

ANTAGONISMO MICROBIANO CONTRA BACTERIAS ACTIVADORAS DE NÚCLEOS DE HIELO: *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae* Van Hall.

G. López-Granados¹; S. P. Fernández-Pavía²; R. Cárdenas-Navarro²; J. M. Sánchez-Yáñez^{3¶}

¹Facultada de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Apdo. Postal 414,
San Nicolás de los Garza, Nuevo León. MÉXICO.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, C. P. 58880. MÉXICO.

³Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edif. B-1, C.U.
Morelia, Michoacán. 58000. MÉXICO. Correo-e: syanez@zeus.umich.mx (¶Autor responsable).

RESUMEN

El congelamiento de las hojas en el campo depende de factores físicos, químicos y biológicos. De los biológicos se considera a las bacterias activadoras de núcleos de hielo (BANH) epifitas del filoplano. Estas BANH responden al cambio ambiental como la elevada humedad y la baja temperatura para “super enfriarse” internamente y externamente formar cristales de hielo para evitar que ese fenómeno físico las aniquile. En consecuencia los tejidos vegetales se congelan y la hoja muere. El control químico y biológico utilizado para reducir la densidad de BANH del filoplano y los cristales de hielo, ha generado resultados inconsistentes. Es necesaria información sobre los microorganismos nativos antagonistas a las BANH en cultivo de alto valor económico. En esta investigación se aislaron microorganismos epifitos en cítricos, antagonistas a BANH. Se determinó su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los ecotipos de BANH en agar nutritivo. Se evaluó el efecto de estos antagonistas sobre la frecuencia de nucleación de hielo de las BANH en hojas de naranjo dulce, naranjo agrio, mandarina y limón. Los resultados muestran la existencia de microorganismos epifitos en cítricos antagonistas a las BANH. Su aplicación en hojas de tales plantas redujo el daño por congelamiento. Los antagonistas a las BANH se identificaron como géneros de *Enterobacteriaceae* y géneros de bacterias Gram positivas: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp. *Micrococcus luteus*. Así como una levadura. Se concluye que estos microorganismos epifitos antagonistas pueden ser una alternativa para reducir el efecto de BANH en cítricos.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: congelamiento, cítricos, filoplano, epifitas.

MICROORGANISM ANTAGONISM AGAINST ICE NUCLEI ACTIVATOR BACTERIA: *Pantoea agglomerans* AND *Pseudomonas syringae* Van Hall.

ABSTRACT

Freezing of leaves in the field depends on physical, chemical, and biological factors. One of the biological factors considered are ice nuclei activator bacteria (BANH), which are epiphytic to the leaf plane (phyloplane). These BANH respond to environmental changes such as high moisture and low temperature to “super cool down” internally and form ice crystals externally to avoid that such physical phenomenon annihilates them. As a consequence plant tissue freezes and the leaf dies. Chemical and biological control used to reduce the density of phyloplane BANH and ice crystals has generated inconsistent results. Information is necessary on native microorganisms with antagonism to BANH in crops of high economic value. In this research we isolated epiphytic microorganisms from citric plants which are antagonist to BANH. We determined the inhibitory effect of these organisms on the growth of BANH ecotypes on nutritive agar. We evaluated the effect of these antagonist microorganisms on the frequency of ice nucleation of BANH in leaves of sweet orange, sour orange, mandarin, and lemon. Results show the existence of epiphytic microorganisms in citrus plants that are antagonists to BANH. The application of these microorganisms to citric leaves reduced damage from freezing. Antagonist microorganisms to BANH were identified as those from the *Enterobacteriaceae* genus and genii of Gram positive bacteriagenera: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., and *Micrococcus luteus*. A yeast was identified as well. It was concluded that these epiphytic antagonist microorganisms may provide an alternative to reduce the effect of BANH on citric plants.

