



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía -Programa de Magister en Ciencias Agronómicas

**Efecto bioactivo de mezclas de extractos triterpénicos y
Pseudomonas para el control de *Gaeumannomyces
graminis var. tritici* en trigo**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agronómicas con
mención en Producción y Protección Vegetal

JONATHAN ANDRÉS GONZÁLEZ CASTILLO
CHILLÁN-CHILE
2016

Profesor Guía: Ernesto Moya Elizondo
Dpto. de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

EFFECTO BIOACTIVO DE MEZCLAS DE EXTRACTOS TRITERPÉNICOS Y
PSEUDOMONAS PARA EL CONTROL DE *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS*
VAR. *TRITICI* EN TRIGO

Aprobada por:

Profesor Asistente, Ernesto Moya E.

Ing. Agrónomo, Mg. C.V., Ph. D.

Profesor Guía

Profesor Asistente, .Ma. Dolores López B.

Lic. en Química, Ph. D.

Evaluador Interno

Profesor Asociado, Gonzalo Silva A.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.

Evaluador Interno

Profesor Asociado, Inés Figueroa C.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.

Directora Programa



AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT de Iniciación N°11110105, “Take all decline” (TAD) and effect of plant extract on bacterial populations associates with this phenomenon in wheat crop fields in South of Chile”. El primer autor, Sr. Jonathan González Castillo, reconoce al programa de Becas Nacionales de CONICYT, por financiar sus estudios de Magíster en Ciencias Agronómicas de la Universidad de Concepción.



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Introducción general	1
Hipótesis	1
Objetivo General	1
Objetivos específicos	1
Literatura citada	2
Capítulo 1. Efecto bioactivo de mezclas de extractos tri- terpénicos y <i>Pseudomonas</i> para el control de <i>Gaeuma- nomyces graminis</i> var. tritici en trigo	3
Resumen	3
Abstract	3
Introducción	4
Materiales y Métodos	6
Resultados	10
Discusión	13
Conclusión	17
Agradecimientos	18
Literatura citada	18
Listado de figuras y tablas	23



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Promedio del recuento bacteriano (u.f.c. mL ⁻¹) de <i>Pseudomonas protegens</i> después de 24 horas de incubación en medio King B enriquecido con distintas concentraciones de saponinas para los extracto de <i>Q. saponaria</i> :Vet Sap® (>90% de saponinas de quillay) y QL1000® (8% de saponinas de quillay).....	23
Figura 2 Promedio del recuento bacteriano (R.B.) para distintas cepas de <i>Pseudomonas protegens</i> crecidas en diferentes concentraciones de saponinas obtenidas a partir de extractos de <i>Q. saponaria</i> (Vet Sap®) en tres tiempos distintos desde su inoculación.....	24
Figura 3 Promedio del recuento bacteriano (R.B.) para distintas cepas de <i>Pseudomonas protegens</i> inoculadas sobre raíces de trigo mezcladas con extracto puro de <i>Q. saponaria</i> rico en saponinas (Vet Sap®) en tres tiempos distintos desde su inoculación. Poblaciones de cepa Pf-5 a concentraciones de <i>Q. saponaria</i> de 7.360 ppm (a) y 3.680 ppm (b) y de Ca-10 en concentraciones de 1.472 ppm de saponinas de <i>Q. saponaria</i> (c).....	25
Figura 4 Observaciones en microscopía electrónica de barrido de superficie de raíces de trigo sin inoculación (a), que fueron inoculadas sólo con <i>Pseudomonas protegens</i> (b) y raíces de trigo tratadas con bacterias en combinación con 7.360 ppm de saponinas de <i>Q. saponaria</i> (c) después de 24 horas. Flecha indica agregación de bacterias y formación de biopelícula o biofilm.....	26

Figura 5 Índice de daño en plantas de trigo infectadas con *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* tratadas con distintas cepas de *Pseudomonas protegens* mezcladas con diferentes concentraciones de un extracto puro rico en saponinas de *Q. saponaria* (Vet Sap®). Los resultados para la cepas Ca-10 (a) y Ch-B7 (b), además se muestran los tratamientos sólo inoculados con las bacterias (0), tratado sólo con extractos de *Q. saponaria* (9.200 ppm) y un control solamente inoculado con *G. graminis* var. *tritici*.....

27

Figura 6 Índice de daño por mal del pie (TAI), causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en plantas de trigo tratadas con distintas cepas de *Pseudomonas protegens* mezcladas con diferentes concentraciones de un extracto puro rico en saponinas de *Q. saponaria* (Vet Sap®). Los resultados son el promedio de las tres cepas utilizadas (Pf-5, Ch B-7 y Ca-10), además se muestran los tratamientos solo inoculado con las bacterias (0), tratadas solo con extractos de *Q. saponaria* (9.200 ppm) y un control solamente inoculado con *G. graminis* var. *tritici*.....

28

Tabla 1 Recuento bacteriano (Log u.f.c. * mL⁻¹) de las tres cepas de *Pseudomonas protegens* crecidas en diferentes concentraciones de extractos de saponinas de *Q. saponaria* Vet Sap®. Las medias de cada tratamiento se compararon con el control crecido en medio King B para obtener el porcentaje de disminución de las u.f.c.....

29



INTRODUCCIÓN GENERAL

El mal del pie del trigo causado por el hongo *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Oliver and Von Arx var. *tritici* Walker (Ggt) produce severas pérdidas en cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L.; Poaceae) a nivel nacional (Andrade *et al.*, 2011) y mundial (Cook, 2003; Kwak *et al.*, 2012). El mal del pie se caracteriza por causar disminución en el rendimiento asociado a pérdida de plantas durante el desarrollo del cultivo, disminución del tamaño y número de espigas, o presencia de grano chupado y menor número de granos. Este daño se asocia a la pudrición y descomposición de las raíces, corona y tallo basal de la planta de trigo y de otros cereales. A pesar de los grandes esfuerzos en términos de investigación y a la cantidad de recursos económicos desplegados para dicho objetivo, actualmente para esta enfermedad no existe un efectivo control (Paulitz *et al.*, 2010). Las saponinas triterpénicas extraídas de *Quillaja saponaria* Mol. (Quillajaceae), (Apablaza y Moya, 2004), árbol siempre verde endémico chileno comúnmente conocido como Quillay (Donoso *et al.*, 2011; Schlotterbeck *et al.*, 2015), al igual que poblaciones de rizobacterias del género *Pseudomonas* productoras de diversos antibióticos como el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), han sido asociadas con la disminución de *G. graminis* var. *tritici* (Cook, 2003). Sin embargo, existen pocos antecedentes de la interacción entre estas bacterias y estos terpenoides naturales y su posible efecto controlador sobre *G. graminis* var. *tritici*.

HIPÓTESIS

El uso en forma combinada de bacterias del genero *Pseudomonas* spp con extractos de *Quillaja saponaria*, disminuye las poblaciones de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) en raíces de trigo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la acción conjunta de bacterias del género *Pseudomonas* productoras de 2,4-DAPG y extractos de saponinas en el control de *G. graminis* var. *tritici* en plantas de trigo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto que presentan extractos triterpénicos de *Q. saponaria* sobre el crecimiento micelial del hongo *G. graminis* var. *tritici* en condiciones *in vitro*.
2. Evaluar el efecto de extractos de *Q. saponaria* sobre las poblaciones de *Pseudomonas* spp. con actividad de control sobre el “mal del pie” en plantas de trigo.

3. Comparar crecimiento de poblaciones de *Pseudomonas* sobre raíces de *Triticum aestivum* L., tratados o no con extractos de *Q. saponaria* ricos en saponinas.

LITERATURA CITADA

Andrade O. 2004. Efectividad de diferentes desinfectantes de semilla sobre la pudrición radical (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) del trigo en el sur de Chile. *Agric Téc* 64:111-126.

Apablaza G, Moya E. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de las saponinas de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) sobre el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Fitopatología* 39 (1): 47.

Cook RJ. 2003. Take-all of wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* 62 (2): 73–86.

Donoso S, Peña K, Pacheco C, Luna G, Aguirre A. 2011. Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de *Quillaja saponaria* y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. *Bosque* 32: 187–195.

Kwak YS, Bonsall RF, Okubara PA, Paulitz TC, Thomashow LS, Weller DM. 2012. Factors impacting the activity of 2,4-diacetylphloroglucinol- producing *Pseudomonas fluorescens* against take-all of wheat. *Soil Biol Biochem* 54 (7): 48-56.

Paulitz TC, Schroeder KL, Schillinger WF. 2010. Soilborne Pathogens of cereals in an irrigated cropping system: effects of tillage, residue management, and crop rotation. *Plant Dis* 94: 61-68.

Schlotterbeck T, Castillo–Ruiz M, Cañon–Jones H, San martin R. 2015. The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (Molina) plantations as a new source of saponins. *Economic Botany* 69 (3): 262-272.

CAPÍTULO 1

Efecto bioactivo de mezclas de extractos triterpénicos y *Pseudomonas* para el control de *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici* en trigo

Bioactive effect of triterpene extracts and mixtures of *Pseudomonas* to control *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici* on wheat

Jonathan A. González-Castillo¹, Tamara P. Quezada-D'Angelo¹, Gonzalo I. Silva Aguayo¹ y Ernesto A. Moya-Elizondo¹

¹Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Concepción, Dpto. de Producción y Protección Vegetal, email: emoya@udec.cl

Resumen

Extractos ricos en saponinas de *Quillaja saponaria* Mol. , al igual que poblaciones de rizobacterias del género *Pseudomonas* que producen compuestos antimicrobiales, han sido asociadas con la disminución del hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* , agente causal de mal del pie de trigo y responsable de severas pérdidas en cultivos de trigo a nivel mundial. Sin embargo, no existen antecedentes de la interacción entre estas bacterias y estos triterpenoides naturales. Se determinó que los extractos de quillay Vet Sap® y QL1000® tuvieron un efecto diferencial, de acuerdo a su pureza, sobre *Pseudomonas protegens* productoras de 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG). En plántulas de trigo, Vet Sap® no afectó las poblaciones bacterianas de tres cepas de las bacterias antagonistas. Las cepas de *P. protegens* tuvieron una actividad antagonista variable en plantas de trigo, manteniendo su actividad de control sobre el hongo al combinarla con diferentes concentraciones de saponinas a partir de un extracto puro de quillay. Estos resultados sugieren considerar el uso de mezclas de ambos compuestos en el desarrollo de un biopesticida para el control de *G. graminis* var. *tritici*.

