembra y a la cosecha, se recogieron muestras de suelo rizosférico de cada uno de los cinco tratamientos. Una muestra de la población de *Pseudomonas* recuperada del tratamiento con la cepa UP61, fue analizada por su capacidad de antagonizar *in vitro* al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, siguiendo el método propuesto por Geels & Schippers (1983). Se utilizó este patógeno como blanco, ya que la experiencia previa en suelos uruguayos ha mostrado que, en general, los aislamientos capaces de inhibir a *R. solani* también inhiben a *Pythium ultimum*.

## Número de plantas establecidas

Luego de la siembra, se determinó el número de plántulas presentes por parcela, cada dos días durante los primeros 45 días post-siembra y cada siete días por 45 días más.

## Producción de materia seca total a los 90 días post-siembra

A los 90 días se realizó la cosecha de los ensayos. Se determinó el número final de plantas por parcela y la pro-

ducción de materia seca por parcela. La materia seca se obtuvo luego del secado de las plantas en estufa a 50 °C durante 48 horas.

### Registros climáticos

Los registros de temperatura y precipitaciones fueron obtenidos de la estación meteorológica "Chalkling" ubicada a 1000 m del lugar de experimentación.

### Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el procedimiento GLM del SAS (SAS, 1985) y las medias de los tratamientos fueron separadas usando MDS de Fisher protegida ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Presencia de *Pythium* en el suelo

En 1997, 83% de las raíces de alfalfa utilizadas como anzuelo se infectaron con *Pythium* spp.; en 1998, el porcentaje fue 64%. Estos porcentajes indican que la población de *Pythium* spp. que naturalmente está presente en el suelo es alta y que existe un riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades de implantación. La ausencia o presencia de infecciones en la pre- y post-emergencia dependerá de las condiciones climáticas prevalentes durante dicho período, en la medida que favorezcan o no una rápida germinación y crecimiento vegetal (mecanismo de escape).

En 1997 también se estudió la presencia de *Pythium* spp. en el suelo luego de finalizado el experimento, para cada uno de los cinco tratamientos impuestos. En el Cuadro 1 se presenta la cuantificación de *Pythium* spp. como estimación del efecto de los tratamientos sobre la población del patógeno.

**Cuadro 1.** Efecto del tratamiento con *Pseudomonas fluorescens* sobre la población de *Pythium* spp., expresada como porcentaje de raíces de alfalfa que rindieron colonias del patógeno en agar-agua (año 1997).

Tratamiento	%
Testigo	40 ab (*)
UP 61	36 b
UP 143	22 c
UP 148	52 a
Fungicida	5 d
P>F	0,0001
C.V.(%)	24

(\*) Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $P=0.0001$ ).

El valor del testigo (40%) indicó que la población de *Pythium* presente en el suelo al finalizar el ensayo (octubre) fue menor que en el momento de la siembra (julio). Esto resulta lógico, dado que las condiciones prevalentes en julio, bajas temperaturas (cerca de 10 °C) y alta humedad edáfica, son particularmente favorables para el desarrollo de estos hongos.

El valor del tratamiento con fungicida (5%) demostró que el producto es altamente efectivo para disminuir la población de *Pythium* en el suelo. El efecto de las cepas sobre la población de *Pythium* fue variable. Las cepas UP61 y UP148 no presentaron diferencias significativas respecto al testigo, mientras que la cepa UP143 resultó en un porcentaje significativamente menor de colonias, si bien no produjo una reducción tan efectiva como la del fungicida.

### Evolución poblacional de *Pseudomonas* en el suelo

Al momento de la siembra, se encontró una población de *Pseudomonas* fluorescentes de  $3 \times 10^5$  UFC/g suelo. Esta población no presentó actividad antagónica *in vitro* frente a *Rhizoctonia solani*.

Al mes de la siembra, la población de *Pseudomonas* fluorescentes varió entre  $6 \times 10^4$  y  $1 \times 10^7$  UFC/g suelo. En el caso del tratamiento inoculado con la cepa UP61, 10 de los 16 aislamientos de la población recuperada mostraron antagonismo frente a *R. solani in vitro*.

A la cosecha, la población de *Pseudomonas* fluorescentes varió entre  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^6$  UFC/g suelo. Un tercio de los aislamientos de la población bacteriana recuperada del tratamiento inoculado con la cepa UP61 fueron inhibidores de *R. solani*, en igual medida que la cepa inoculada. Un 60 % de los aislamientos con capacidad antagónica presentó un perfil similar al de *P. fluorescens* UP61, utilizando la reacción de PCR con cebadores ERIC (de Bruijn, 1992).