ADDITIONAL KEY WORDS: freezing, frost, citrus, phyloplane, epiphytic.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Nuevo León, México en 1988 una helada redujo drásticamente la producción anual de cítricos de 320 mil a sólo 5 mil toneladas. Este daño severo se asoció a la incidencia de bajas temperaturas, aunque se cree que influyeron factores biológicos como la densidad de las bacterias activadoras de núcleos de hielo (BANH), epifitas naturales de una amplia gama de plantas (Gross *et al.*, 1984; Wilson y Lindow, 1994abc; Taiz y Zeiger, 1998). Se ha reportado que cuando las hojas de éstas se exponen a temperaturas de congelamiento durante largos periodos de tiempo, aparecen cristales de hielo extracelulares que causan el movimiento de agua en estado líquido del protoplasto al exterior. Esto provoca una deshidratación aguda si el congelamiento es rápido, los cristales se forman en el protoplasto de la célula vegetal y ésta se muere (Hirano *et al.*, 1985; Weibell *et al.*, 1990; Blakeman, 1993; Mariano y McCarter, 1993).

Es evidente que la formación de los cristales de hielo depende de las propiedades físico-químicas del filoplano de la planta y del crecimiento de las BANH en esa zona. Algunas de las proteínas producidas por las BANH, tienen la función bioquímica de alinear las moléculas de agua entre las regiones de aminoácidos para dar origen a estos cristales (Wilson y Lindow, 1994c; Wilson *et al.*, 1999). Lo anterior explica la sensibilidad de las hojas de cítricos y gramíneas al congelamiento por heladas tempranas o tardías, asociado con el crecimiento de los ecotipos de las BANH en su filoplano (Wilson y Lindow, 1993; Yessad *et al.*, 1994). Cuando la humedad relativa es superior al 80 % en el ambiente y la temperatura fluctúa entre 5 y 0 °C, las BANH sintetizan estas proteínas a nivel de su membrana e inician la formación de cristales de hielo hacia el exterior (Sunding y Bender, 1993; Beattie y Lindow, 1994 abc). Así congelan las hojas de la planta y causan pérdida de la producción agrícola como ha sucedido en la zona citrícola del estado de Nuevo León, México. Los géneros de BANH representativos en el filoplano de plantas son: *Pseudomonas syringae* Van Hall (Hirano *et al.*, 1985; Andersen *et al.*, 1991), *P. fluorescens* (Mingula) biotipo G (Lindow, 1982; Lindow *et al.*, 1993), *P. viridiflava* (Burkholder) Dawson, *P. agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*) (Lohis) Dya (Lindow *et al.*, 1982), y *P. stewartii* (Lindow, 1983a; Lindow *et al.*, 1984). El efecto de las BANH puede ser un problema agrícola difícil de resolver, ya que la propiedad de formar núcleos de hielo es común entre los microorganismos nativos del filoplano de plantas domésticas (Lindow, 1982, 1987).

Dado que la actividad de las BANH causa pérdidas económicas, se intenta reducirlas en los cultivos agrícolas mediante el control químico con antibióticos de amplio espectro como la estreptomycin o la oxitetraciclina, así como con metales pesados del tipo del zinc (Zn²⁺) o el cobre (Cu²⁺), en ambos casos sin resultados satisfactorios (Lindow, 1983b; Andersen *et al.*, 1991; Stromberg *et al.*, 1999, 2000). Una alternativa distinta para su control es la

aplicación de microorganismos antagonistas a las BANH (Lindow y Connel, 1984), como algunos bacteriófagos (Cody *et al.*, 1987; Mariano y McCarter, 1993; Schnabel y Jones, 1999). En este tipo de tratamientos se reportan resultados positivos en la disminución del congelamiento de hojas de maíz, tomate, peral y cítricos (Anderson *et al.*, 1984; Cody *et al.*, 1987; Lindemann y Suslow, 1987), una eficacia relativa en la reducción del daño por congelamiento de entre 60 y 70 % (Lindow *et al.*, 1982; Lindow, 1981) y sin efectividad cuando la reducción del daño fue menor al 10 % (Lindow *et al.*, 1982, 1983; Lindow, 1983a).