Palabras claves: *Quillaja saponaria*, saponinas, *Pseudomonas protegens*, biofungicida.

Abstract

Extracts rich in saponins from *Quillaja saponaria* Mol. and populations of rhizobacteria of the genus *Pseudomonas*, which produce antimicrobial compounds, have been associated with reduction of the fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, causal agent of take-all disease, which is responsible for severe losses in wheat crops worldwide. However, there is not antecedent of the interaction between these bacteria and these natural triterpenoids. It was determined that quillaja extracts Vet SAP® and QL1000® had a differential effect according their purity on *Pseudomonas*

protegens 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)-producers. On wheat seedlings, Vet SAP® did not affect the antagonistic bacterial populations of the three bacterial strains assessed. Strains of *P. protegens* had a variable antagonist activity in wheat plants, and keeping the control over the fungus when were combined with different concentrations of the pure quillaja extract. These results are promising to use mixtures of the bacterial and plant extract in developing a biopesticide to control of fungus *G. graminis* var. *tritici*.

INTRODUCCIÓN

Entre los extractos vegetales ricos en saponinas que han sido utilizados para el control de hongos están los obtenidos a partir del quillay (*Quillaja saponaria* Mol.; Quillajaceae), el cual es un árbol siempre verde endémico chileno que se distribuye entre las regiones de Valparaíso (30° S) y de la Araucanía (38° S) (Schlotterbeck *et al.*, 2015). El quillay es rico en saponinas bidesmosídicas (dos cadenas de azúcar en la molécula) en su corteza, tronco y hojas (Donoso *et al.*, 2011; Schlotterbeck *et al.*, 2015). Las saponinas son metabolitos secundarios triterpénicos que se producen constitutivamente en un gran número de especies de plantas y que a menudo tienen actividad antifúngica (Morrissey y Osbourn, 1999; Mert-Türk, 2005; Ahmed *et al.*, 2012). Diversos estudios han demostrado el efecto moderado de control de los extractos de *Q. saponaria* sobre distintas especies de oídio (Apablaza *et al.*, 2002; Moya *et al.*, 2010), así como también sobre otros hongos patógenos como *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Ribera *et al.*, 2008) y *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Oliver and Von Arx var. *tritici* Walker (Apablaza y Moya, 2004).

El mal del pie es una enfermedad causada por el hongo ascomycete *G. graminis* var. *tritici* que produce severas pérdidas en cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L.; Poaceae) en Chile (Andrade *et al.*, 2011) y a nivel mundial (Cook, 2003). Este hongo causa disminución en el rendimiento asociado a pérdida de plantas durante el desarrollo del cultivo, disminución de su tamaño y del número de espigas, o presencia de grano chupado y menor número de estos. Este daño se asocia a la pudrición y descomposición de las raíces, corona y tallo basal de la planta de trigo y de otros cereales. (Paulitz *et al.*, 2010). *G. graminis* var. *tritici* habita naturalmente el suelo y llega a infestar el cilindro vascular del tallo reduciendo la absorción de agua y nutrientes de la planta, causando espigas blancas en la floración y la maduración prematura o muerte de la planta (Pillinger *et al.*, 2005; Paulitz *et al.*, 2010).

El mal del pie se describió por primera vez en el sur de Australia hace más de 150 años (Andrade, 2004), pero a pesar de los grandes esfuerzos en términos de investigación y a la cantidad de recursos económicos desplegados para dicho objetivo aún no ha sido posible controlarlo con éxito (Paulitz *et al.*, 2010). La mayoría de las variedades cultivadas son susceptibles a la enfermedad (Kwak *et al.*, 2012), por lo cual los manejos de esta enfermedad se limitan a la elección

de variedades menos susceptibles, fertilización equilibrada, rotación de cultivos y uso de algunos tratamientos de semillas con fungicidas químicos (Cook, 2003; McSpadden *et al.*, 2001). Los fungicidas a base de ingredientes activos como fenbuconazol, fluquinconazole, nuarimol, silthiofam, triadimefon, triadimenol y triticonazol no han sido capaces de controlar la enfermedad y sólo retrasan o disminuyen la infección causada por *G. graminis* var. *tritici* (Cook, 2003; Andrade, 2004; Vera *et al.*, 2014).

Diferentes agentes microbianos con actividad antagónica hacia *G. graminis* var. *tritici* han sido descritos (Souza *et al.*, 2003; Cook, 2003; Park *et al.*, 2011). Entre estos, bacterias del género *Pseudomonas* spp., que habitan la rizósfera del trigo, han sido estudiadas en profundidad por su nivel de control sobre *G. graminis* var. *tritici* y otros hongos patógenos que causan pudriciones radicales en trigo como *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Fusarium* (Couillerot *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Mavrodi *et al.*, 2012). Las bacterias del género *Pseudomonas* producen metabolitos con efecto antifúngicos como el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), ácido cianhídrico, pioluteorina, pirrolnitrina y derivados de fenacina (Dubuis y Haas, 2007; Weller *et al.*, 2007; Kwak *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito la presencia de bacterias *Pseudomonas* productoras de 2,4-DAPG en suelos del sur de Chile (Moya-Elizondo *et al.*, 2013). Las bacterias productoras de 2,4-DAPG son una promisoría fuente para el desarrollo de inoculantes para semillas para el control de enfermedades, aunque este compuesto presenta una alta inestabilidad en la rizósfera (Kwak *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el uso comercial de alguna de estas cepas requiere de una investigación exhaustiva en el proceso de formulación como biopesticida, el cual podría requerir de compuestos naturales que afecten al patógeno en cuestión y que además favorezcan el crecimiento de poblaciones bacterianas benéficas en la rizósfera. No obstante el impacto potencial que tienen los extractos de *Q. saponaria* ricos en saponinas en el control de hongos como *G. graminis* var. *tritici*, a la fecha no existen estudios que evalúen el efecto directo de estos compuestos sobre poblaciones de *Pseudomonas* y su efecto conjunto asociadas a la disminución del hongo patógeno en plantas de trigo. Esto último es importante, si se considera que el uso en forma combinada de bacterias del género *Pseudomonas* spp. con extractos de saponinas podrían permitir el desarrollo de un biofungicida que disminuya las poblaciones de *G. graminis* var. *tritici* que pueden afectar las raíces del trigo. Basado en lo anterior, en esta investigación se evaluó el efecto bioactivo de extractos de *Q. saponaria* ricos en saponinas mezclados con cepas de *P. protegens* sobre el hongo *G. graminis* var. *tritici* en plantas de trigo. Para ello se determinó *in vitro* el efecto que presentan extractos triterpénicos de *Q. saponaria* sobre el crecimiento micelial del hongo *G. graminis* var. *tritici* y sobre las poblaciones de *Pseudomonas* spp. con actividad de control sobre el mal del pie. Además,

se comparó el crecimiento de poblaciones de *Pseudomonas* sobre raíces de trigo, tratadas o no con extractos de *Q. saponaria* ricos en saponinas, y el efecto de estas mezclas sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

Se utilizaron los productos QL1000® (Desert King Chile, Quilpué, Chile) que es un extracto rico en saponinas de *Q. saponaria*, que tiene una concentración de saponinas >8% (p/p) y el producto Vet Sap® (Desert King Chile Ltda., Quilpué, Chile) que es un extracto concentrado de saponinas de *Q. saponaria* con una concentración >90% (p/p) de saponinas determinado por HPLC (San Martín y Briones, 2000).

Se utilizaron tres cepas de *Pseudomonas protegens* productoras de 2,4-DAPG, como es la cepa Pf-5 (Brodhagen *et al.*, 2004), o que tienen el gen *phlD*+ asociado a la producción de este compuesto (Cepas Ch-B7 y Ca-10). Las poblaciones de las cepas Ch-B7 y Ca-10 se aislaron de raíces de trigo de predios muestreados entre las regiones de la Araucanía y de los Lagos (Moya-Elizondo *et al.*, 2013), mientras que la cepa Pf-5, fue facilitada gentilmente por el Dr. Brian McSpadden de Ohio State University, Estados Unidos. Además, se trabajó con el aislado patogénico del hongo *G. graminis* var. *tritici* aislado Oso1, obtenido de plantas de ballica (*Lolium perenne* L.) de la localidad de Osorno, Región de los Lagos, y que presenta un alta agresividad en trigo.

Bioactividad de los extractos de quillay sobre cepas benéficas de *Pseudomonas protegens*.

Aislamientos puros de las tres cepas bacterianas mencionadas anteriormente se sembraron en placas Petri con medio King B y se obtuvieron colonias puras, las cuales se sembraron en tubos individuales con 10 mL de caldo King B, para ser incubadas a 24 °C en agitación continua a 150 rpm por 24 a 72 h. Al final de la incubación, se tomaron 50 µL de las colonias de bacterias crecidas, las cuales se colocaron en celdas de microplacas de ELISA que contenían 200 µL de medio King B a concentraciones de 0; 200, 400, 800 y 8.000 ppm de cada extracto de quillay. Se midió la densidad óptica a 600 nm en un lector de microplacas (RaytoRT-2100C) una vez establecido el experimento y después de 24 h. Los controles de corrección espectrofotométrica fueron celdas con las distintas concentraciones de los extractos de *Q. saponaria*, considerando reemplazar los 50 µL de bacterias por medio King B esterilizado. Cada concentración y cada control se repitieron tres veces para cada tratamiento, utilizándose una placa para cada extracto de *Q. saponaria*.

