

EFFECTO DE LA TESTA DE SEMILLAS DE *PHASEOLUS VULGARIS* L. Y BACTERIAS ANTAGONISTAS SOBRE HONGOS FITOPATOGENOS DEL SUELO COMO BASES PARA EL MANEJO INTEGRADO

Miriam Ramírez López ¹, Manuel Díaz Castellanos ¹, Amanda Martirena-Ramirez ², Arnaldo Dávila Cruz ¹, René Cupul ¹

1. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba
2. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba

Introducción

En nuestro país, el rendimiento del frijol común es bajo debido principalmente al ataque de plagas y enfermedades. Entre los organismos causantes, se encuentran los hongos del suelo. Se destacan entre las especies más importantes: *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid.), los que pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento del cultivo entre 25 y 50 % (González, 1988).

Para el control de estos microorganismos se han empleado métodos que incluyen el control cultural, control químico, entre otros. Estos métodos tienen sus inconvenientes específicos, por lo que las tendencias actuales se inclinan por un manejo integrado de los mismos. Entre los microorganismos que se usan como control biológico de patógenos, se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Killani *et al.*, 2011). Numerosos estudios se han desarrollado en nuestro país sobre el control de especies de hongos fitopatógenos que habitan en el suelo (Herrera, 2004). Sin embargo, en la actualidad estas enfermedades constituyen una causa importante de bajos rendimientos en los cultivos, por lo que se hace necesario incluir alternativas que contribuyan a las sostenibilidad de nuestras producciones agropecuarias.

Conocer la composición química de la testa de semillas de frijol común y determinar su efecto sobre microorganismos del suelo, podría contribuir al conocimiento de estas interacciones y al desarrollo de bioinoculantes más efectivos. Teniendo en cuenta las pérdidas ocasionadas por estos organismos, se hace necesario determinar caracteres químicos de las variedades asociados a la resistencia, así como alternativas de control que contribuyan al establecimiento de una estrategia de lucha para reducir sus afectaciones. Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos trazamos los siguientes objetivos: 1) Determinar el efecto de la composición química de testas de semillas de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo, 2) Determinar el efecto *in vitro* de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos del suelo.

Materiales y Métodos

3.1. Determinación del efecto de la composición química de testas de semillas de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.

3.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas de variedades de frijol común

Con el objetivo de determinar la composición química de la testa de semillas de tres variedades de frijol común: Delicias 364 (rojo), Bat 482 (blanco), Tomeguín 93 (negro), se realizó un tamizaje fitoquímico a los extractos acuosos, para lo cual se siguieron los procedimientos referidos en la Norma Ramal de Salud Pública 311/98. Para la descripción del resultado de los ensayos, se utilizó el sistema de cruces para especificar la presencia o ausencia de los metabolitos, en los tratamientos.

3.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común

El contenido total de fenoles fue determinado por el método colorimétrico con el reactivo Folin Ciocalteu (Dewanto *et al.*, 2002). La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método NaNO_2 - AlCl_3 , descrito por Liu y Zhu (2007), con modificaciones.

3.1.3 Determinación del efecto *in vitro* de extractos acuosos de testas de semillas de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

El efecto *in vitro* de los extractos acuosos, obtenidos de la testa de semillas de variedades del frijol común sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (AG4 HGI), *Macrophomina phaseolina* (CCIBP Mp2) y *Sclerotium rolfsii* (CCIBP-Scl 8) se determinó mediante el método del antibiograma.

Para determinar el halo de inhibición se evaluó a las 72h y para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, se utilizó la fórmula propuesta por Samaniego *et al.* (1989).

3.2 Determinación del efecto *in vitro* de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.

Con el objetivo de evaluar la actividad antagónica *in vitro* de las cepas bacterianas estudiadas frente a los hongos fitopatógenos del suelo, se utilizó el método de difusión en agar propuesto por Bauer *et al.* (1966). La inhibición del crecimiento micelial se evaluó según lo propuesto por Samaniego *et al.* (1989). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 4 repeticiones por tratamiento.

3.3 Procesamiento estadístico de los datos

Los resultados experimentales fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) a través del paquete estadístico SPSS versión 16.0. Para los tratamientos no homogéneos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis en la comparación de medias de rango obtenidas por Kruskal-Wallis se aplicó el programa Statistix versión 1.0.

Resultados y Discusión

4.1 Determinación del efecto de la composición química de testas de semillas de frijol común en la incidencia de hongos fitopatógenos del suelo.

4.1.1 Tamizaje fitoquímico de extractos de testas de semillas de variedades de frijol común

Las tres variedades de frijol común, presentaron diferencias cualitativas en cuanto a la composición química de sus extractos acuosos. En BAT-482 (Testa blanca) no se detectó la presencia de Fenoles (Tabla 1).

