

El ácido fusárico, micotoxina producida por *Fusarium* spp., afecta negativamente el crecimiento de *Pseudomonas protegens* Pf-5 mediante el secuestro de hierro y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Evangelina M. Bernar¹✉ y Jimena A. Ruiz^{1,2}

1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

2 Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina. ✉ Dirección actual: Departamento de Química Biológica e Instituto de Bioquímica y Biofísica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Recibido:

Recibido en: 17/10/2016

| Aceptado:

Aceptado en: 03/11/2016

Contacto: Evangelina M. Bernar y Jimena A. Ruiz - embernar@qb.ffyb.uba.ar jruiz@agro.uba.ar

Resumen

El ácido fusárico es un metabolito producido por diversas especies de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. Existen diversos trabajos que demuestran que este compuesto es tóxico para células vegetales y de mamíferos. *P. protegens* Pf-5 es una bacteria conocida por sus propiedades de supresión de diversos fitopatógenos del suelo, entre ellos *Fusarium* spp., sin embargo existe inconsistencia en cuanto a la eficacia de biocontrol de estos fitopatógenos. Teniendo en cuenta la toxicidad del ácido fusárico en células vegetales y de mamíferos, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad y estudiar los efectos del ácido fusárico en distintas características relacionadas con el biocontrol en *P. protegens* Pf-5.

Los resultados obtenidos demuestran que el ácido fusárico afecta negativamente el crecimiento, pero incrementa la formación de biopelículas. Por otro lado, cuando *P. protegens* Pf-5 se cultivó en presencia de ácido fusárico, se observó un notable incremento en la producción del sideróforo pioverdina, así como un aumento en la producción de biosurfactantes y en la cantidad de especies reactivas de oxígeno. Mediante titulación espectrofotométrica se pudo determinar que el ácido fusárico es capaz de quelar hierro.

De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, el ácido fusárico es tóxico para *P. protegens* Pf-5, lo cual incidiría negativamente en la eficacia de biocontrol de enfermedades de

marchitamiento causadas por *Fusarium spp.* productores de ácido fusárico. Entre los mecanismos de toxicidad se encontrarían el secuestro de hierro y el estrés oxidativo.

Palabras clave: ácido fusárico, *Pseudomonas protegens*, sideróforos

Fusaric acid, mycotoxin produced by *Fusarium spp.*, negatively affects growth of *Pseudomonas protegens* Pf-5 by means of iron sequestration and production of reactive oxygen species.

Summary

Fusaric acid is a metabolite produced by several phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium*. Several works have demonstrated that this compound is toxic for plant and mammalian cells. *P. protegens* Pf-5 is very well known because of its ability to suppress several soil-borne phytopathogens, including *Fusarium spp.*, however biocontrol efficiency is not consistent. Taking into account the toxicity of fusaric acid for plant and mammalian cells, the main aim of this work was to evaluate the toxicity and to study the effects of fusaric acid in different physiological traits related to biocontrol in *P. protegens* Pf-5.

The results demonstrate that fusaric acid negatively affects growth, but increases bacterial biofilm formation. When *P. protegens* Pf-5 was grown in the presence of fusaric acid, a notable increase in the production of the siderophore pyoverdine, as well as an increment in biosurfactant production and reactive oxygen species were observed. Spectrophotometric titrations revealed that fusaric acid chelates iron.

According to the data obtained in this study, fusaric acid is toxic to *P. protegens* Pf-5, which would negatively affect biocontrol efficiency of wilt plant diseases caused by *Fusarium spp.*, able to produce fusaric acid. Chelation of iron and oxidative stress would be some of the mechanisms of fusaric acid toxicity in *P. protegens* Pf-5.

Keywords: fusaric acid, *Pseudomonas protegens*, siderophores

Introducción

El ácido fusárico (AF, ácido 5-butilpiridin-2-carboxílico) [1] es un metabolito fúngico producido por varias especies de *Fusarium spp.*, que contribuye a las enfermedades de marchitamiento y pudrición en diversos cultivos [1-3], entre los cuales se incluyen miembros de las familias *Gramineae*, *Leguminosae*, *Alliaceae* y *Solanaceae*. Estas enfermedades causan importantes pérdidas económicas a nivel mundial [4-9]. Actualmente, la aplicación de fungicidas sintéticos es la estrategia más utilizada para el control de las enfermedades producidas por especies de *Fusarium*. Sin embargo, debido a los efectos nocivos de los fungicidas en el medio ambiente y a la aparición de cepas de hongos resistentes, el uso de rizobacterias como agentes de biocontrol se presenta como una alternativa promisorio.

Varios estudios han demostrado que las *Pseudomonas spp.* fluorescentes pueden colonizar raíces infectadas con *Fusarium oxysporum* [10], el productor principal de ácido fusárico, y suprimir las enfermedades causadas por estos hongos [11-13]. Sin embargo, diversos factores, entre los cuales podemos mencionar las propiedades físico-químicas del suelo y las interacciones que tienen lugar en la rizósfera entre plantas, hongos y bacterias, modulan la

eficacia de biocontrol de patógenos de suelo [14]. Para ilustrar este aspecto, podemos citar trabajos que demostraron que el AF limita la producción del metabolito anti-fúngico fenazina-1-carboxamida en *P. chlororaphis* [15,16] y reprime la expresión de genes involucrados en la síntesis del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) en *P. fluorescens*, tanto *in vitro* como *in vivo* [12,17]. Estos resultados sugirieron que el AF disminuye la capacidad de estas cepas de *Pseudomonas* para competir con los patógenos de suelo. Por otro lado, el AF es tóxico para células vegetales y de mamíferos [2,3,18], y varios mecanismos -aún no del todo esclarecidos- contribuirían a la toxicidad de este compuesto.