Paralelamente, el contenido de los tubos se diluyó de forma seriada en microplacas de ELISA, obteniéndose diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de las suspensiones bacterianas en caldo King B. Desde dichas diluciones se sembraron tres microgotas de 10 uL de cada dilución, sobre un cuadrante de una placa de Petri con medio agar King B; dichas placas se incubaron a 24° C para determinar la concentración inicial de bacterias mediante un conteo de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) después de 24 h desde la siembra. Adicionalmente, se consideró realizar un conteo de u.f.c. después de la lectura espectrofotométrica realizada a las 24 h a partir de las bacterias que crecieron en las distintas concentraciones descritas de los extractos, siguiendo la metodología ya descrita. Cada experimento se repitió tres veces en el tiempo.

Para validar el efecto de las saponinas de *Q. saponaria* sobre el crecimiento de bacterias *P. protegens* y su efecto en la actividad antagonista que estas presentan sobre *G. graminis* var. *tritici* se crecieron las tres cepas bacterianas (10^5 u.f.c. inicial) en tubos de 1,5 mL con diferentes concentraciones de saponinas de *Q. saponaria* (0, 1.840, 4.600 y 9.200 ppm) del extracto puro Vet Sap® en agua más un control de bacterias creciendo en medio King B por 24, 48 y 72 h de incubación de forma separada. Para cada tiempo, a partir de cada población bacteriana que se mantuvo en las distintas concentraciones evaluadas, se tomó una alícuota de 10 µL la cual se colocó sobre un cuadrante de una placa de Petri con un medio APD más King B, que contenía un trozo de 5 mm de diámetro de *G. graminis* var. *tritici* aislado Oso1, que había sido crecido previamente en placas de Petri con agar papa dextrosa (APD) por 7 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ en una cámara de incubación. El hongo junto a las bacterias tratadas con las diferentes concentraciones de saponinas fue crecido por 4 días, midiéndose el crecimiento micelial con una regla desde el borde de trozo de micelio hasta el punto donde fue inoculada las bacterias. Adicionalmente, las bacterias crecidas en las diferentes concentraciones de saponinas después de 24 h se centrifugaron por 2 min a 3000 rpm y se extrajo el sobrenadante para luego resuspenderlas dos veces en agua destilada estéril, para posteriormente realizar el conteo de u.f.c como se describió anteriormente. Este antecedente buscó determinar el efecto directo sobre las bacterias antagonistas de las concentraciones de saponinas de *Q. saponaria* que se utilizarían en los experimento *in planta* que se describen a continuación.

Evaluación *in vitro* de actividad de extractos saponínicos sobre bacterias antagonistas a *G. graminis* var. *tritici* en plantas de trigo.

Semillas de trigo cv. Pandora-INIA se esterilizaron durante 1,5 min en hipoclorito de sodio al 0,5%, en constante agitación, seguido por 6 lavados con agua destilada estéril (ADE) (3 min cada uno) bajo campana de flujo laminar. Luego se germinaron en placas de Petri sobre una superficie de papel absorbente humedecido y cuando emitieron su radícula se pusieron cuatro plantas

individuales en cada cuadrante de una placa de Petri de 15 cm de diámetro con medio agar agua, dejándolas crecer hasta que las raíces alcanzaron al menos 1 a 2 cm. Las tres cepas bacterianas de *P. protegens* se pusieron a crecer previamente en un tubo de 10 mL de caldo King B a 24 °C por 48 h. La muestra de bacterias después de la incubación se diluyó en forma seriada en tubos Eppendorf con 900 µL de agua destilada estéril, para determinar las u.f.c. iniciales mediante inoculación de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} en medio agar King B utilizando la técnica de tres microgotas descrita arriba. La concentración de cada bacteria en una dilución de 10^{-4} se centrifugó a 3000 rpm por 10 min para eliminar el sobrenadante y resuspender las bacterias en ADE. A partir de la suspensión de cada bacteria se tomaron 200 µL y se mezclaron con 800 µL de extractos rico en saponinas de quillay Vet Sap® a concentraciones de 0, 1.840, 4.600, y 9.200 ppm de saponinas de quillay. Luego las mezclas resultantes de 0, 1.472, 3.680 y 7.360 ppm de saponinas se pusieron separadamente sobre las raíces de cada plántula de trigo previamente crecidas que estaban dentro de las placas de Petri de 15 cm. Tres raíces de cada plántula se inocularon en un punto con 20 µL de la mezcla, el cual se dejó incubar a 24°C por 24, 48 y 72 h respectivamente. Después de cada tiempo de incubación, y a partir de cada raíz, se cortaron tres trozos de 1 mm de largo desde un punto de la raíz que fue inoculado con las mezclas de *Pseudomonas* y saponinas. Estos trozos se colocaron en celdas con 100 µL de medio King B, para ser incubadas a 24°C por 24 h, para luego ser sembrados sobre una placa de Petri con medio agar King B para obtener el conteo final de u.f.c de las bacterias usando la técnica de las tres gotas descrita arriba. Cada tratamiento se repitió tres veces y el experimento se replicó tres veces.

Adicionalmente, se observó el crecimiento de bacterias *Pseudomonas* sobre raíces de trigo cv. Pandora-INIA mediante microscopía electrónica. Las semillas se esterilizaron y germinaron según el protocolo antes descrito. Las semillas se pusieron en placas de Petri con medio agar-agua, depositando una semilla por placa. Paralelamente se tomaron 600 µL de suspensión bacteriana a una dilución de 10^{-4} y se mezclaron con 2.400 µL de extractos rico en saponinas de *Q. saponaria* Vet Sap®, obteniendo una concentración de 7.360 ppm de saponinas. Las raíces de trigo se inocularon individualmente con los 3 mL de las mezclas de *Pseudomonas* y *Q. saponaria*. Además se usó un tratamiento sólo con bacterias y un control con agua destilada estéril. Las placas se mantuvieron en constante agitación por 24 h para luego ser puestas nuevamente en incubación a 24°C por 24 h. Los tubos con trozos de raíces de trigo tratadas se prepararon en triplicado y se incubaron por 5 días, para ser fijados en 2,5% glutaraldehído 0.1M fosfato buffer (pH 7.2) por una hora a 4°C y post fijado en 1% de tetraóxido de osmio en el buffer por una hora. Las muestras se deshidrataron en una serie de gradientes de alcohol etílico, seguido de dos cambios de óxido de propileno, hasta alcanzar un punto crítico de secado y ser cubiertas con oro. Las secciones fueron

examinadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6380LV SEM en el Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción.

Evaluación *in vivo* de actividad de control de mezclas de extractos saponínicos y bacterias antagonistas sobre *G. graminis* var. *tritici*.

Macetas individuales de PVC de 28 mm de diámetro x 200 mm de largo se llenaron con 180 g de suelo serie Chillán, que había sido tamizado (2 mm de grano), esterilizado e inoculado previo a la siembra con dos granos de avena infestados con *G. graminis* var. *tritici* aislado Oso1. Cada grano de inóculo se colocó 10 y 5 cm de la superficie superior de la maceta. Cada maceta se sembró con una semilla de trigo cv. Pandora (INIA, Chile), previamente germinada, a una profundidad de 1,5 cm. Las semillas pre-germinadas se inocularon en la siembra con los tratamientos, que consistieron en las tres cepas bacterianas tratadas con 0, 1.840, 4.600 y 9.600 ppm de saponinas puras obtenidas de Vet Sap®. Estos tratamientos se aplicaron a las semillas pregerminadas inoculando con 500 µL de una suspensión individual de 10^8 u.f.c por mL de cada una de las cepas bacterianas en estudio, que fueron crecidas como se describió anteriormente, y 100 µL de las distintas concentraciones de extractos triterpénicos de saponinas de *Q. saponaria*. Se consideraron controles inoculado y no inoculados con el hongo, a los cuales se agregaron 600 µL de ADE, además de un control inoculado que se trató sólo con Vet Sap® a una concentración de 9.200 ppm de saponinas de *Q. saponaria* y que recibió 500 µL de ADE en reemplazo de la bacteria. Las macetas tratadas se mantuvieron en una sala de crecimiento en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y fotoperiodo de 14:10 horas día: noche, entregadas mediante luz LED rojo 630-660 nm, amarillo 615 nm y azul 460-490 nm. En total cada tratamiento tuvo 6 repeticiones, siendo cada maceta la unidad experimental. Las macetas se regaron tres veces por semana, siendo fertilizadas una vez cada dos semanas con 5 mL de solución nutritiva comercial (12% N; 4% P; 7% K, Best Garden®) por cada maceta. El experimento se replicó 3 veces en el tiempo.

Las plantas se mantuvieron en crecimiento durante 45 días, luego en las raíces de cada planta se evaluó el nivel de infección mediante la determinación de un índice de daño de *G. graminis* var. *tritici* según la escala propuesta por Freeman *et al.* (2005) donde 0 = no hay raíces infectadas, 1 = hasta un 10% de raíces infectadas, 2= 11-25% de raíces infectadas, 3 = 26-50% de raíces infectadas, 4= 51-75% de raíces infectadas y 5= 76-100% de raíces infectadas. Basándose en los valores obtenidos de índice de daño se calculó un índice del mal del pie (take-all index [TAI]) de cada tratamiento mediante la siguiente fórmula: $\text{TAI} = [(0 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 0) + (10 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 1) + (25 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 2) + (50 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 3) + (75 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 4) + (100 \times \text{n}^\circ \text{ plantas valor } 5)] / \text{Total de plantas}$.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron en la normalidad de su distribución mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos que no presentaron normalidad en su distribución, su valor se transformó a logaritmo. Para determinar diferencias entre cada una de las réplicas de los experimentos se utilizó la prueba F, de no encontrar diferencias ($p \leq 0,05$), los resultados obtenidos en cada réplica del experimento se promediaron de lo contrario, se analizaron cada experimento por separado. Para analizar el efecto de los extractos saponínicos sobre *Pseudomonas* tanto *in vitro* como *in vivo* y el control que ejercieron sobre *G. graminis* var. *tritici* las mezclas de extractos ricos en saponinas de *Q. saponaria* con *Pseudomonas* en plantas de trigo, se utilizó análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias entre tratamientos mediante la prueba Tukey ($p < 0,05$). De no existir normalidad en los datos aún transformados, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS

Bioactividad de los extractos de quillay sobre cepas benéficas de *Pseudomonas protegens*

Los resultados promedios del recuento bacteriano (Figura 1) después de 24 h de crecimiento, mostraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones evaluadas para ambos extractos de quillay ($P \leq 0,05$) pero no entre las bacterias. El crecimiento bacteriano promedio de las cepas fue similar entre las concentraciones de 0 y 800 ppm de saponinas, mientras que la concentración de 8.000 ppm de Vet Sap® redujo en promedio un 36% las u.f.c. mL⁻¹ y en un 16,2% los valores de absorbancia, en tanto que para QL1000® no se aislaron colonias vivas. Además, cabe consignar que en la concentración de 8.000 ppm de saponinas se produjo un precipitado en el fondo de la celda de las microplacas, lo que se tradujo en que las lecturas de absorbancia fueran inválidas (valores de lectura, menores al control).