El antagonismo contra las BANH se induce por alteración de la ecología microbiana en el filoplano de la planta (Lindemann y Suslow, 1987; Lindow, 1987; Hirano *et al.*, 1996). Con microorganismos autóctonos para asegurar la competición de esta población contra los ecotipos de las BANH y reducir el daño por congelamiento en el sistema foliar de la planta. Obviamente con aplicación de agentes químicos se eliminan parcialmente las poblaciones de BANH, pero causan contaminación ambiental y se afecta también a las poblaciones de antagonistas (Wilson y Lindow, 1992, 1993, 1994a). Por otro lado si se seleccionan microorganismos nativos del filoplano del cultivo vegetal que se pretende proteger de la población de BANH, esto permite disminuir el uso de agentes químicos contra las BANH y minimizar el daño por congelamiento en la hoja, sin causar contaminación ambiental. Los objetivos de este estudio fueron: aislar microorganismos nativos de filoplano de cítricos antagonistas a las BANH: *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae*; y determinar el efecto de estos antagonistas sobre la actividad de ecotipos de las BANH en hojas de cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen, aislamiento e identificación de los ecotipos de las BANH de cítricos

En la primavera de 1992 y 1994 se aislaron del municipio de General Terán, Nuevo León, México, ecotipos de *P. agglomerans* a partir de hojas sanas de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) de acuerdo con el procedimiento descrito por Cody *et al.* (1987). Las posibles BANH del filoplano de las plantas se aislaron y cultivaron en agar nutritivo (AN) por 24 h, posteriormente se suspendieron en 3.0 ml de cloruro de sodio (NaCl al 1.0 % p:v) en agua destilada. Los ecotipos de las BANH se identificaron según el criterio del Manual de Bergey (Holt *et al.*, 2000). Se incluyeron dos ecotipos de las BANH de referencia: *P. syringae* cepas PssT y PssCB728a donadas por el Dr. Steven Lindow de la Universidad de California en Berkeley, CA, EUA.

Prueba de activación de núcleos de hielo de los ecotipos nativos *in vitro*

Para demostrar la capacidad de formación de núcleos de hielo por los ecotipos de las BANH, se utilizó la técnica

establecida por Hirano *et al.* (1985). Los tubos con los ecotipos de las BANH se colocaron en un congelador (General Electric Mod. RGA-113) a 9 °C para determinar su tiempo de congelamiento a intervalos de cinco minutos, según describen Lindow *et al.* (1982) y Wilson y Lindow, (1994b). En este ensayo se usaron como referencia de las BANH a las cepas y ecotipos de *P. syringae* (Psst y PssCB728a) y a los de *P. agglomerans* de la colección del laboratorio de microbiología ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Michacán, México.

Aislamiento de los microorganismos antagonistas a los ecotipos de BANH

Hojas sanas de cítricos se suspendieron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0 y 0.01 % de dodecil sulfato de sodio (SDS), los matraces se agitaron a 250 rpm por 2 h para separar y suspender sin dañar los posibles microorganismos nativos adheridos a las hojas, antagonistas a las BANH. El amortiguador se usó para humedecer cuatro discos de papel filtro (Whatman No.1) esterilizados, de 5 mm de diámetro. Estos se colocaron sobre la superficie de cajas Petri con agar antagonista (AA) (g·litro⁻¹): sacarosa 2.0, NaCl 5.0, MgSO₄ 7H₂O 3.0, NH₄Cl 5.0 y agar 18.0, previamente inoculadas con los ecotipos de las BANH *P. syringae* y *P. agglomerans*, después de que cada una se suspendió en solución salina 0.85 % (NaCl p:v) a una concentración de 10⁶ células por ml, de acuerdo con el tubo Núm. 1 de Mac Farland. Cada suspensión se sembró (0.7 ml) en cajas con AA, que se incubaron a 30 °C por 24 a 48 h como lo reportó Lindow (1982).

Antagonismo microbiano sobre el crecimiento de los ecotipos de las BANH *in vitro*

Para detectar la actividad de inhibición del crecimiento de los microorganismos antagonistas nativos de cítricos sobre los ecotipos de las BANH se utilizó la técnica de doble capa recomendada por Lindow *et al.* (1982, 1983) y Lindow, (1983ab). En este ensayo se combinaron 15 ml de AN y 1.0 ml de una suspensión de cada ecotipo de las BANH a una concentración de 1 x 10⁶ UFC·ml⁻¹ por caja. Posteriormente se agregó una segunda capa de AN con 15 ml, que se mezclaron con 1.0 ml de los microorganismos de cítricos antagonistas a la misma concentración celular de los ecotipos de las BANH. Estas cajas se incubaron a 30 °C por 24 a 30 h y se registraron los halos de inhibición del crecimiento de las BANH, causado por los microorganismos antagonistas nativos del filoplano de los cítricos.