A excepción del efecto del AF en la producción de antibióticos importantes para el biocontrol, se ha estudiado muy poco acerca de la influencia de este metabolito fúngico en *Pseudomonas spp.* fluorescentes. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos del AF en el crecimiento, la formación de biopelículas, la producción de surfactantes, la producción de pioverdinias y de especies reactivas de oxígeno en la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5, la cual es bien conocida por sus propiedades de supresión del crecimiento de diversos patógenos de suelo.

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo

P. protegens Pf-5 [19] se cultivó con agitación a 30°C en medio LB o medio mínimo E₂ [20] suplementado con 1 mM MgSO₄, 0,1% (vol/vol) de solución de microelementos [20] y glucosa a una concentración final de 0,6% (m/vol). El medio sólido se preparó agregando 1,5% (m/vol) de agar. En caso necesario los cultivos se suplementaron con AF (Sigma, St. Louis, Mo.) a partir de una solución madre con una concentración de 280 mM, la cual se preparó disolviendo el compuesto en 18% (vol/vol) de metanol y ajustando el pH a 6,5 con 2 N NaOH.

Para evaluar el efecto del AF en el crecimiento, las células de un cultivo crecido durante toda la noche en medio E₂ suplementado con glucosa, se inocularon en medio fresco (con o sin AF). La densidad óptica inicial de la suspensión bacteriana a 600 nm (DO₆₀₀) se ajustó a 0,05. Los cultivos se crecieron en frascos Erlenmeyer a 30°C con agitación constante a 180 rpm.

Ensayos de cuantificación de bacterias adheridas (formación de biopelículas)

Se realizó un cultivo de *P. protegens* Pf-5 durante toda la noche en medio E₂ suplementado con glucosa. Se utilizó una alícuota de este cultivo para inocular placas de poliestireno de 96 pocillos que contenían 150 µl de medio fresco con o sin AF, de manera de obtener una DO₆₀₀ inicial de 0,05. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C en cámara húmeda. Después de la incubación, se midió la DO₆₀₀ de la suspensión de bacterias no adheridas (planctónicas), se eliminó todo el contenido de la placa y la misma se lavó con agua para eliminar todas las bacterias no adheridas a la superficie de poliestireno. La biomasa de las bacterias adheridas (biopelícula) se cuantificó mediante su tinción con cristal violeta y posterior determinación de la absorbancia a 595 nm (A₅₉₅), de acuerdo al protocolo de Merritt et al. [21]. Los valores obtenidos se normalizaron a la biomasa (DO₆₀₀) de las bacterias no adheridas. Este ensayo se repitió tres veces utilizando tres cultivos independientes en cada repetición y diez réplicas para cada cultivo.

Determinación de la producción de surfactantes

Se utilizaron cultivos crecidos en medio E₂ suplementado con glucosa en ausencia o presencia de 2 y 4 mM de AF, los cuales se incubaron durante 14 h a 30°C. Se centrifugó una alícuota de 5 mL de cada cultivo a 13.000 rpm para obtener el sobrenadante y se midió la tensión superficial de cada sobrenadante usando un tensiómetro de Du Noüy. Cada determinación se realizó por triplicado a partir de tres cultivos independientes.

Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las bacterias se cultivaron durante 14 h en medio mínimo E₂ suplementado con glucosa, en ausencia o presencia de 2 y 4 mM de AF. A fin de realizar un control positivo de estrés oxidativo, se incubó una suspensión de *P. protegens* Pf-5 con una DO₆₀₀ igual a 0,5 con 3 mM de H₂O₂ durante 1 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a baja velocidad y el pellet (botón de células) obtenido se resuspendió en NaCl 0,09% (m/vol). Una alícuota de esta suspensión se mezcló con la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) a una concentración final de 50 mM. La mezcla se incubó a 30°C durante una hora y se centrifugó a baja velocidad para retirar la sonda no internalizada. Finalmente, el pellet se resuspendió en NaCl 0,09%. Se determinó la cantidad de células positivas (que presentaron fluorescencia) por citometría de flujo usando un equipo FACS Ariall BD Cell Sorter (BD Bioscience) con un filtro FIT-C (Blue Diodo 488). El análisis de los datos se realizó usando el software Flow Explorer 4.2. Cada determinación se realizó por triplicado a partir de tres cultivos independientes.

Determinación de la producción de pioverdinas

La producción de pioverdinas se cuantificó utilizando los sobrenadantes de cultivos crecidos en medio mínimo E₂ suplementado con glucosa en ausencia o presencia de 2 y 4 mM de AF, por un período de tiempo de 35 hs. Luego de separar las células del medio por centrifugación (13.000 rpm), se colocaron 150 µl del sobrenadante en una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano y se determinó la producción de pioverdinas por medición de la fluorescencia emitida a 520 nm luego de la excitación con una longitud de onda de 420 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron a la biomasa (DO₆₀₀) de los cultivos y se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF).