En promedio el extracto puro de saponinas de *Q. saponaria* Vet Sap® disminuyó de forma significativa el crecimiento bacteriano de *P. protegens* en 63,1% al ser crecidas en concentraciones de 1.840 ppm de saponinas de *Q. saponaria* durante 24 h con respecto al control (medio King B), pero esta disminución fue menor a la observada en el tratamiento 0 ppm, que alcanzó una disminución del 78,3%, a pesar que las bacterias fueron crecidas sólo en ADE (Tabla 1). No obstante lo anterior, al analizarlos por cepa bacteriana en forma individual, esta tendencia se observó sólo en la Cepa Ch-B7, ya que las otras dos mostraron que la adición de saponinas de *Q. saponaria* no afectó el crecimiento poblacional de las bacterias antagonistas (77,8% para 0 ppm;

57,3% para 1.840 ppm; 49,7% para 4.600 ppm; 27,9% para 9.200 ppm (Tabla 1)). Al comparar el crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones del extracto de saponinas de *Q. saponaria* (0, 1.840, 4.600 y 9.600 ppm de saponinas) en distintos momentos de evaluación (24, 48 y 72 h) se observó una disminución del recuento bacteriano para todas las concentraciones evaluadas con respecto al conteo inicial de u.f.c. $1,7 \times 10^6$ (Figura 2). Esta disminución fue marcada a las 24 h, estabilizándose a las 48 h para mantenerse a las 72 h, no encontrándose diferencias significativas entre los tres tiempos ni tampoco entre las concentraciones de saponinas de *Q. saponaria* en cada tiempo ($P > 0,05$), a pesar que se observó una disminución más linealizada en las concentraciones de 4.600 y 9.200 ppm de saponinas, mientras el tratamiento sin saponinas y el de menor concentración (1.840 ppm) presentaron una caída más marcada (Figura 2). Además, tampoco se observó una variación de la actividad controladora por parte de cepas de *P. protegens* sobre *G. graminis* var. *tritici* en ensayos realizados *in vitro* después de ser crecidas en diferentes concentraciones de extractos puros de saponinas de *Q. saponaria* Vet Sap®, ya que se observó que las bacterias mantuvieron su actividad antagonista deteniendo el crecimiento micelial del hongo unos 5 a 7 mm antes de entrar en contacto con la colonia bacteriana.

Evaluación *in vitro* de actividad de extractos saponínicos de quillay sobre bacterias benéficas en raíces de trigo.

El tiempo transcurrido entre las tres réplicas de los experimentos no influyó en la respuesta de los tratamientos [0, 1.472, 3.680 y 7.360 ppm] (valor $p > 0,05$), por lo cual, las tres replicas se usaron como un único set de datos para analizar cada momento de evaluación (24, 48 y 72 h) y para cada cepa bacteriana (Pf-5, Ca-10 y Ch-B7). El extracto comercial de saponinas Vet Sap® proveniente de *Q. saponaria* al ser aplicado sobre la raíz no presentó actividad antagonica sobre el crecimiento de poblaciones de *P. protegens* en ninguna de las cuatro concentraciones no encontrándose diferencias significativas entre estas concentraciones, cepas y tiempo de evaluación al considerar las tres réplicas del experimento. Sin embargo, al analizar el recuento bacteriano a lo largo de los tiempos de evaluación (Concentración vs. Tiempo de evaluación), se observó una variación en el comportamiento individual de las cepas inoculadas sobre raíces de trigo al ser tratadas con las distintas concentraciones de quillay ($p < 0,05$). Las raíces de trigo no tratadas con el extracto rico en saponinas de *Q. saponaria* no presentaron diferencias en las u.f.c. para ninguna de las tres bacterias evaluadas y en los tres tiempos de medición considerados. Por su parte, la cepa Pf-5 a una concentración de 7.360 ppm de saponinas mostró una población de u.f.c. significativamente menor a las 24 h con respecto a de las 72 h. Siendo la población bacteriana observada a las 48 h intermedia y no diferente de la medición obtenidas a las 24 y 72 h (Figura 3, a). La reducción de u.f.c.

observada a las 24 horas fue un 35,4% menor con respecto a la medición inicial (hora 0), y a su vez fue superada en un 102% a las 72 h. Pf-5 en la concentración de 3.680 ppm de saponinas descendió levemente a las 24 h (8,7%) y llegó a una reducción del 39,5% en la población bacteriana observada a las 48 h con respecto a la medición inicial (hora 0), para recuperarse a las 72 h desde su inoculación (Figura 3, b). La cepa Ca-10, por su parte, mostró un aumento en el recuento bacteriano a las 72 h en la concentración de 1.472 ppm de extracto saponínico semipuro de *Q. saponaria*, alcanzando un 64,7% más de u.f.c. con respecto a las mediciones realizadas a las 24 y 48 h (Figura 3, c), las cuales estuvieron cercanas de la medición inicial de u.f.c. con que se inocularon cada punto de raíz ($2,14^{-7}$ u.f.c.). Mientras, la cepa Ch-B7 no mostró diferencias entre los tres tiempos de mediciones para ninguna de las concentraciones de *Q. saponarias* evaluadas. Mediante microscopía electrónica de barrido se pudo observar que las cepas de *P. protegens* se asentaron al inocularse sobre la superficie de las raíces de trigo después de 24 h (Figura 4), pero al ser aplicada sin el extracto de *Q. saponaria* se observó una población de bacterias más compacta y densa formando una biopelícula o biofilm que las agrupaba (Figura 4, b), mientras que al mezclar las bacterias con los extractos ricos en saponinas de *Q. saponaria* se observó una disminución de las poblaciones de bacterias con una menor compactación sobre la superficie de la raíz, asociada a una menor agregación de las bacterias bajo una biopelícula (Figura 4, c).

Evaluación *in vivo* de actividad de extractos saponínicos sobre bacterias antagonistas a *G. graminis* var. *tritici* en plantas de trigo.

Al analizar el índice de daño de *G. graminis* var. *tritici* sobre plantas de trigo inoculadas con diferentes cepas de *P. protegens* se mezclaron con distintas concentraciones de extracto de *Q. saponaria* (0, 1.840, 4.600 y 9.200 ppm), se observó diferencias significativas para cada cepa bacteriana ($P < 0,05$); además, todos los tratamientos inoculados fueron infestados por el hongo y presentaron un daño estadísticamente diferente del tratamiento no inoculado. En el caso de los tratamientos con la cepa Pf-5 no se detectaron diferencias en las combinaciones con distintas concentraciones del extracto saponínico para el daño causado por *G. graminis* var. *tritici* al igual que con respecto al tratamiento donde sólo se inoculó con una concentración de 9.200 ppm. de saponinas. La cepa Ca-10 presentó una disminución en el índice de daño tanto en el tratamiento inoculado solamente con la cepa bacteriana como con las tres concentraciones de saponinas de *Q. saponaria* (1.840, 4.600 y 9.200 ppm) con respecto al tratamiento inoculado sólo con el hongo ($P < 0,05$) (Figura 5, a). Por su parte la cepa Ch-B7 presentó una disminución significativa del daño producido por el hongo sobre las plantas de trigo al ser combinadas con 1.840 y 4.600 ppm de saponinas de *Q. saponaria* con respecto al resto de los tratamientos inoculados, disminuyendo el

índice de daño de un valor promedio de 4 para el testigo inoculado con *G. graminis* var. *tritici* a 2,7 para la concentración de 1.840 ppm, siendo esta la máxima disminución alcanzada en este experimento (Figura 5, b). Los valores obtenidos en las tres cepas se unieron para calcular el índice TAI, determinándose una disminución significativa de la enfermedad con respecto al control inoculado al tratar la semilla pregerminada sólo con las *P. protegens*, como también al mezclar éstas con las tres concentraciones de saponinas (1.840, 4.600 y 9.200 ppm) (Figura 6). El uso de una concentración de 9.200 ppm de saponinas de *Q. saponaria* sin las bacterias para controlar el mal del pie no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control inoculado con el hongo para ninguna de las cepas evaluadas.

DISCUSIÓN

Muchas saponinas son consideradas compuestos antimicrobiales que forman parte del sistema de defensa de ciertas plantas (Morrissey y Osbourn, 1999; Sherif *et al.*, 2009), por lo que podría esperarse que ejercieran dicha actividad sobre bacterias que habitan la rizósfera y filósfera de las plantas. Por otra parte, varias especies de plantas tienen asociaciones simbióticas con bacterias que aportan en su defensa al control de enfermedades y mejoran sus funciones fisiológicas (Sivasakthi *et al.*, 2014). En este estudio, el uso de extractos puros de *Q. saponaria* (QL 1000®) mostró un mayor efecto bactericida a medida que aumentaron las concentraciones de *Q. saponaria*, lo cual pudo deberse a la menor pureza de este extracto, observándose que a una concentración de 8.000 ppm de saponinas se produjo un precipitado en el fondo de la celda de las micropelículas, que pudo deberse a la presencia del preservante benzoato de sodio (1 g L^{-1}) y otros sólidos en la composición de QL1000®. El extracto puro de saponinas (Vet Sap®) no presentó esta tendencia, por lo que se consideró para los estudios en raíces de trigo. En este último, las poblaciones de *P. protegens* fueron afectadas levemente por las concentraciones entre 0 y 8.000 ppm en condiciones *in vitro*, manteniendo su actividad antagonista sobre el hongo después de haber estado en contacto con el extracto de *Q. saponaria*, esto se ve reforzado con el hecho que bacterias *P. protegens* que se cultivaron por 24, 48 y 72 h en concentraciones de 1.840, 4.600 y 9.200 ppm de saponinas de *Q. saponaria* no perdieron su actividad inhibitoria sobre el crecimiento del hongo en los ensayos realizados *in vitro*.