Este método de verificación de la presencia de bacterias inoculadas en el suelo no fue cuantitativo, y se basó en el estudio de muestras muy reducidas, lo cual solamente permitió tener una idea aproximada de lo que ocurre en el suelo. En estudios posteriores se han utilizado cepas marcadas con resistencia a antibióticos, lo cual permite un análisis más detallado de la dinámica poblacional en la rizósfera, hábitat en donde se dan las interacciones bacterias biocontroladoras - patógenos radiculares (De La Fuente *et al.*, 2000).

### Número de plantas establecidas a los 90 días post-siembra

El objetivo buscado mediante la inoculación con las cepas de *Pseudomonas fluorescens* nativas es aumentar el número de plantas establecidas, lo que redundaría en un mejor establecimiento de la pastura y por consiguiente en una mayor productividad por unidad de área con una mayor persistencia. En el Cuadro 2 se presentan los valores de implantación obtenidos en los tres años de experimentación.

**Cuadro 2.** Efecto del tratamiento con *Pseudomonas fluorescens* sobre la implantación de *Lotus corniculatus* a los 90 días de la siembra, expresada en base 100 (correspondiente al número final de plantas para el testigo sin tratar).

Tratamiento	1996	1997	1998
Testigo	100	100	100
UP 61	128	94	75
UP 143	127	110	102
UP 148	103	116	84
Fungicida	361 (*)	117	87
Base 100	14	41	60
P>F	0,86	0,83	0,33
C.V.(%)	47	31	29

(\*) P=0.0001.

En 1998 (siembra de marzo) el porcentaje de implantación del testigo fue de 60%, mientras que en el año 1996 (siembra de mayo) fue de 14%. Sólo en 1996 el tratamiento con fungicida aumentó en forma estadísticamente significativa el número de plantas establecidas frente al testigo. Esto indica que en ese año ocurrieron condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades de implantación causadas por *Pythium* spp. El tratamiento con fungicida permitió tener una estimación del impacto de estos hongos patógenos sobre la implantación de lotus, ya que su aplicación triplicó el número de plantas establecidas (51% de implantación).

El tratamiento con las distintas cepas de *Pseudomonas* evaluadas, especialmente en los años 1996 y 1997, incrementó la implantación respecto al testigo; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Cabe destacar que el coeficiente de variación en los tres experimentos fue relativamente elevado, principalmente en el primer año de evaluación. Esto puede ser explicado porque dicho año presentó mayor incidencia de enferme-

dades causadas por *Pythium* spp., lo que pudo haber ocasionado una dispersión mayor de los datos (C.V. 47%), que no se dio en los dos años restantes.

### Producción de materia seca total a los 90 días post-siembra

La determinación de la producción de materia seca, a los 90 días post-siembra, permitió estimar el efecto que las *Pseudomonas* fluorescentes pueden tener en la promoción del crecimiento vegetal. En el Cuadro 3 se presentan los valores de rendimiento de materia seca obtenidos en los tres años de experimentación.

**Cuadro 3.** Efecto del tratamiento con *Pseudomonas fluorescens* sobre el rendimiento de materia seca (gramos/parcela) de *Lotus corniculatus* a los 90 días de la siembra, expresado en base 100 (correspondiente al testigo sin tratar).

Tratamiento	1996	1997	1998
Testigo	100	100	100
UP 61	157	153	99
UP 143	200	145	133
UP 148	91	138	108
Fungicida	487 (*)	159	95
Base 100 (g)	0,23	1,39	9,93
P>F	0,58	0,70	0,46
C.V.(%)	84	51	29

(\*) P=0.001.

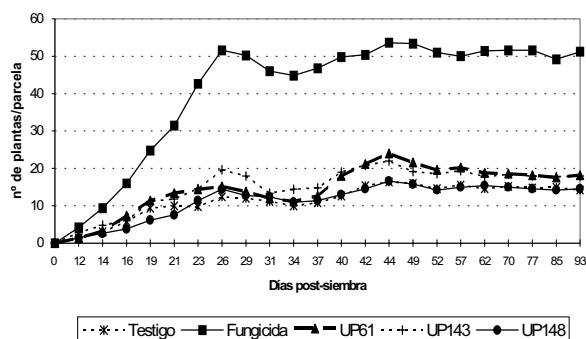
Las diferencias observadas en los valores correspondientes a la base 100 se deben a las diferencias en el número de plantas establecidas y al efecto de las condiciones climáticas registradas en cada año, durante la ejecución de los experimentos. Así, las condiciones del año 1998 fueron más cálidas (siembra de marzo), lo que aceleró el crecimiento vegetal y resultó en rendimientos de materia seca por parcela más altos que en 1996 y 1997.