Medición del efecto de los microorganismos antagonistas sobre los ecotipos de BANH en las hojas de cítricos

Para este experimento se prepararon suspensiones de las BANH a una concentración de 1 x 10⁷ y de los antagonistas 1 x 10⁷ UFC·ml⁻¹ en un amortiguador de

fosfatos 0.1M a pH 7.0. De ambas suspensiones se tomaron con pipetas Pasteur 18 gotas por hoja, cada gota equivalente a 100 µl de 1 x 10³ UFC, que se aplicaron sobre la superficie de hojas sanas de: naranjo dulce, naranjo agrio, mandarina y limón de acuerdo con la técnica de Hirano *et al.* (1985) y Donegan *et al.* (1991) luego se continuó con el procedimiento que se describió en el inciso II.

Análisis estadístico

Para establecer las diferencias de la actividad de la inhibición de los microorganismos antagonistas nativos de las hojas de cítricos sobre los ecotipos de las BANH de *P. agglomerans* y *P. syringae* se aplicó la prueba de Chi cuadrada (χ^2) y para validar la inhibición de estos antagonistas sobre la frecuencia de formación de núcleos de hielo, se empleó un análisis de varianza considerando un diseño de bloques al azar con 34 tratamientos y 7 repeticiones (Steel y Torrie, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos antagonistas a los ecotipos de BANH

En el AA se detectaron bacterias antagonistas que causaron halos de inhibición del crecimiento de los ecotipos de *P. agglomerans* y de *P. syringae* (Psst y PssCB728a), lo que sugiere que estos antagonistas liberaron sustancias tipo antibiótico aún no identificadas (Wilson y Lindow, 1993, 1994bc, 1995; Lindow, 1983b, 1987). El efecto de esos antagonistas sobre los ecotipos de *P. agglomerans* aislados de hojas de naranjo dulce (NI) (Cuadro 1), fue similar al que se detectó sobre las cepas y ecotipos de *P. syringae* (Psst y PssCB728a). De acuerdo con el tamaño de la muestra se encontraron diferencias en el grado de competencia entre los antagonistas y su capacidad para inhibir el crecimiento de los ecotipos de las BANH: *P. agglomerans* y *P. syringae*, (Psst y PssCB728a) en el AA. Estos resultados concuerdan con los reportados por Anderson *et al.* (1984); Cody *et al.* (1987), quienes observaron diferencias en la actividad de los antagonistas, provenientes de diversas plantas, sobre el grado de inhibición del crecimiento de los ecotipos de las BANH, en medio de cultivo artificial. En estos estudios se reportó que los antagonistas muestran mayor capacidad de inhibición bajo condiciones *in vitro*; mientras que en otros reportes de investigación en los cuales se intentó reducir el daño de las BANH con microorganismos antagonistas en árboles frutales, la inhibición fue menor (Anderson *et al.*, 1984; Hirano *et al.*, 1996).

El efecto de los antagonistas del filoplano de cítricos sobre los ecotipos de *P. agglomerans* (L-1 y N-1) y de *P. syringae* fue que excepto los géneros *Escherichia* y *Klebsiella*, las bacterias Gram negativas fueron antagonistas

CUADRO 1. Efecto de microorganismos antagonistas de cítricos a una bacteria activadora de núcleos de hielo en el laboratorio.