Las bacterias antagonistas se vieron afectadas levemente por concentraciones entre 1.472 y 7.360 ppm de saponinas de *Q. saponaria* al ser colocadas sobre raíces de plántulas de trigo y evaluadas en tres diferentes tiempos de muestreo (24, 48 y 72h). En general, poblaciones de *P. protegens*, cuando se inocularon sin extractos de saponinas, formaron una biopelícula que contenía una alta concentración de poblaciones bacterianas sobre las raíces de trigo, lo cual no se observó al mezclarlas con distintas concentraciones de extracto puro rico en saponinas después de 24 h de

cultivo. Ante la presencia de saponinas de *Q. saponaria* se observó una disminución en el número de bacterias *P. protegens*, lo cual fue concordante con las lecturas de u.f.c. que se observaron después de 24 h desde su inoculación sobre las raíces de trigo mezcladas con igual concentración de saponinas (7.360 ppm) en la cepa Pf-5.

La evaluación del crecimiento bacteriano en dosis de saponinas de *Q. saponaria* entre 200 y 9.200 ppm estuvo asociado a pesquisar en un rango amplio de concentraciones el efecto que tienen estas moléculas sobre las bacterias *P. protegens*, considerando que su mezcla con extractos de *Q. saponaria* obligaría a desarrollar un biopesticida donde se concentren estas bacterias y las saponinas del extracto para aplicarlas como un tratamiento a las semillas, que es la forma comercial de aplicar un fungicida para el control de enfermedades radicales como el mal del pie. Es sabido que el efecto antifúngico de los extractos comerciales de *Q. saponaria* Vet Sap® y QL1000® contra *G. graminis* var. *tritici* tienen un efecto *in vitro* a concentraciones de 50 a 500 ppm, rangos en que produce una deformación de las hifas, adelgazamiento de micelio y roturas en las membranas de unión de los cordones miceliales entre hifas en este hongo, como ha sido reportado por Apablaza *et al.* (2002 y 2008). Dicho efecto se explicaría por la presencia de saponinas triterpénicas que tienen una actividad fungicida a través de una acción membranolítica de los esteroides presentes en las membranas celulares de los hongos (Osbourn *et al.*, 1996; Apablaza *et al.*, 2002 y Ribera *et al.*, 2008). Las propiedades antifúngicas de las saponinas son atribuidas a las agliconas que estas moléculas presentan y que tienen la capacidad de formar un complejo con los esteroides que conforman las membranas celulares de los hongos, causando la formación de poros y la pérdida de la integridad de esta membrana (Osbourn, 2003). Sin embargo, al colocar este compuesto en las semillas las concentraciones de este deben difundir a medida que las raíces se desarrollan o pueden perderse debido a los riegos o precipitaciones, lo cual obliga a colocar concentraciones altas del extracto al tratar una planta de trigo, y fue la razón por lo que se evaluó a concentraciones entre 1.840 y 9.200 ppm de saponinas en los experimentos en maceta.

Estos resultados sobre *P. protegens* sugieren que el extracto crudo o menos refinado presentaría una actividad antimicrobiana variable como ha sido reportado por Sen *et al.* (1998) y Sherif *et al.* (2009). Esta diferencia entre ambos extractos, puede deberse a que QL1000® tiene una menor pureza en su composición (> 8 % p/p de saponinas), presentando otras sustancias que podrían haber afectado el crecimiento de *Pseudomonas*, como polifenoles, sales y azúcares simples (San Martín y Briones, 2000) que pueden presentar actividad antimicrobiana (Negri *et al.*, 2014).

La propiedad antibacteriana presente en las saponinas depende de factores como la concentración y la fuente de donde se extraen las saponinas (Sen *et al.*, 1998). Por ejemplo, se conoce que diferentes extractos de tipo comercial ricos en saponinas tienen diferente actividad

antibacteriana, en algunos casos teniendo una baja actividad antibacterial sobre bacterias gram-negativas como *Escherichia coli* (Sen *et al.*, 1998; Sherif *et al.*, 2009); esto concuerda con lo obtenido en el presente estudio donde los extractos ricos en saponinas de *Q. saponaria* no disminuyeron las poblaciones de *P. protegens*, las cuales al ser protobacterias gram-negativas parecieran no verse afectadas por los extractos. Es posible que estas concentraciones de saponinas o los restos de aglicona, que son los responsables de la aparición de poros en la membrana celular causen un aumento en la permeabilidad de las células que conducen al mejoramiento del transporte de nutrientes en células bacterianas (Sen *et al.*, 1998). Sin embargo, tampoco se observó un aumento de las poblaciones de *P. protegens* en ninguna de las concentraciones de saponinas evaluadas (0, 1.472, 3.680 y 7.360 ppm) al analizar cada día por separado. No obstante lo anterior, si se observó un aumento de poblaciones bacterianas después de 72 h de incubación en las concentraciones de 3.680 y 7.360 ppm de extractos saponínicos de *Q. saponaria* para la cepa Pf-5 mientras que la cepa Ca-10 aumentó su número de colonias en concentraciones de 1.472 ppm. Esto sugiere que el tiempo de medición pudo no ser suficiente para capturar este cambio en las poblaciones o que la bacteria requiere de un cierto tiempo para activar algunos mecanismos que permitan usar para su desarrollo la molécula de saponina que contiene azúcares, los cuales son producidos al hidrolizar los enlaces glucosídicos a través de glicosidasas poco específicas (Sen *et al.*, 1998). En las bacterias crecidas en las diferentes concentraciones de saponinas, las glicosidasas parecieron mantenerse más activas en concentraciones de 4.600 y 9.200 ppm, ya que no tuvieron diferencias con el control (medio King B) dentro de las primeras 24 h y logrando poblaciones bacterianas mayores, lo que presupone un aprovechamiento de la molécula de saponina por parte de las bacterias (Sen *et al.*, 1998). Esta actividad degradadora de *P. protegens* sobre la molécula de saponina usada para aumentar sus poblaciones, pareciera estabilizarse en el tiempo, ya que, no se encontraron diferencias entre las 24, 48 y 72 h, aunque este resultado podría explicarse parcialmente por la alta variabilidad mostrada en los resultados. Estudios conducidos por Sen *et al.* (1998) demostraron el efecto regulador que distintas concentraciones de extractos de diversas fuentes de saponinas de *Q. saponaria* y *Yucca schidigera* (Roedel ex Ortigies; Agavaceae) tienen sobre bacterias, ya que estas pudieron aumentar o disminuir sus poblaciones en forma lineal a la concentración de saponinas.

En diversos estudios se ha demostrado el efecto fungicida tanto de cepas benéficas de *P. protegens* productoras de 2,4 DAPG (Kwak *et al.*, 2012, Mavrodi *et al.*, 2012) como de extractos ricos en saponinas de *Q. saponaria* (Apablaza y Moya, 2004, Apablaza *et al.*, 2008). En este estudio, la combinación de estos antagonistas de *G. graminis* var. *tritici* no mostró un efecto claro de control sobre el aislado del hongo que se utilizó, observándose sólo un control significativo del

hongo por parte de la combinación de la cepas Ca-10 y Ch-b7 de *P. protegens* con concentraciones de 0 ppm, 1.840 ppm, 4.600 y 9.200 ppm de saponinas de *Q. saponaria* para Ca-10 y de 1.840 y 4.600 ppm para Ch-b7. Del mismo modo, en condiciones *in vitro* se observó que la inhibición de las bacterias sobre el hongo se mantuvo a pesar de estar por 72 h creciendo en un medio con 9.200 ppm de saponinas de un extracto puro de quillay, descartándose un posible efecto del extracto de *Q. saponaria* sobre la actividad controladora de *P. protegens* sobre el hongo. Sin embargo, la variabilidad que se presentó en el control de *G. graminis* var. *tritici*, observado tanto en plantas tratadas sólo con bacterias como con mezclas de *P. protegens* y las distintas concentraciones del extracto de *Q. saponaria*, el nivel de control alcanzado por los tratamientos que tuvieron las bacterias fue mayor al observado en las plantas inoculadas solo con el hongo, y los tratamientos inoculados con bacterias y extractos de *Q. saponaria* de las tres cepas que en promedio presentaron entre 29,2 y un 22,2% menos de severidad de daño en las raíces. El bajo nivel de control pudo deberse a que el aislado del hongo Oso1 es altamente agresivo, ya que alcanzó los valores máximos en el índice de daño al ser inoculada en las plantas que no recibieron los tratamientos, los cuales a su vez contrarrestaron el daño producido por *G. graminis* var. *tritici* en un bajo nivel.

La acción supresora de ciertos suelos sobre *G. graminis* var. *tritici* se produce por la actividad de la biomasa microbiana en su conjunto sobre el patógeno (Weller *et al.*, 2002 y 2007), la cual pudo verse disminuida por la esterilización al que se sometió al suelo previo a los experimentos. Aunque la supresión específica producida por cepas productoras de 2,4 DAPG tiende a ser mayor que el resto de la biomasa de la rizósfera, la variabilidad mostrada en el control de *G. graminis* var. *tritici* por parte de bacterias benéficas son normales (Kwak *et al.*, 2012). Dado los resultados mostrados en este estudio donde los extractos puros de saponinas de *Q. saponaria* no mostraron un efecto antagonista sobre las poblaciones de *P. protegens*, no es posible atribuir a este extracto algún efecto sobre la propiedad controladora de las cepas de *P. protegens* sobre *G. graminis* var. *tritici*. Aunque, ciertas concentraciones de extractos saponínicos favorecen el crecimiento bacteriano (Sen *et al.*, 1998) este podría haber afectado la producción de 2,4 DAPG por parte de las *P. protegens* evaluadas, aunque también pudo afectar la estabilidad del compuesto, el cual presenta una alta inestabilidad en la rizósfera, ya que tendría una vida media de 0,25 días (Kwak *et al.*, 2012). Por otra parte, la alta humedad del suelo producto de precipitaciones o riego es uno de los factores que aumenta la agresividad de *G. graminis* var. *tritici* sobre plantas de trigo (Roget y Rovira, 1991; Cook, 2003). Considerando esto último, el riego efectuado tres veces por semana durante los experimentos, mantuvo una humedad constante en el suelo, lo cual pudo activar el inóculo y haber ayudado a infestar las plantas de trigo en etapas tempranas de su desarrollo, lo que aumentó el daño producido sobre sus raíces y redujo la efectividad de los compuestos triterpénicos

y las bacterias antagonistas. A su vez, esta práctica también pudo provocar una disminución en las concentraciones tanto de 2,4 DAPG como de las concentraciones de saponinas que se colocaron en contacto con las raíces de trigo debido a la lixiviación de las células bacterianas o de los compuestos saponínicos o antimicrobiales. La desaparición de la biopelícula observada sobre las raíces tratadas con una suspensión de *Q. saponaria* después de 24 h sugiere que puede favorecerse la pérdida de bacterias en etapas tempranas de la inoculación.