Determinación de la formación de quelatos por titulación espectrofotométrica

El AF se diluyó en agua Milli-Q a una concentración final de 0,14 mM. El espectro de absorción UV del AF solo o el AF incubado con concentraciones crecientes de Fe²⁺ y Fe³⁺ se analizó por espectrofotometría (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) en el intervalo de longitud de onda entre 200 y 300 nm. Se prepararon soluciones frescas de los cationes correspondientes a una concentración de 0,01M en 0,01 N HCl, las cuales se mezclaron con AF y se incubaron durante 2 min para luego proceder a su medición. El AF mostró un máximo de absorción a 270 nm (A₂₇₀), y la intensidad se vio afectada por la unión al hierro. La intensidad de absorción medida a 270 nm se utilizó por lo tanto, para calcular la constante de afinidad (K_{0.5}) del AF para los iones férrico y ferroso. La K_{0.5} se corresponde con la concentración del catión que causa un

cambio en la absorción a 270 nm igual a la mitad de la máxima intensidad. Para obtener el valor de $K_{0.5}$ los datos se ajustaron al programa SigmaPlot (Jandel Scientific), utilizando la siguiente ecuación: $\Delta A_{270}/A_{270} = (\Delta A_{270}/A_{270\max}) \times [M]/(K_{0.5} + [M])$, donde ΔA_{270} es el cambio observado luego del agregado del catión correspondiente, A_{270} es la absorción inicial del AF en ausencia de hierro, $\Delta A_{270}/A_{270\max}$ corresponde al cambio de absorción máxima producido por el hierro, y $[M]$ es la concentración de Fe^{2+} o Fe^{3+} utilizada. Todas las mediciones se realizaron un mínimo de tres veces.

Resultados

El AF afecta negativamente la viabilidad celular y el crecimiento

Para evaluar el efecto del AF sobre el crecimiento de *P. protegens* Pf-5, se comenzó por determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de AF para esta bacteria. *P. protegens* Pf-5 se cultivó en medio E₂ suplementado con glucosa, al cual se le agregaron concentraciones crecientes de AF (2 a 12 mM). Bajo estas condiciones, se observó que el crecimiento bacteriano fue completamente inhibido al utilizar concentraciones de AF superiores a 7 mM. A partir de este resultado, se decidió trabajar con dos concentraciones sub-inhedoras de AF, 2 mM y 4 mM a fin de evaluar los efectos de esta micotoxina sobre características fisiológicas de *P. protegens* Pf-5 relacionadas con la supervivencia en la rizósfera y el control biológico.

Al analizar el efecto del AF sobre el crecimiento bacteriano, se observó que el agregado de este compuesto a una concentración de 2 mM no afectaba significativamente la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial ($\mu_{2\text{mM AF}} = 2,0 \text{ h}^{-1}$, $\mu_{\text{sin AF}} = 2,2 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, luego de 14 hs de cultivo, tiempo en el cual se alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento, la densidad óptica del cultivo disminuyó significativamente ($p < 0,05$), sugiriendo una posible lisis celular. Si bien el cultivo crecido en ausencia de AF también mostró una disminución de la densidad óptica, dicha disminución no fue tan pronunciada como la observada al agregar AF. Por otra parte, cuando el medio de cultivo se suplementó con 4 mM de AF, los valores de densidad óptica obtenidos fueron significativamente menores ($p < 0,05$) a los observados para los cultivos crecidos en ausencia de AF, tanto durante la fase exponencial como durante la fase estacionaria. La velocidad de crecimiento del cultivo crecido con 4 mM de AF resultó mucho menor que la del cultivo crecido sin el agregado de este compuesto ($\mu_{4\text{mM AF}} = 1,2 \text{ h}^{-1}$, $\mu_{\text{sin AF}} = 2,2 \text{ h}^{-1}$) (**Figura 1**). A fin de evaluar si la disminución de la densidad óptica durante la fase estacionaria se correspondía con un menor número de células viables (UFC/ml), se realizaron recuentos en placa a distintos tiempos, los cuales confirmaron que en presencia de AF el número de UFC/ml era significativamente menor (luego de 29 hs de cultivo se obtuvo un valor de $8,17 \times 10^{12} \pm 5,86 \times 10^{11}$ UFC/ml para el cultivo crecido sin AF; $2,97 \times 10^{10} \pm 3,51 \times 10^9$ UFC/ml para el cultivo crecido con 2 mM de AF y $2,67 \times 10^9 \pm 5,77 \times 10^8$ UFC/ml para el cultivo crecido con 4 mM de AF).

fig1

Figura 1: Efecto del AF en el crecimiento de *P. protegens* Pf-5 en medio mínimo E2 suplementado con glucosa. El crecimiento bacteriano se monitoreó cada tres horas por medición de la absorbancia a 600 nm (DO_{600}). Los valores representan el promedio entre las densidades ópticas de tres cultivos independientes $\pm$ el desvío estándar (D.S). Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos sobre las barras de error indican que existen diferencias

significativas respecto del control sin AF.