Microorganismos Antagonistas del Filoplano de Cítricos	Ecotipos de <i>Pantoea agglomerans</i> ^a	
	Inhibido	Resistente
<i>Bacillus</i> sp	1	4
<i>Escherichia coli</i>	1	4
<i>Enterobacter</i> sp	4	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1	4
Levadura	1	

^aOrigen del ecotipo: naranja dulce NI.
 $\chi^2=5.8$; NS no significativa, ($P>0.05$); grados de libertad=4

en diverso grado contra la población de las BANH (Cuadro 2). Lo cual confirma que el comportamiento de cada bacteria es dependiente del tipo y de la condición del medio de cultivo artificial. Estos resultados difieren de los resultados que se observan en la superficie de la hoja en el campo. En el medio de cultivo los microorganismos antagónicos inhibieron a las BANH, lo cual se presume está asociado a la riqueza nutricional del AA, ya que los microorganismos no mostraron un efecto de inhibición similar sobre la población de las BANH en la hoja del cítrico, en donde probablemente la concentración y tipo de los exudados foliares no estimularon a las bacterias antagonistas y consecuentemente se redujo su impacto sobre la población de las BANH (Cody *et al.*, 1987; Blakeman, 1993). Por otra parte, los dos géneros Gram positivos *Bacillus* y *Micrococcus* fueron antagónicos para uno de los ecotipos de las BANH de *P. syringae* y/o *P. agglomerans*. Es probable que su capacidad de inhibición contra la población BANH se relacione con su tolerancia a la radiación solar, pues se sabe que *Micrococcus* sintetiza un pigmento que le protege del efecto bactericida de la luz ultravioleta. En tanto que por la naturaleza de las esporas de *Bacillus*, éstas son resistentes no sólo a este factor físico, sino también a agentes químicos. Incluso en el caso de *Bacillus*, está reportado que utiliza los exudados foliares para colonizar y

CUADRO 2. Inhibición de los ecotipos de bacterias activadores de núcleos de hielo por microorganismos antagonistas del filoplano de cítricos

Bacteria del Filoplano de Cítricos Antagonista a BANH	<i>Pantoea agglomerans</i> ^z		<i>Pseudomonas syringae</i> ^y	
	L-1	N-1	Psst	PssCBT28a
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp	-	-	+	+
<i>Klebsiella</i> sp	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp	+	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	-	+

^zhojas sanas de limón (L) y naranja (N)

^ycepas de referencias; Lindow, Universidad de California, Berkely, USA.

(-) sin inhibición; (+) inhibido.

Antagonismo microbiano...

dominar esa zona de la planta, lo que explica su efecto de inhibición contra la población de las BANH y en consecuencia la reducción del daño por congelamiento sobre la hoja (Beattie y Lindow, 1994ab).

Efecto de los microorganismos antagonistas sobre los ecotipos de las BANH en las hojas de cítricos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) en el efecto de los microorganismos antagonistas sobre la población de las BANH en las hojas de naranja agrio y mandarino, probablemente por la incapacidad de los antagonistas para colonizar este tipo de hoja (Cuadro 3). También es probable que la población BANH fue más competitiva que la de los microorganismos antagonistas, por los exudados foliares del naranja agrio y mandarino en consecuencia se observó la muerte de la hoja por congelamiento (Beattie y Lindow, 1994abc). Resultados semejantes se reportaron por Lindow (1981) y Gross *et al.* (1984), en hojas de árboles de manzano y de peral. Por otra parte, los resultados indicaron que se detectó una diferencia significativa en el porcentaje de reducción de la formación de núcleos de hielo en las hojas de limón y naranja dulce. Se ha reportado la inhibición de la frecuencia

CUADRO 3. Análisis de varianza del efecto de microorganismos antagonistas sobre la reducción del daño por congelamiento causado por bacterias activadoras de núcleos de hielo en hojas sanas de cítricos.

Factor de variación	GL	Cítrico (Hoja)	Naranja Dulce
		Cuadrados medios	F Calculada
Tratamientos	33	33845.11	3.01 [*]
Repeticiones	6	29637.92	81.93
Error	198	35655.65	
Total	237		
		Limón	
Tratamientos	33	33564.98	1.59 [*]
Repeticiones	6	26105.92	68.86
Error	198	354.67	
Total	237		
		Mandarino	
Tratamientos	33	331224.20	3.49 ^{NS}
Repeticiones	6	26129.62	45.48
Error	198	198350.74	
Total	237		
		Naranja Agrio	
Tratamientos	33	1182.35	3.82 ^{NS}
Repeticiones	6	19738.23	45.49
Error	198	309.21	
Total	237		

^{NS}; no significativa y significativa a una $P\leq 0.05$.