Si bien los resultados obtenidos en macetas fueron variables, algunas cepas bacterianas de *P. protegens* produjeron una disminución en el índice de daño de *G. graminis* var. *tritici* sobre plantas de trigo al mezclarlas con ciertas concentraciones de extractos puros de saponinas de *Q. saponaria*, lo que sugiere que tanto la concentración de los extractos saponínicos como las cepas bacterianas utilizadas influyen sobre el control de *G. graminis* var. *tritici*, esto podría entregar una aproximación al uso de ambos compuestos para formular un biofungicida que constituya una alternativa para controlar a este hongo fitopatógeno. Esto es relevante, si se considera que las saponinas son clasificadas como productos de “riesgo mínimo” por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) (San Martín y Magunacelaya, 2005) y seguro para el consumo humano por la FDA (Agencia de Drogas y Alimentos) (Sen *et al.*, 1998) de los Estados Unidos de América, lo cual le abre un uso potencial tanto en la agricultura tradicional como orgánica.

CONCLUSIÓN

Los extractos ricos en saponinas triterpénicas de *Q. saponaria* (Vet Sap® y QL1000®) presentaron un efecto antagonista sobre el crecimiento de aislados de *G. graminis* var. *tritici* en condiciones *in vitro*, mientras que los extractos puros de *Q. saponaria* (Vet Sap®) no afectaron el desarrollo de poblaciones de esta bacterias, como se observó en concentraciones altas de los extractos menos puros (QL 1000®) en esta condición. En plantas, las cepas de *P. protegens* productoras de 2,4 DAPG mezcladas con ciertas concentraciones de extractos puros de saponinas de *Q. saponaria*, pese a una disminución inicial después de 24 h, se vieron aumentadas sus poblaciones después de 72 h. La disminución inicial después de 24 h estuvo asociada a la pérdida en la formación de una biopelícula en aquellas raíces tratadas con el extracto puro de saponinas. En macetas el control sobre el hongo fue variables, ya que algunas cepas bacterianas de *P. protegens* generaron una disminución en el índice de daño de *G. graminis* var. *tritici* sobre plantas de trigo al mezclarlas con concentraciones entre 1.840 y de 9.200 ppm de saponinas presentes en el extracto puro de *Q. saponaria* que se utilizó, lo que indica que la concentración de los extractos saponínicos como de las cepas bacterianas utilizadas influyen sobre su efectividad en el control de *G. graminis*

var. *tritici*, lo cual debería ser considerado si ambas alternativas de control fuesen consideradas para formular un biofungicida que sea una alternativa para controlar este hongo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT de Iniciación N°11110105, “Take all decline” (TAD) and effect of plant extract on bacterial populations associates with this phenomenon in wheat crop fields in South of Chile”. El primer autor, Sr. Jonathan González Castillo, reconoce al programa de Becas Nacionales de CONICYT, por financiar sus estudios de Magíster en Ciencias Agronómicas de la Universidad de Concepción.

LITERATURA CITADA

Ahmed DB, Chaieb I, Salah KB, Boukamcha H, Jannet HB, Mighri Z, Daami-Remadi M. 2012. Antibacterial and antifungal activities of *Cestrum parqui* saponins: possible interaction with membrane sterols. *Int Res J Plant Sci* 3 (1): 001-007.

Andrade O. 2004. Efectividad de diferentes desinfectantes de semilla sobre la pudrición radical (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) del trigo en el sur de Chile. *Agric Téc* 64:111-126.

Andrade O, Campillo R, Peyrelongue A, Barrientos L. 2011. Soils suppressive against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* identified under wheat crop monoculture in southern Chile. *Cien Inv Agr* 38: 345-356.

Apablaza G, Díaz MJ, San Martín R, Moya E. 2002. Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*) *Cien Inv Agr* 29: 83-90.

Apablaza G, Moya E. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de las saponinas de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) sobre el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Fitopatología* 39 (1): 47.

Apablaza GE, Moya EA, Aguilar G. 2008. Slow-release formulations containing quillay extracts, for controlling wheat take-all disease. *Int CL C05G 3/00, A01N 45/00, A01P 3/00, C05G 3/02. US 2011/0190123 A1. August 04, 2011. Santiago, Chile.*

Brodhagen M, Henkels MD, Loper JE. 2004. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol* 70 (3): 1758-1766.

Cook RJ. 2003. Take-all of wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* 62 (2): 73–86.

Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moënne-Lecco Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Appl Microbiol* 48: 505-512.

Donoso S, Peña K, Pacheco C, Luna G, Aguirre A. 2011. Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de *Quillaja saponaria* y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. *Bosque* 32: 187–195.

Dubuis C, Haas D. 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in *Pseudomonas*. *Appl Environ Microbiol* 73: 650–654

Freeman J, Ward E, Gutteridge J, BATERMAN L. 2005. Methods for studying population structure, including sensitivity to the fungicide silthiofam, of the cereal take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Pathol* 54: 686-698

Kwak YS, Bonsall RF, Okubara PA, Paulitz TC, Thomashow LS, Weller DM. 2012. Factors impacting the activity of 2,4-diacetylphloroglucinol- producing *Pseudomonas fluorescens* against take-all of wheat. *Soil Biol Biochem* 54 (7): 48-56.

Mavrodi OV, Walter N, Elateek S, Taylor CG, Okubara PA. 2012. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biol Control* 62: 93-102.

McSpadden Gardener BB, Weller DM. 2001. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Appl Environ Microbiol* 67 (10): 4414–4425.

Moya Elizondo EA, San Martin Gamboa RM, Apablaza Hidalgo GE. 2010. Evaluación de un extracto de saponinas de *Quillaja saponaria* para el control de oídios de trigo y zapallo. *Agro Sur* 38: 87-96.

Moya-Elizondo EA, Cattán NC, Arismendi NL, Doussoulin HA. 2013. Determination of 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) and phenazine-producing *Pseudomonas spp.* in wheat crops in southern Chile. *Phytopathology* 103(Suppl. 2): 100.

Mert-Turk F. 2005. Saponins versus plant fungal pathogens. *J Cell Mol Biol* 5: 13-17.

Morrissey JP, Osbourn AE. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (3): 708-724.

Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TIE, Kioshima S. 2014. Early state research on antifungal natural products. *Molecules* 19 (3): 2925-2956.

Osbourn AE. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*. 8: 1821-1831.

Osbourn AE. 2003. Saponins in cereals. *Phytochemistry* 62 (1): 1-4.

Park JY, Oh SA, Anderson AJ, Neiswender J, Kim JC, Kim YC. 2011. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Appl Microbiol* 52: 532-537.

Paulitz TC, Schroeder KL, Schillinger WF. 2010. Soilborne Pathogens of cereals in an irrigated cropping system: effects of tillage, residue management, and crop rotation. *Plant Dis* 94: 61-68.

Pillinger C, Paveley N, Foulkes MJ, Spink J. 2005. Explaining variation in the effects of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) on nitrogen and water uptake by winter wheat. *Plant Pathol* 54 (4): 491-501.

Ribera A, Cotoras M, Zúñiga GE. 2008. Effect of extracts from *in vitro*-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. *World J Microbiol Biotechnol*. 24: 1803- 1811.

Roget DK, Rovira D. 1991. The relationship between incidence of infection by the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), rainfall and yield of wheat in South Australia. *Austr J Exp Agric* 31: 509-513.

San Martin R and Briones R. 2000. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J Sci Food Agric* 80: 2063-2068.

San Martin R and Magunacelaya JC. 2005. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology* 7 (4) 577-585.

Schlotterbeck T, Castillo-Ruiz M, Cañon-Jones H, San martin R. 2015. The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (Molina) plantations as a new source of saponins. *Economic Botany* 69 (3): 262-272.

Sen S, Makkar HPS, Muetzel S, Becker K. 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 27:35-38

Sherif MH, Byrd JA, Cartwright AL, Bailey CA. 2009. Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from guar, quillaja, yucca, and soybean. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1008-1017.

Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr J Agric Res* 9 (16): 1265-1277.

Souza JT, Weller DM, Raaijmakers JM. 2003. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology* 93 (1): 54-63.

Vera C, Madariaga R, Moya-Elizondo E. 2014. Uso de fluquinconazole como tratamiento a la semilla para el control de mal del pie (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) en trigo. *Chilean J Agric Anim Sci.* 30 (3) 159-169.

Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 40: 309-348.

Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De la Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, Thomashow. LS. 2007. Role of 2,4 diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol* 9: 4-20.



LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

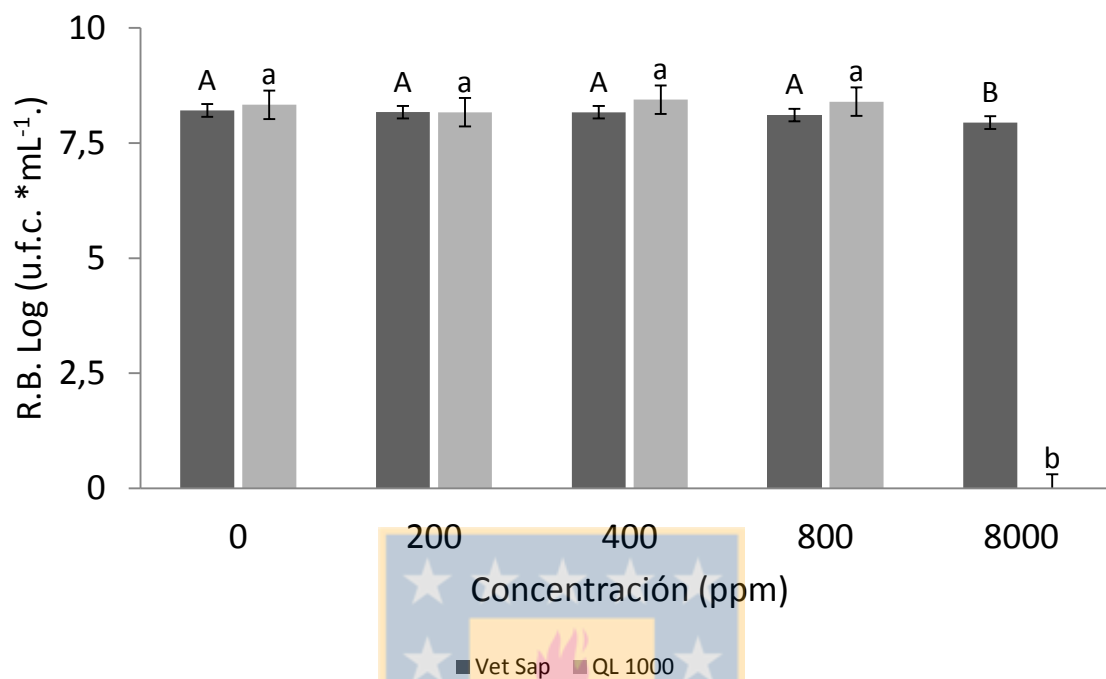


Figura 1. Promedio del recuento bacteriano (R.B.) de *Pseudomonas protegens* después de 24 horas de incubación en medio King B enriquecido con distintas concentraciones de saponinas para los extracto de quillay: Vet Sap® (>90% de saponinas de quillay) y QL1000® (8% de saponinas de quillay). Letras distintas sobre la barra de cada extracto muestra diferencias significativas entre las dosis, según prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0,05$). Datos expresados como media \pm MSD de tres experimentos.

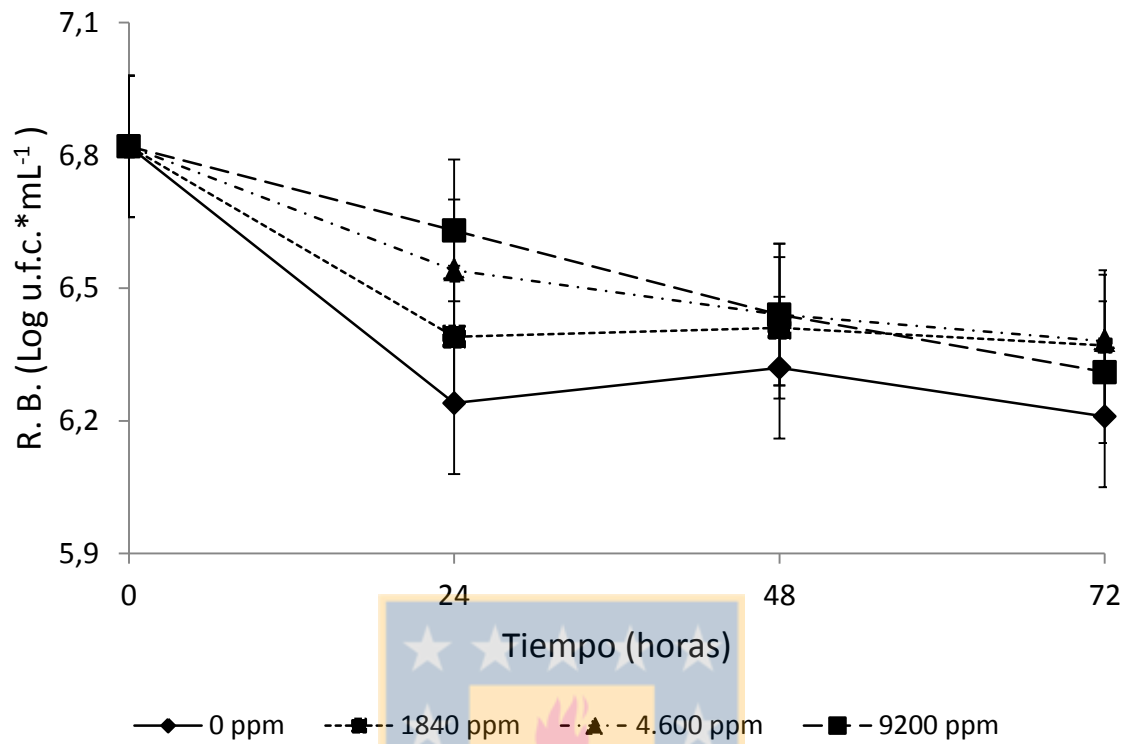


Figura 2. Promedio del recuento bacteriano (R.B.) para distintas cepas de *Pseudomonas protegens* crecidas en diferentes concentraciones de saponinas obtenidas a partir de extractos de *Q. saponaria* (Vet Sap®) en tres tiempos distintos desde su inoculación. Datos expresados en medias \pm error estándar.

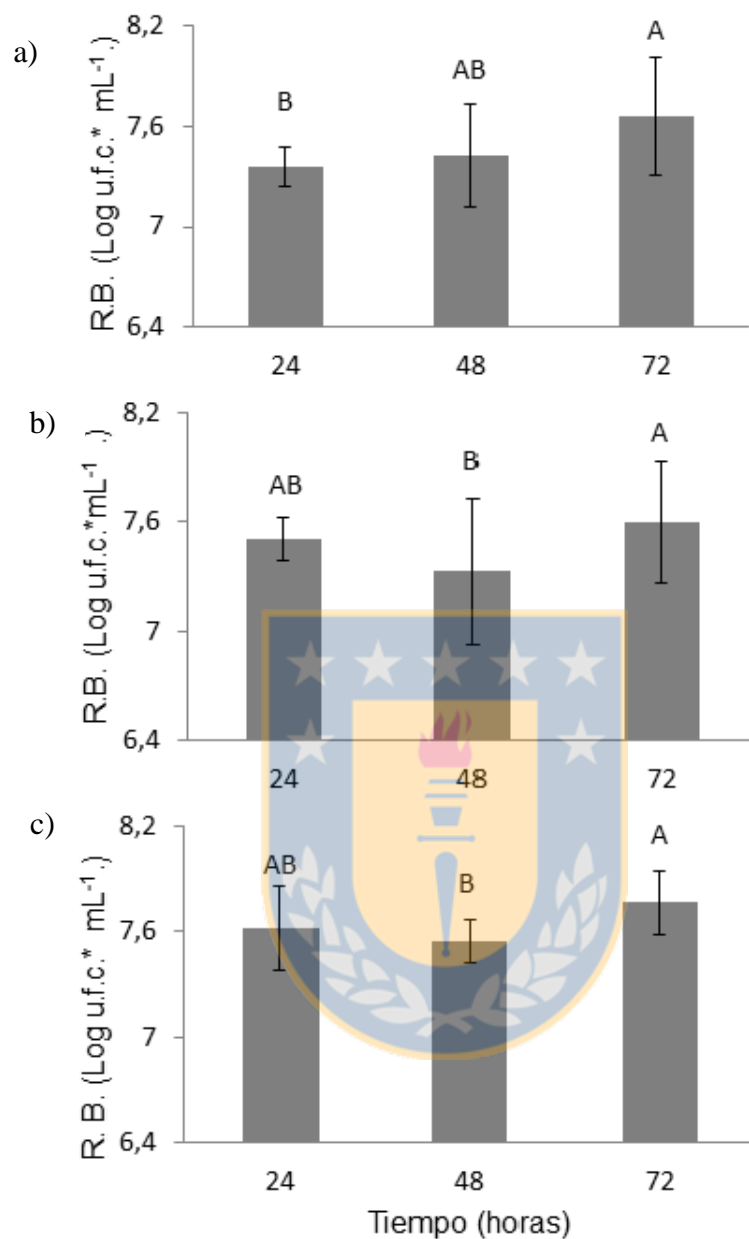


Figura 3. Promedio del recuento bacteriano (R.B.) para distintas cepas de *Pseudomonas protegens* inoculadas sobre raíces de trigo mezcladas con extracto puro de *Q. saponaria* rico en saponinas (Vet Sap®) en tres tiempos distintos desde su inoculación. Poblaciones de cepa Pf-5 a concentraciones de *Q. saponaria* de 7.360 ppm (a), 3.680 ppm (b) y de Ca-10 en concentraciones de 1.472 ppm de saponinas de *Q. saponaria* (c). Datos expresados en medias \pm Desviación estándar. Letras distintas sobre las barras muestran diferencias significativas según prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0,05$).