La inoculación con *Pseudomonas* resultó, en general, en incrementos en el peso seco total con respecto al testigo sin inocular. En particular, se destaca el incremento en el peso seco total cuando se utilizó la cepa *P. fluorescens* UP143. Este efecto fue consistente en los tres años evaluados, siendo el incremento en rendimiento de materia seca de 100%, 45% y 33%, para 1996, 1997 y 1998, respectivamente. Esto puede estar indicando cierto efecto promotor del crecimiento dado por dicha cepa bacteriana, si se considera que el incremento registrado en el porcentaje de implantación fue de 27%, 10% y 2%, para 1996, 1997 y 1998, respectivamente.

A pesar de la magnitud de las diferencias registradas entre los tratamientos, éstas no fueron estadísticamente significativas, a excepción del efecto del fungicida en 1996. La aplicación del fungicida prácticamente quintuplicó el rendimiento de materia seca con respecto al testigo. Los coeficientes de variación fueron aún mayores que los obtenidos para la variable número de plantas establecidas.

### Registros climáticos

El período crítico de la implantación se ubicó en los 20 - 30 primeros días post-siembra. Es en ese período donde se generaron las diferencias en el número de plantas. Luego del mismo, el orden de efectividad de los tratamientos permaneció prácticamente invariable, ya que los efectos posteriores afectaron a todos por igual (Figura 1).



**Figura 1.** Evolución del número de plantas de *Lotus corniculatus* durante el período de implantación, obtenida del experimento del año 1996.

Por esa razón, se analizó para dicho período los factores que probablemente hayan podido dar origen a las diferencias observadas entre los años. A continuación, se presentan los registros de temperatura mínima y media del aire (Cuadro 4) y de precipitaciones (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Registros de temperatura (°C) mínima y media del aire, promedio para el período de 20 y 90 días post-siembra, en los años 1996, 1997 y 1998.

Período (*)		1996	1997	1998
0 - 20	Mínima	5	6	13
	Media	11	12	18
0 - 90	Mínima	5	9	11
	Media	11	15	16

(\*) días post-siembra

**Cuadro 5.** Precipitaciones registradas en el período de 20 días post-siembra, en los años 1996, 1997 y 1998.

1996	13 mm el día 2 y 5 mm el día 15
1997	1 mm el día 4 y 5 mm el día 11
1998	20 mm el día 16 y 20 mm el día 17

En 1996, el año problemático desde el punto de vista sanitario, se registraron temperaturas bajas y lluvias durante el período de implantación (siembra de mayo). Estas condiciones son desfavorables para el crecimiento vegetal y favorables para la ocurrencia de las enfermedades causadas por *Pythium* spp. Hay que tener en cuenta que la variable registrada fue temperatura del aire, por lo tanto es de esperar que el efecto refrigerante de una lluvia sea mayor sobre la temperatura del suelo, ya que este se enfría y demora en elevar su temperatura. De manera que la lluvia no sólo aporta humedad al microambiente sino que además disminuye la temperatura.

Bajo dichas condiciones climáticas, el número de plantas establecidas en la parcela testigo fue muy bajo (14%) y hubo un incremento significativo del porcentaje de implantación y del rendimiento de materia seca por la aplicación del fungicida.

En 1997, los registros de temperatura durante la implantación fueron muy parecidos a los del año 1996; sin embargo, en 1997 dicho período fue más seco, lo que si bien es desfavorable para el crecimiento vegetal, también lo es para el desarrollo de *Pythium* spp. Por esta razón, el nivel de enfermedad no fue importante, y la implantación en el testigo fue de 41%.

En 1998, la temperatura promedio registrada fue alta y las precipitaciones ocurrieron relativamente tarde durante el período crítico de la implantación (siembra de marzo). Estas condiciones climáticas permitieron una rápida y exitosa emergencia de las plántulas, lográndose un 60% de implantación en el testigo.