GL: grados de libertad.

de nucleación de 100 %, en hojas de árboles frutales (Hirano *et al.*, 1985, 1996). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que en este grupo de microorganismos antagonistas nativos, existe el potencial para su aplicación, en la reducción del efecto negativo de los ecotipos de las BANH.

Caracterización bioquímica de los principales microorganismos antagonistas a los ecotipos de BANH

Las pruebas bioquímicas señalaron que las bacterias antagonistas a los ecotipos de las BANH (Cuadro 4) pertenecen a la familia de las enterobacterias (Holt *et al.*, 2000). Se identificaron tres géneros típicos *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* sp; en general estas bacterias se reportan en el filoplano, solo cuando aguas negras mediante aerosoles las contaminan. Recientes investigaciones sugieren que en realidad estas bacterias son ubicuas (Costa y Loper, 1995; Barraquillo *et al.*, 1997; Estrada-De los Santos *et al.*, 2001). La estrecha relación de estas bacterias antagonistas de las BANH con enfermedades gastrointestinales, limitan su posible aplicación para evitar el daño por congelamiento en hojas de las BANH (Lindow *et al.*, 1993; Yessad *et al.*, 1994). El género *Bacillus* sp. como se señaló previamente, tiene potencial para reducir el daño por congelamiento contra los ecotipos de las BANH, pues está demostrado que *B. cereus* coloniza y domina las hojas de plantas al utilizar probablemente sus exudados como fuente de carbono y energía (Lambert y Perferoen, 1992; Beattie y Lindow, 1994ab) y de esa forma impide el establecimiento de bacterias fitopatógenas de la hoja. Se cree que de esa forma

Bacillus sp. probablemente evitó el daño por congelamiento en la hoja del cítrico, por los ecotipos de las BANH (Cody *et al.*, 1987; Donegan *et al.*, 1991; Hirano *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1999).

La detección de inhibición del congelamiento en las hojas por una levadura no es usual, requiere de investigación para determinar su posible uso potencial contra el daño por congelamiento por la población de las BANH. En el caso de *M. luteus* este coco fue antagónico para ciertos ecotipos de la población BANH. Se supone que ello se debe en parte a que sintetiza un pigmento intracelular que lo protege de la acción bactericida de la radiación solar y la luz ultravioleta (Holt *et al.*, 2000). Los resultados de este trabajo sugieren que no todos los microorganismos antagonistas a las BANH de esta clase compiten por el espacio y los exudados del filoplano, como lo reportaron Donegan *et al.* (1991) ya que en algunos ensayos de antagonismo microbiano contra la población de las BANH para la reducción del daño por congelamiento en las hojas de cítricos, fue apenas de un 15 %. Como lo reportado por Cody *et al.* (1987); Lindemann y Suslow (1987); Wilson y Lindow (1995) y Wilson *et al.* (1999) en hojas de árboles frutales, lo que indica que este no es un problema de fácil solución.

Los resultados de esta investigación apoyan la existencia natural de una amplia gama de microorganismos nativos del filoplano, de aplicación potencial antagonistas contra los ecotipos de las BANH, como lo reportan Lindow y Connel (1984); Wilson y Lindow (1992; 1994a) y Yessad *et al.* (1994). Los ensayos realizados con estos

CUADRO 4. Caracterización bioquímica de las bacterias antagonistas de cítricos a los ecotipos de bacterias activadoras de núcleos de hielo (BANH): *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas syringae*.