El AF produce un incremento en la formación de biopelículas

La capacidad de las bacterias para adherirse a una superficie y formar biopelículas es importante para su supervivencia en una gran variedad de ambientes y esta estructura organizada es la que predomina cuando las bacterias colonizan la superficie de la raíz [22-24]. Teniendo esto en cuenta, se evaluó el efecto del AF sobre la capacidad de formación de biopelículas en *P. protegens* Pf-5. Los resultados mostraron que la formación de biopelículas se incrementó significativamente ($p < 0,05$) en presencia de concentraciones sub-inhedoras de AF, observándose un mayor incremento en presencia de 4 mM de AF (**Figura 2**).

fig2

Figura 2: Efecto del AF en la formación de biopelículas en cultivos de *P. protegens* Pf-5. La capacidad de formación de biopelículas se evaluó luego de 24 hs de incubación a 30°C en medio mínimo suplementado con glucosa, con o sin el agregado de AF. Las bacterias se incubaron sin agitación en placas de poliestireno de 96 pocillos. Los valores representan el promedio entre la proporción de bacterias adheridas (A_{595}/DO_{600}) de tres cultivos independientes $\pm$ D.S. Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos sobre las barras de error indican que existen diferencias significativas respecto del control sin AF.

El AF incrementa la producción de surfactantes

Debido a que algunos surfactantes producidos por *Pseudomonas* del grupo fluorescente tienen un papel importante en la formación de biopelículas bacterianas [25,26], se estudió si la producción de los mismos se veía afectada en presencia de AF. La producción de estos compuestos se evaluó a través de la medición de la tensión superficial (?) de los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos crecidos en medio E₂ suplementado con glucosa. Los resultados, que se muestran en la **Tabla 1**, se expresaron como el porcentaje de disminución de ?, considerando como 0% la tensión superficial del medio sin inocular y sin AF (Control 1).

En primer lugar, se determinó la tensión superficial de los sobrenadantes de cultivos crecidos en ausencia de AF (Control 2). Bajo estas condiciones, se observó una disminución de la tensión superficial, lo cual indica que *P. protegens* Pf-5 produce surfactantes cuando se cultiva en medio E₂ suplementado con glucosa (producción basal de surfactantes). También se determinó si el AF tiene propiedades surfactantes *per se*. Para esto se agregó al medio de cultivo sin inocular, AF a dos concentraciones finales: 2 y 4 mM (Controles 3a y 3b, respectivamente). El agregado de AF al medio de cultivo produjo una disminución en la tensión superficial, que fue menor a la observada para el Control 2. Posteriormente, se midió la tensión superficial de los sobrenadantes de cultivos crecidos en presencia de 2 y 4 mM de AF (Tratamiento A y B, respectivamente). En este caso, se observó un porcentaje de disminución de ? superior al observado para los controles 2 y 3. Para descartar que este último resultado se debiera a un efecto aditivo entre el AF adicionado y los surfactantes producidos por *P. protegens*, se realizó un control adicional (Control 4). Para esto se agregó al sobrenadante del cultivo crecido en ausencia de micotoxina, AF a una concentración final de 2 y 4 mM (controles 4a y 4b, respectivamente). Bajo estas condiciones, se observó un porcentaje de disminución de

? mayor al observado en el control 2. Sin embargo, esta disminución fue significativamente menor ($p < 0,05$) a la observada en los tratamientos A y B, por lo que inferimos que en presencia de concentraciones sub-inhedoras de AF hay un aumento en la producción de surfactantes.

Tabla I: Efectos del AF sobre la producción de surfactantes

fig7

P. protegens Pf-5 se cultivó en presencia y ausencia de AF durante 14 h a 30°C con agitación. Se centrifugó una alícuota de 5 ml de cada cultivo para obtener el sobrenadante, al cual se le midió la tensión superficial utilizando el tensiómetro de Du Noüy. Los valores representan la media de los porcentajes de reducción de la tensión superficial (?) de tres cultivos independientes $\pm$ D.S. Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas respecto de los controles analizados.

El AF produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Compuestos cíclicos como el AF y el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) pueden generar O_2^- (anión superóxido) y causar estrés oxidativo. El daño celular por estrés oxidativo puede provocar la muerte celular debido a la destrucción de las macromoléculas [27,28]

Con el fin de determinar si el AF incrementaba la producción de ERO, se realizaron cultivos de *P. protegens* Pf-5 en medio mínimo E₂ suplementado con glucosa en ausencia y presencia de 2 y 4 mM de AF. Al mismo tiempo, se realizó un control positivo de estrés oxidativo, incubando una suspensión de *P. protegens* Pf-5 con 3 mM de H₂O₂ durante 1 h. La producción de ERO se determinó utilizando la sonda DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína). Hempel y colaboradores [29] demostraron que el DCFH-DA es capaz de sensar indirectamente O_2^- , ya que el anión superóxido es reducido a peróxido de hidrógeno mediante la acción de la superóxido dismutasa en el interior celular. El DCFH-DA solo se activa dentro de la célula, ya que al atravesar la membrana celular este compuesto es hidrolizado por esterasas pasando a su forma no fluorescente DCFH (2',7'-diclorodihidrofluoresceína). Finalmente, el DCFH sufre una reacción de oxidación con los radicales de oxígeno pasando a su forma fluorescente DCF. La intensidad de fluorescencia obtenida es proporcional a los niveles de ERO intracelulares. El porcentaje de células ERO positivas (células que presentan fluorescencia) fue analizado por citometría de flujo.