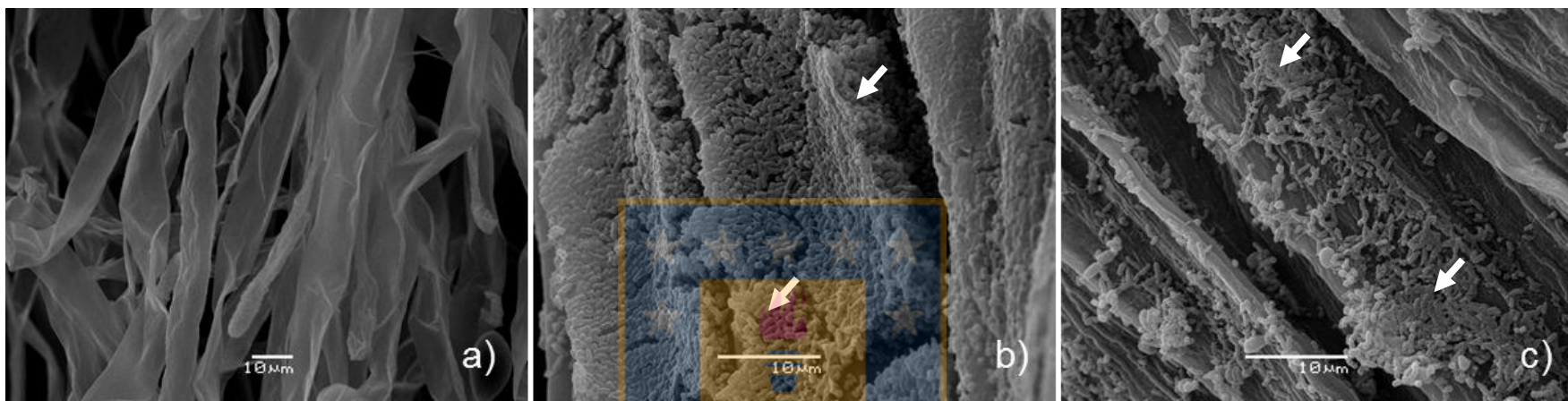


Figura 4. Observaciones en microscopía electrónica de barrido de superficie de raíces de trigo sin inoculación (a), que fueron inoculadas sólo con *Pseudomonas protegens* (b) y raíces de trigo tratadas con bacterias en combinación con 7.360 ppm de saponinas de *Q. saponaria* (c) después de 24 h. Flechas indican agregación de bacterias y formación de biopelícula o biofilm.

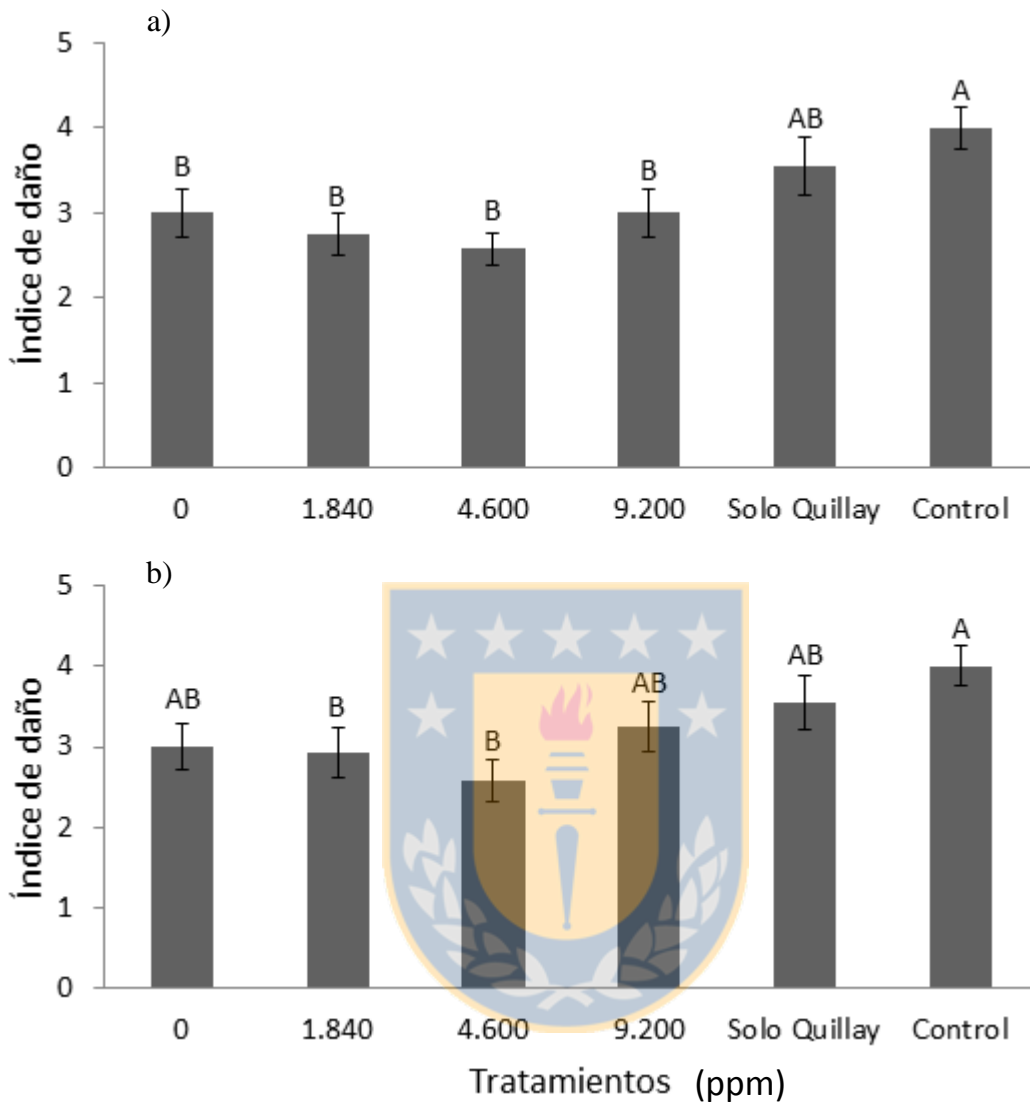


Figura 5. Índice de daño en plantas de trigo infectadas con *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* tratadas con distintas cepas de *Pseudomonas protegens* mezcladas con diferentes concentraciones de un extracto puro rico en saponinas de *Q. saponaria* (Vet Sap®). Los resultados para la cepas Ca-10 (a) y Ch-B7 (b), además muestran los tratamientos sólo inoculados con las bacterias (0), tratado sólo con extractos de *Q. saponaria* (9.200 ppm) y un control solamente inoculado con *G. graminis* var. *tritici*. Las barras representan las medias de cada tratamiento ($n=6$). Datos expresados en medias \pm error experimental. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

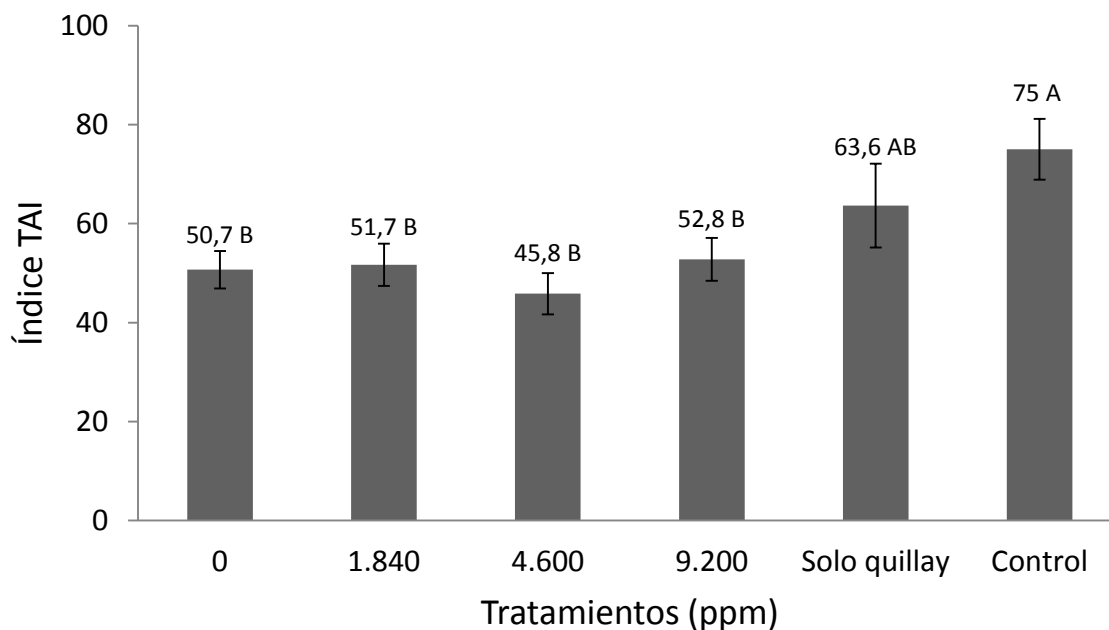


Figura 6. Índice de daño por mal del pie (TAI), causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* en plantas de trigo tratadas con distintas cepas de *Pseudomonas protegens* mezcladas con diferentes concentraciones de un extracto puro rico en saponinas de *Q. saponaria* (Vet Sap®). Los resultados son el promedio de las tres cepas utilizadas (Pf-5, Ch B-7 y Ca-10), además se muestran los tratamientos sólo inoculados con las bacterias (0), tratadas sólo con extractos de *Q. saponaria* (9.200 ppm) y un control solamente inoculado con *G. graminis* var. *tritici*. Datos expresados en medias \pm error experimental. Letras distintas sobre las barras muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

Tabla 1. Recuento bacteriano (Log u.f.c. * mL⁻¹) de las tres cepas de *Pseudomonas protegens* crecidas en diferentes concentraciones de extractos de saponinas de *Q. saponaria* Vet Sap®. Las medias de cada tratamiento se compararon con el control crecido en medio King B para obtener el porcentaje de disminución de las u.f.c.

Tratamientos (ppm)	Cepas de <i>Pseudomonas protegens</i>			Promedios	Porcentaje de disminución (%)
	Pf-5	Ch-B7	Ca-10		
0	6,2 a ¹	5,9 b	6,1 a	6,1 b	78,3%
1.840 ²	6,7 a	6,2 b	6,2 a	6,4 b	63,0%
4.600	6,7 a	6,5 ab	6,3 a	6,5 ab	48,1%
9.200	6,5 a	6,6 ab	6,1 a	6,4 ab	30,2%
Control ³	6,9 a	6,8 a	6,8 a	6,8 a	---
<i>Valor-P</i>	0,397	0,016	0,274	0,003	

¹ Letras distintas en las columnas muestran diferencias significativas entre los tratamientos, según Prueba de comparación de medias de Tukey ($\leq 0,05$).

² Valores expresados en partes por millón de saponinas obtenidas a partir del extracto puro de *Q. saponaria* Vet Sap® (>90% p/p de saponinas).

³ Control que consideró crecimiento de bacterias en medio caldo King B.