Prueba Bioquímica ²	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i>
Gram	-	-	-	+	+
Catalasa	+	-	-	+	-
Oxidasa	-	-	-	-	-
Voges- Proskawer pH 6	-	-	-	-	-
Voges- Proskawer, pH 7	-	-	+	-	-
Ácido glucosa	+	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	-
Hidrólisis: gelatina	+	+	-	+	+
Hidrólisis caseína	+	-	-	+	+
Hidrólisis almidón	+	+	-	+	+
Utilización citratos	-	-	-	-	-
Reducción NO ₃ - NO ₂	+	+	+	+	+
Formación indol	-	-	-	-	-
Crecimiento anaerobiosis	-	+	-	-	-
Crecimiento EMB	+	+	+	-	-

Las pruebas bioquímicas se realizaron por triplicado. Reacción: (-) = Negativo; (+) = Positiva. BANH: bacterias activadoras de núcleo de hielo 1 Psst y PssCBT28a. EMB: Agar Eosima azul de metileno para entéricas.

microorganismos antagonistas contra ecotipos de población de las BANH, facilita la selección de aquellos con características adecuadas para su aplicación en ambientes agrícolas que sean inocuos a plantas, animales y humanos, de fácil cultivo en el laboratorio y de bajo costo de producción.

La aplicación de bacterias antagonistas nativas de hojas sanas, tiene ventajas sobre los microorganismos de los productos comerciales conocidos, ya que estos en algunos casos se basan en bacterias mutantes modificadas por ingeniería genética como: *P. syringae* (Lindow, 1987; Weibell *et al.*, 1990; Varvaro y Martella, 1993; Wilson y Lindow, 1993, 1994b). No obstante la eficacia de estas mutantes para reducir el daño por congelamiento de las BANH en las plantas, su aplicación supone un riesgo, el cual aún no se sabe que tan grave puede ser por la falta de conocimiento sobre su posible impacto negativo al ambiente al dispersar estas bacterias en la naturaleza. Por ello se recomienda investigación al respecto en el agroecosistema para prevenir consecuencias indeseables (Lindemann y Suslow, 1987; Sunding y Bender, 1993; Wilson y Lindow, 1994 abc). Se concluye que los microorganismos nativos antagonistas de las BANH pueden ser una opción para reducir su actividad detrimental, como se observa en la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se dedica al Dr. Luis J. Galán-Wong, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL) quien sugirió trabajar con esta idea. A la dirección general de Investigación Científica y Tecnología de la SEP a través de la FCB-UANL, por el apoyo económico. A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo proyecto 2.7 (2002-2004) por las facilidades para su publicación. A la Dra. Lidia Solís del Laboratorio de Fitopatología de la FCB-UANL por las facilidades logística y valioso tiempo, al M. C. Pedro Moreno-Zacarías por su asesoría en el análisis estadístico. A Beatriz Noriega Gamboa por su paciencia en su escritura.

LITERATURA CITADA

- ANDERSEN, G. L.; MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. 1991. Occurrence and properties of copper-tolerant strain of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. *Phytopathology* 81: 648-656.
- ANDERSON, J. A.; BUCHANAN, D. W.; STALL, R. E. 1984. Reduction of bacterially induced frost damage to tender plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 401-405.
- BARRAQUILLO, W. L.; REVILLA, L.; LADHA, J. K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plants and Soil* 194: 15-24.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. 1994a. Survival, growth, and localization of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* on leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3790-3798.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. 1994b. Comparison of the behavior of epiphytic fitness mutants of *Pseudomonas syringae* under controlled and field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3799-3808.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. 1994c. Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival, pp-1-27. *In: Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular Mechanisms.* DANGL, J. L. (ed): Springer-Verlag. New York, USA.
- BLAKEMAN, J. P. 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathol.* 42:479-493.
- CODY, Y. S.; GROSS, D. C.; PROEBSTING, E. L. Jr.; SPOTTS, R. A. 1987. Suppression of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* by antagonistic bacteria in fruit orchards and evaluations of frost control. *Phytopathology* 77: 1036-1044.
- COSTA, J. M.; LOPER, J. E. 1995. Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 7: 440-448.
- DONEGAN, K.; MATYAC, C.; SEIDLER, R.; PORTEOUS, A. 1991. Evaluation of methods for sampling, recovering and enumeration of bacteria applied to phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 51-56.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES R.; CABALLERO-MELLADO, J. 2001. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790-2798.
- GROSS, D. C.; CODY, Y. S.; PROESBETING, E. L.; RADANMAKER, G. K.; SPOTTS, R. A. 1984. Ecotypes and pathogenicity of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit trees orchards. *Phytopathology* 74: 241-248.
- HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. 1985. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. *Plant Physiol.* 77: 259-265.
- HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. 1996. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2560-2566.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S. T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 789 P.
- LAMBERT, B.; PERFEROEN, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 48: 112-122.
- LINDEMANN, F.; SUSLOW, T. V. 1987. Competition between ice nucleation-active wild type and ice nucleation-deficient deletion mutant strains of *Pseudomonas syringae* and *P. fluorescens* biovar I and biological control of frost injury on strawberry blossoms. *Phytopathology* 77: 882-886.
- LINDOW, S. E. 1981. Frost damage to pear reduced by antagonistic bacteria, bactericides and ice nucleation inhibitors. *Phytopathology* 71: 237. (Abstract).
- LINDOW, S. E. 1982. Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria, pp: 395-416. *In: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress.* LI. P. H.; SAKAI, A. (eds.). New York. USA.
- LINDOW, S. E. 1983a. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 21: 363-384.
- LINDOW, S. E. 1983b. Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice-nucleation active bacteria. *Plant Dis.* 67: 327-333.