Como puede observarse en la **Figura 3 A y B**, el tamaño (FSC) y la complejidad celular (SSC) (referido a la complejidad del núcleo y la granulosidad celular) de *P. protegens* Pf-5 no se modificaron cuando las bacterias se incubaron con 3 mM de H₂O₂ (**Figura 3A**) o bien cuando se cultivaron en presencia de concentraciones sub-inhedoras de AF (**Figura 3B**). Cuando las células se incubaron con H₂O₂ el porcentaje de células reactivas a la sonda fue del 2,4%, superior al obtenido para el control sin AF (**Figura 3B**). Cuando las bacterias se cultivaron en presencia de 4 mM de AF (**Figura 3C, recuadros 5 y 6 y Figura 3D**) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de células ERO positivas, respecto al control sin AF (**Figura 3C recuadros 1 y 2 y Figura 3D**). Como puede observarse en el histograma 6 de la **Figura 3C**, en presencia de 4 mM de AF se observó la aparición de una nueva población de células con una intensidad de fluorescencia mayor que la población de células observada en los cultivos que fueron incubados sin AF (**Figura 3C, recuadros 1 y 2 y Figura 3D**) o con 2

mM de AF (**Figura 3C**, recuadros 3 y 4 y **Figura 3D**).

fig3

Figura 3: Efecto del AF en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en cultivos de *P. protegens* Pf-5. Una alícuota del pellet celular resuspendido en solución fisiológica se mezcló con la sonda DCFH-DA. La cantidad de células ERO positivas (células que presentan fluorescencia) se midió por citometría de flujo usando un equipo FACS Arianal BD CellSorter con un filtro FIT-C. A. Como control positivo de estrés oxidativo se incubó una suspensión de *P. protegens* Pf-5 con 3 mM de H₂O₂ durante 1 h. 1. Gráfico de puntos de FSC (*Forward scattering*) vs SSC (*Side scattering*), el cual representa el tamaño celular y el contenido de gránulos, respectivamente. 2. Gráfico de puntos FSC vs FITC-A, el cual representa el tamaño celular y el número de células que emiten fluorescencia, respectivamente. En color rojo se indica el porcentaje de células ERO positivas. 3. *Histogram Frequency* vs FITC-A, que representa el número de células y la intensidad de fluorescencia emitida, respectivamente. B, C y D. Se utilizaron cultivos crecidos durante 14 hs en medio mínimo con o sin AF. B. Gráficos de puntos de FSC vs SSC. C. Gráficos de puntos FSC vs FITC-A (1, 3 y 5) e histogramas *Frequency* vs FITC-A (2, 4 y 6). Se expone una de las muestras más representativas de cada condición. 1 y 2: cultivo incubado sin AF; 3 y 4: cultivo incubado con 2 mM de AF; 5 y 6: cultivo incubado con 4 mM de AF. En color rojo se indica el porcentaje de células ERO positivas. FITC: isotiocianato de fluoresceína. D. Comparación del porcentaje de células ERO positivas en ausencia y presencia de AF. Los valores representan la media entre los porcentajes de células ERO positivas (células que presentan fluorescencia) de tres cultivos independientes $\pm$ D.S. Los datos fueron analizados usando la prueba estadística de Kruskal-wallis.

El AF promueve la producción de pioverdina

En condiciones de escasez de hierro, *P. protegens* Pf-5 produce dos tipos de sideróforos, denominados pioverdina y enanto-pioquelina [30,31] que tienen una alta afinidad por este elemento. La producción de sideróforos es una estrategia fundamental para la supervivencia de las bacterias en la rizósfera, además de representar un mecanismo importante en el control de fitopatógenos por parte de *Pseudomonas* del grupo fluorescente [32,33].

Basados en la importancia de estos compuestos, se evaluó el efecto de concentraciones sub-inhedoras (2 y 4 mM) de AF sobre la producción de pioverdinas durante el crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa, observándose un aumento en la producción de estos sideróforos (**Figura 4A**) en presencia de ambas concentraciones de AF, luego de la entrada en la fase estacionaria de crecimiento (**Figura 1**). Asimismo, como se puede observar en la **Figura 4A**, el incremento en la producción de pioverdinas fue mayor a mayor concentración de AF agregada al medio de cultivo. La **Figura 4B** muestra la emisión de fluorescencia del sobrenadante de los cultivos, usando un transiluminador de luz ultravioleta (UV), luego de 16 hs de crecimiento.

fig4

Figura 4: Efecto del AF en la producción de pioverdinas en cultivos de *P. protegens* Pf-5. A. La producción de pioverdinas se cuantificó cada tres horas en el sobrenadante de cultivos crecidos en medio mínimo suplementados con glucosa con o sin el agregado de AF, a través de la medición de la fluorescencia emitida a 520 nm luego de la excitación a 420 nm. La intensidad de fluorescencia obtenida en cada caso se normalizó a la DO₆₀₀ de los cultivos y se expresa como unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestra el promedio de las mediciones de tres cultivos independientes $\pm$ D.S. Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos sobre las barras de error indican que existen diferencias significativas respecto del control sin AF. B. Emisión de fluorescencia de los sobrenadantes de los cultivos de *P. protegens* Pf-5 crecidos en medio mínimo durante 16 hs, con o sin el agregado de AF, al exponer los tubos a la luz ultravioleta (UV).