### CONCLUSIONES

De los tres años de experimentación, sólo en 1996 se dieron las condiciones ambientales favorables para la ocurrencia de enfermedades de implantación: precipitaciones y bajas temperaturas durante los 20 días post-siembra. Por esta razón, se detectaron diferencias muy significativas entre el tratamiento con fungicida y el testigo, registrándose un incremento de 261% en el número de plantas establecidas y de 387% en el rendimiento de materia seca.

En ese año, la inoculación con las cepas de *Pseudomonas* UP61 y UP143 resultó en un mayor número

de plantas y una mayor producción de materia seca por parcela respecto al testigo sin inocular. A pesar de la magnitud de las diferencias registradas, éstas no fueron estadísticamente significativas, probablemente porque los coeficientes de variación fueron altos para las variables analizadas en el experimento.

En 1997 y 1998, la inoculación con *Pseudomonas* no aumentó el número de plantas establecidas pero incrementó el peso seco por parcela, indicando un posible efecto promotor del crecimiento. Este efecto fue particularmente consistente para la cepa UP143, durante los tres años evaluados. No obstante, las diferencias registradas no fueron estadísticamente significativas.

En 1997, la cepa UP143 disminuyó significativamente la población de *Pythium* en el suelo. Debido a que, en ese año, las condiciones no favorecieron el desarrollo de la enfermedad, esta disminución del inóculo presente no resultó en un mayor número de plantas establecidas.

Si bien los resultados fueron variables entre años, se verificaron tendencias que indican un efecto antagónico y promotor del crecimiento vegetal por el uso de las cepas de *Pseudomonas*. Estas tendencias deberán ser estudiadas con mayor profundidad, realizando un mayor número de experimentos por año y asegurando la ocurrencia de «damping-off», de modo de lograr una mejor caracterización de las cepas en el corto plazo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALTIER N. 1996. Impacto de las enfermedades en la producción de pasturas. Montevideo, INIA. Serie Técnica No.80. pp. 47-56.
- ALTIER N. y PASTORINI D. 1988. Curasemillas en leguminosas forrajeras: efecto sobre los rizobios. CIAAB, Est. Exp. La Estanzuela (Uruguay). Hoja de divulgación No. 74. 2p.
- ALTIER N.A. and THIES J.A. 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedling diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Dis.* 79:341-346.
- BAGNASCO P., DE LA FUENTE L., GUALTIERI G., NOYA F. and ARIAS A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30:1317-1322.
- COOK R.J. and ZHANG B.X. 1985. Degrees of sensitivity to metalaxyl within the *Pythium* spp. pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. *Plant Dis.* 69:686-688.
- DE BRUIJN F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- DE LA FUENTE L., BAJSA N., QUAGLIOTTO L., FABIANO E., PÉREZ C., ALTIER N. and ARIAS A. 2000. Interactions among rhizobia and biocontrol agents in forage legumes. In: Pedrosa F. *et al.* (eds.), Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer Academic Press. p. 552
- FALLOON R.E. and SKIPP R.A. 1982. Fungicide seed treatments improve lucerne establishment. *Proc. N. Z. Weed Pest Control Conf.* 35:127-129.
- GEELS F.P. and SCHIPPERS B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopath. Z.* 108:193-206.
- HOWELL C. and STIPANOVIC R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69:480-482.
- KING E.O., WARD M.K. and RANEY D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- LEATH K.T., LUKEZIC F.L., PENNYPACKER B.W., KENDALL W.A., LEVINE R.G. and HILL R.R. 1989. Interaction of *Fusarium avenaceum* and *Pseudomonas viridiflava* in root rot of red clover. *Phytopathology* 79:436-440.
- LEATH K.T., WELTY R.E., PRATT R.G. and SONODA R.M. 1996. Pasture/forage crops and diseases in the United States. In: Chakraborty S. *et al.* (eds.), Pasture and forage crop pathology. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. pp. 33-58.
- LOPER J.E. 1988. Role of fluorescent siderophores production in biocontrol of *Pythium ultimum* by *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78:166-172.
- MARGOT P. 1983. Control of seed-borne diseases with metalaxyl. *Seed Sci. Technol.* 11:921-933.
- O'SULLIVAN D.J. and O'GARA F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant pathogens. *Microbiol. Rev.* 56:662-672.
- SANDERS P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turfgrass in Pennsylvania. *Plant Dis.* 68:776-777.
- SAS INSTITUTE. 1985. SAS/STAT: Language Guide for Personal Computers. Version 6 ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC.
- THOMASHOW L.S. and WELLER D.M. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170:3499-3508.