- LINDOW, S. E. 1987. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice *Pseudomonas syringae* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2520-2527.
- LINDOW, S. E.; HIRANO, S. S.; BARCHET, W. R.; ARNY, D.C.; UPPER, C. D. 1982. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. *Plant. Physiol.* 70: 1090-1093.
- LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. 1983. Biological control of frost injury: an isolate of *Erwinia herbicola* antagonistic to ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 73: 1097-1102.
- LINDOW, S. E.; CONNELL, J. H. 1984. Reduction of frost injury to almond by control of ice nucleation active bacteria. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 48-53.
- LINDOW, S. E.; PAPP, J.; ANDERSEN, G. A. 1984. Biological control of frost injury to pear using non ice nucleation active bacteria. *Proc. Am. Conf. INA Bacteria 20 Flagstaff Az. USA.* pp. 10-15.
- LINDOW, S. E.; ANDERSEN, G.; BEATTIE, G.A. 1993. Characteristics of insertional mutants of *Pseudomonas syringae* with reduced epiphytic fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1593-1601.
- MARIANO, R. L. R.; McCARTER, S. M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microb. Ecol.* 26: 47-58.
- SCHNABEL, E.; JONES, A. L. 1999. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4898-4907.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. 1988. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* 2ª. McGraw-Hill. D.F., México. 622 p.
- STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. 1999. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Phytopathology* 89: 131-135.
- STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; KURT, L. D. 2000. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* the causal agent of bacterial leaf. *Biol. Control* 17: 61-72.
- SUNDING, G. W.; BENDER, C. L. 1993. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1018-1024.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology.* 2º ed. Sinauer Associates, Inc, Publishers. Massachusetts, USA. 792 p.
- VARVARO, L.; MARTELLA, L. 1993. Virulent and avirulent isolates of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* as colonizers of olive leaves: evaluation of possible biological control of the olive knot pathogen. *EPPO (Eur. Mediterr. Plant. Prot. Organ.) Bull.* 23: 423-427.
- WEIBELL, J.; RONQUIST, F.; BRISHAMMER, S. 1990. Free amino acid composition of leaf exudates and phloem sap. *Plant Physiol.* 92: 222-226.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1992. Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3908-3913.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1993. Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 410-416.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1994a. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4468-4477.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1994b. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice⁺) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (Ice⁻) biological control agent. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3128-3137.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1994c. Inoculum density-dependent mortality and colonization of the phyllosphere by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2232-2237.
- WILSON, M.; LINDOW, S. E. 1995. Enhanced epiphytic coexistence of near-isogenic salicylate-catabolizing and non-salicylate-catabolizing *Pseudomonas putida* strains after exogenous salicylate application. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1073-1076.
- WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. 1999. Localization and survival of leaf associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1435-1443.
- YESSAD, S.; MANCEAU, C.; LUISETTI, J. 1994. Relationship between pathogenicity and epiphytic fitness of Tn5 mutants of *Pseudomonas* pv. *syringae* on pear. *Proceedings of the 8th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria.* Boston, Mass., USA.