Por otra parte, dado que la producción de pioverdinas se induce en condiciones de baja disponibilidad de hierro en el medio, se decidió evaluar el efecto de distintas concentraciones de hierro (10 y 100 μM de sulfato de hierro) en la producción de pioverdinas en presencia y ausencia de AF (**Figura 5**). Cuando el medio de cultivo se suplementó con 10 μM de sulfato de hierro (concentración que aporta la solución de trazas del medio de crecimiento) y AF, se observó un incremento significativo en la producción de pioverdinas en presencia de ambas concentraciones de AF, respecto del control sin AF. Sin embargo, cuando las bacterias se cultivaron en condiciones de exceso de hierro (100 μM de Fe^{2+}) y AF, no se observaron diferencias significativas en la producción de estos sideróforos entre los cultivos crecidos en ausencia y presencia de AF. Este último resultado demostró que cuando el medio contiene altas concentraciones de hierro, la presencia de AF no afecta la producción de pioverdinas.

fig5

Figura 5: Efecto de la concentración de Fe^{2+} en la producción de pioverdinas en cultivos de *P. protegens* Pf-5 crecidos en presencia y ausencia de AF. El medio de cultivo se suplementó con 10 y 100 μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La producción de pioverdinas se cuantificó después de 16 hs de cultivo por medición de la fluorescencia emitida a 520 nm luego de la excitación a 420 nm. La intensidad de fluorescencia obtenida en cada caso se normalizó a la DO_{600} de los cultivos y se expresa como unidades relativas de fluorescencia (URF). Los valores representan el promedio entre las URF de tres cultivos independientes $\pm$ D.S. Los datos fueron analizados usando como prueba estadística ANOVA de un factor. Los asteriscos sobre las barras de error indican que existen diferencias significativas respecto del control sin AF.

El AF es capaz de quelar hierro

El resultado anterior demostró que el AF incrementa la producción de pioverdinas. Teniendo en cuenta que las pioverdinas se sintetizan y secretan cuando el hierro no se encuentra disponible para el microorganismo [30], se decidió evaluar la capacidad del AF de unirse y formar quelatos con los cationes Fe^{2+} y Fe^{3+} mediante titulación espectrofotométrica [32,35]. El AF fue capaz de unirse y formar quelatos estables con el ion férrico y ferroso, obteniéndose una constante de afinidad ($K_{0.5}$)=55 μM para Fe^{2+} y 10 μM para el Fe^{3+} . Este resultado demuestra que el AF posee la propiedad de quelar el hierro, haciéndolo no disponible para la célula, siendo el ión ferroso el que posee mayor afinidad.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio que comprendiera el análisis de los efectos de la micotoxina denominada ácido fusárico (AF) sobre distintas características de *P. protegens* Pf-5, de manera de obtener un conocimiento más abarcador de la interacción *Pseudomonas-Fusarium*. Cuando se analizó el efecto del AF en el crecimiento bacteriano en medio mínimo (**Figura 1**), se observó una significativa disminución en la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial en los cultivos crecidos con el agregado de 4 mM AF, pero no en los cultivos crecidos en presencia de 2 mM AF. Sin embargo, la viabilidad celular disminuyó significativamente luego de la entrada de las células en la fase estacionaria de crecimiento en presencia de ambas concentraciones de AF. Estos resultados demuestran que, aunque *P. protegens* Pf-5 es capaz de crecer en presencia de concentraciones de AF $\geq 7\text{mM}$, esta micotoxina genera una disminución significativa en su tasa de crecimiento y en la viabilidad celular. Trabajos realizados con rizobacterias Gram positivas con propiedades biocontroladoras

pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* indican que son mucho más susceptibles que *P. protegens* Pf-5 al AF [36,37].

Dado que el AF está involucrado en la patogenia de enfermedades de marchitamiento de un gran número de especies vegetales [38], existen varios trabajos que han estudiado su efecto en este tipo de células, encontrándose que el AF inhibe la respiración celular [39], afecta la permeabilidad y el potencial de membrana [38,40,41] e incrementa el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) [42]. En coincidencia con este último resultado, en este trabajo observamos un incremento significativo en la producción de ERO al cultivar a *P. protegens* Pf-5 en aerobiosis en presencia de 4 mM de AF (**Figura 3**). El incremento en los niveles de ERO puede ocasionar inactivación enzimática, daños en el DNA y peroxidación de lípidos [43], lo cual explicaría la marcada disminución en la densidad celular observada al cultivar las células bacterianas en presencia de la micotoxina (**Figura 1**).

Por otro lado, en presencia de AF se observó un incremento en la formación de biopelículas (**Figura 2**) y en la producción de surfactantes (**Tabla 1**). En *P. chlororaphis* se reportó que el AF disminuye la producción de acil-homoserin-lactonas (AHLs) [16], moléculas señal involucradas en la comunicación célula-célula (*quorum sensing*) en bacterias Gram negativas. Las señales que llevan a la producción de biopelículas en *Pseudomonas* spp. son muy complejas y responden a la presencia de AHLs, por este motivo una alteración en la producción de estas moléculas en respuesta al AF podría ser en parte responsable del efecto del AF sobre la formación de biopelículas. Las AHLs producidas por *P. protegens* Pf-5 aún no han sido caracterizadas. Si bien hemos intentado, mediante el uso de cepas biosensoras de AHLs de distinto número de carbonos, detectar la producción de AHLs en esta bacteria, no hemos obtenido resultados positivos con ninguno de los biosensores utilizados (datos no mostrados). Asimismo, tal como ocurre con la resistencia a los antibióticos [44], es posible que la estructura multicelular de las biopelículas bacterianas tenga la finalidad de incrementar la resistencia a la micotoxina. En cuanto a la producción de biosurfactantes, Bruijn y colaboradores demostraron que los biosurfactantes producidos por una cepa de *P. fluorescens* son necesarios para la unión de las células a distintas superficies y que mutantes incapaces de producirlos mostraban una marcada incapacidad de formación de biopelículas [25,26]. En concordancia con lo anterior, nuestros resultados demuestran que el AF además de incrementar la formación de biopelículas, aumenta la producción de surfactantes en cultivos de *P. protegens* Pf-5.

Una de las respuestas de *P. protegens* Pf-5 ante la presencia de AF fue un marcado incremento en la producción de pioverdinas. Dicho incremento fue además dependiente de la concentración de AF agregada (**Figura 4**). Mediante experimentos de *microarrays* se ha demostrado que la expresión de varios genes involucrados en la biosíntesis de pioverdina y el transporte de hierro se incrementa en presencia de AF en *P. chlororaphis* [16]. Un trabajo más reciente en el cual se analizó el transcriptoma de *P. protegens* Pf-5 en respuesta a la limitación de hierro, también reveló que la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de pioverdina y enanto-pioquelina (otro sideróforo producido por *P. protegens*), aumentaba marcadamente en estas condiciones [44]. Además, en células eucariotas el AF inhibe el crecimiento y el ácido picolínico, un compuesto estructuralmente similar al AF, impide la incorporación de hierro en las células [18]. Dado que las pioverdinas son sintetizadas en

condiciones en las cuales el hierro se encuentra escasamente disponible para las bacterias [30], los antecedentes previos y los resultados obtenidos en este trabajo nos sugirieron que el AF se uniría al hierro, haciendo que este compuesto esté inaccesible para las células. A fin de confirmar esta hipótesis realizamos análisis por espectrofotometría que confirmaron que el AF es capaz de quelar tanto el catión férrico como el ferroso, siendo el Fe^{3+} el que posee mayor afinidad por el AF. Dado que el hierro es un elemento presente en varias proteínas y coenzimas fundamentales para el crecimiento, su limitación como resultado del secuestro mediado por el AF podría provocar una disminución en la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, tal como se observó en la **Figura 1**.

Un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo se encuentra diagramado en la **Figura 6**. Los mismos aportan los primeros conocimientos de los efectos del AF sobre características de *P. protegens* Pf-5 relacionadas con su capacidad de supervivencia, colonización y competencia en la rizósfera, los cuales podrían ser aplicados en la mejora de esta cepa para ser usada como un inoculante en suelos contaminados con *Fusarium* spp. productores de AF. Se ha demostrado que el AF afecta negativamente el crecimiento y la viabilidad, lo cual podría ser explicado en parte por el incremento en la producción de ERO y el secuestro de hierro por el AF. Asimismo, las propiedades anfipáticas del AF y su capacidad de quelar metales, también podrían provocar una disminución en la estabilidad de las membranas celulares como ocurre en células vegetales, y de esta manera contribuir a la muerte celular [38,40]. Además, se observó que el AF incrementa la producción de surfactantes y la formación de biopelículas bacterianas. Estos efectos podrían llegar a estar relacionados. Suponemos que la inducción de la formación de biopelículas por parte del AF se debería a su efecto tóxico y que dicha estructura multicelular proporcionaría a las bacterias una mayor capacidad de tolerancia a este compuesto. Sin embargo, esta hipótesis debería ser probada. Finalmente, observamos que el AF es capaz de quelar Fe^{2+} y Fe^{3+} , lo cual provocaría una disminución del hierro disponible para las células bacterianas, induciendo la expresión de pioverdinas y en última instancia afectando el crecimiento y la viabilidad. Varios estudios han demostrado la importancia de los sideróforos en la supresión de enfermedades vegetales causadas por *Fusarium* spp. productores de AF [46-48]. Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una explicación para dicho efecto, ya que la capacidad de secretar pioverdinas parece ser una estrategia adaptativa para incrementar la supervivencia en presencia de este quelante de hierro. Esto último, remarca la importancia de utilizar cepas que produzcan niveles elevados de sideróforos en suelos contaminados con productores de AF y al mismo tiempo pone de relevancia la importancia de la fertilización de los suelos con hierro para el biocontrol de las enfermedades provocadas por *Fusarium*.

fig6

Figura 6: Esquema de los efectos del ácido fusárico en *P. protegens* Pf-5. En recuadros: resultados de los experimentos realizados. Sin recuadrar: posible explicación que conduzca al efecto observado en los experimentos realizados. Los signos más (+) reflejan la suma de los efectos.

Agradecimientos

Agradecemos a Claudio Valverde por facilitarnos la cepa *P. protegens* Pf-5.

Referencias:

1. **Capasso R, Evidente A, Cutignano M, Vurro M, Zonno MC, Bottalico A** (1996) Fusaric acid and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochemistry* 41: 1035-1039.
2. **Gapillout I, Milat ML, Blein JP** (1996) Effects of fusaric acid on cells from tomato cultivars resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *European Journal Plant Pathology* 102: 127-132.
3. **Mégnégneau B, Branchard M** (1988) Toxicity of fusaric acid observed on callus cultures of various *Cucumis melo* genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 585-588.
4. **Lori GA, Sisterna MN, Haidukowski M, Rizzo I** (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research* 158: 29-35.
5. **Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG** (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt pathogen. *Molecular Plant Pathology* 4: 315-325.
6. **Pioli RN, Mozzoni L, Morandi EN** (2004) First report about pathogenic association between *F. graminearum* and soybean. *Plant Disease Note* 88: 220.
7. **Reynoso MM, Chulse SN, Zeller KA, Torres AM, Leslie JL** (2009) Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 123: 207-215.
8. **Stenglein SA** (2009) *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. *Journal of Plant Pathology* 91: 25-36.
9. **Stenglein SA, Barreto D, Nicholson P, Chandler E, Brambilla V, Piris EM, Saliva V, Mitdieri M, Salerno GL** (2009) First report of *Fusarium poae* on tomato in Argentina. *Plant Pathology* 58: 401.
10. **de Weert S, Kuiper I, Lagendijk EL, Lamers GE, Lugtenberg BJ** (2004) Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1185-1191.
11. **Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Bij AJvd, Drift KMGvd, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PAHM, Tichy H-V, de Bruijn FJ, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ** (1998) Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1069-1077.
12. **Duffy BK, Keel C, Defago G** (2004) Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1836-1842.
13. **Saikia R, Varghese S, Singh BP, Arora DK** (2009) Influence of mineral amendment on disease suppressive activity of *Pseudomonas fluorescens* to *Fusarium* wilt of chickpea. *Microbiological Research* 164: 365-373.
14. **Haas D, Defago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.
15. **van Rij ET, Wesselink M, Chin A, Woeng TF, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ** (2004) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 557-566.
16. **van Rij ET, Girard G, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV** (2005) Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. *Microbiology* 151: 2805-2814.
17. **Notz R, Maurhofer M, Dubach H, Haas D, Defago G** (2002) Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2229-2235.
18. **Ramautar A** (2003) An investigation into the apoptotic inducing effect of fusaric acid on human lymphocytes and its role in cell growth inhibition [Master Thesis]. Durban: University of Natal.
19. **Howell C, Stipanovic R** (1979) Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69: 480-482.
20. **Lageveen R, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B** (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2924-2932.
21. **Merritt JH, Kadouri D, E., O'Toole GA** (2005) Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*: Unit 1B.1.1-1B.1.17.
22. **de Weger LA, van der Vlugt CIM, Wijffes AH, Bakker PA, Schippers B, Lugtenberg BJ** (1987) Flagella of plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato root. *Journal of Bacteriology* 169: 2769-2775.

23. **Lugtenberg BJ, Dekkers L, Bloemberg GV** (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* 39: 461-490.
24. **Rudrappa T, Biedrzycki ML, Bais HP** (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 64: 153-166.
25. **de Bruijn I, de Kock MJD, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM** (2007) Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 190: 2777-2789.
26. **de Bruijn I, Raaijmakers JM** (2008) Regulation of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP Protease. *Journal of Bacteriology* 191: 1910-1923.
27. **Cabiscol E, Tamarit J, Ros J** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3: 3-8.
28. **Touati D** (2000) Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 1-6.
29. **Hempel SL, Buetner GR, O' Malley YQ, Wessel DA, Flaherty DM** (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 146-159.
30. **Meyer JM, Abdallah MA** (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology* 107: 319-328.
31. **Youard ZA, Mislin GLA, Majcherczyk PA, Schalk IJ, Reimann C** (2007) *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 35546-35553.
32. **Hill-Cottingham DG** (1955) Spectrophotometric determination of iron chelates. Part I. *Analyst* 80: 906-908.
33. **Hill-Cottingham DG** (1957) Spectrophotometric determination of iron chelates. Part II. *Analyst* 82: 524-525.
34. **Hill-Cottingham DG** (1957) A spectrophotometric method of analysis of chelate solutions and its application to the study of iron chelates in soils and plants. *Soil Science* 84: 43-49.
35. **Malini S** (1996) Heavy metal chelates of fusaric acid: in vitro spectrophotometry. *Journal of Phytopathology* 57: 221-231.
36. **Bacon CW, Hinton DM, Hinton A** (2006) Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 100: 185-194.
37. **Landa B, B., Cachinero-Díaz JM, Lemanceau P, Jiménez-Díaz RM, Alabouvette C** (2002) Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
38. **Gaumann E** (1958) The mechanism of fusaric acid injury. *Phytopathology* 48: 670.
39. **Marre MT, Vergani P, Albergoni FG** (1993) Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 141-157.
40. **Pavlovkin J, Mistrik I, Prokop M** (2004) Some aspects of the phytotoxic action of fusaric acid on primary *Ricinus* roots. *Plant Soil and Environment* 50: 397-401.
41. **Koehler K, Bentrup F** (1983) The effect of fusaric acid upon electrical membrane properties and ATP level in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Z Pflanzenphysiologie* 102: 355-361.
42. **Kuzniak E** (2001) Effects of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *Journal of Phytopathology* 149: 575-582.
43. **Gutierrez PL** (2000) The metabolic of Quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. *Frontiers in Bioscience* 5: 629-638.
44. **Stewart PS, Costerton JW** (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
45. **Lim CL, Hassan KA, Tetu SC, Loper JE, Paulsen IT** (2012) The effect of iron limitation on the transcriptome and proteome of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *PLoS One* 7: e39139.
46. **Elad Y, Baker R** (1985) Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing *Pseudomonas* on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Ecology and Epidemiology* 75: 1047-1052.
47. **Elad Y, Baker R** (1985) The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Ecology and Epidemiology* 75: 1053-1059.
48. **Sneh B, Dupler M, Elad Y, Baker R** (1984) Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium*-suppressive soil. *Ecology and Epidemiology* 74: 1115-1124.