Al respecto, Días y Caldas, (2010) refieren que los colores de la testa del frijol están determinados por la presencia o ausencia de fenoles, los cuales son elaborados principalmente por las plantas, destacando las funciones importantes que estos cumplen, entre las que se encuentran formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos, mediante la síntesis de fitoalexinas.

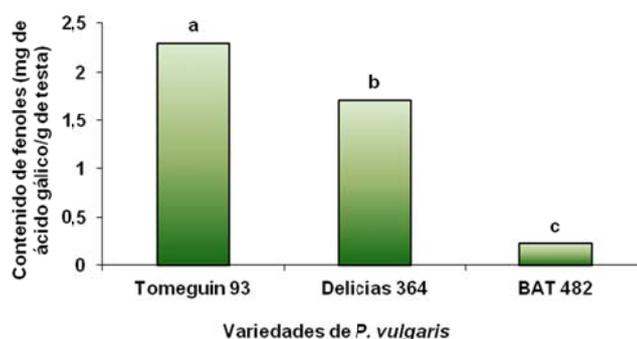
Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de extractos acuosos de la testa de tres variedades de *P. vulgaris*.

Metabolitos	Tomeguín 93	Delicias 364	Bat 482
Flavonoides	++	++	-
Fenoles y/o Taninos	+++	++	-
Alcaloides	+	+	-
Carbohidratos	+	+	-
Saponinas	-	+	-

Leyenda de los compuestos químicos: + presente, - ausente abundante:+++

4.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos acuosos obtenidos de testas de variedades de frijol común

La cuantificación de compuestos fenólicos mostró diferencias estadísticas significativas entre las tres variedades. Los mayores contenidos de fenoles se encontraron en Tomeguin-93, de testa negra, seguida por Delicias 364, con diferencias significativas entre las mismas, y en menor cuantía BAT 482, de testa blanca (Figura 1).

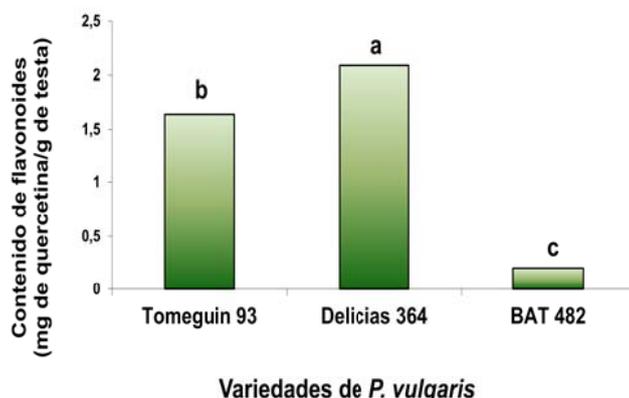


Letras desiguales difieren según la prueba Tukey para $p < 0,05$

Figura 1. Cuantificación de fenoles en extractos acuosos de testas de tres variedades de frijol común, expresados en mgGAE/g testa.

Al respecto, Telek y Freytag (1985) aislaron e identificaron compuestos fenólicos de testas de frijol negro, rojo y blanco; sin embargo no encontraron cantidades apreciables de fenoles en la testa del frijol blanco.

La cuantificación de flavonoides mostró diferencias significativas entre las tres variedades de frijol común. Los mayores contenidos de flavonoides se encontraron en la variedad de testa roja, seguido por la de testa negra, con diferencias significativas entre ellas, y en menor cuantía, la variedad de testa blanca (Figura 2).



Letras desiguales difieren según la prueba Tukey para $p < 0,05$

Figura 2. Cuantificación de flavonoides en extractos acuosos de testas de semillas de variedades de frijol común expresados en mg de Quercetina/g de testa.

4.1.3 Determinación del efecto *in vitro* de extractos acuosos de testas de semillas de variedades de frijol común, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Al analizar el efecto *in vitro* de los extractos acuosos de la testa de las semillas de las variedades se observaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento radial frente a los tres hongos fitopatógenos (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibición del crecimiento radial por extractos acuosos de testas de semillas del frijol común.

Extractos <i>M.phaseolina</i>	PICR		
	<i>S. Rolfsii</i>	<i>R. solani</i>	
T-93	51.75a	51.41 a	0
D-364	50.07a	51.38 a	0
BAT-482	0.00 b	0.00 b	0
EE (±)	3.93	4.25	0

Medias con letras desiguales en el sentido de las columnas difieren para $P < 0.05$ por la Prueba de Duncan

Estos resultados manifiestan la ausencia de sustancias bioactivas en la testa de las semillas, con efecto inhibitorio frente a estos hongos fitopatógenos. Se ha reportado que la susceptibilidad del frijol a *R. solani* estuvo asociada a la pigmentación de las semillas (Herrera, 2004). Este autor refiere que las variedades rojas y blancas fueron las que mostraron un mayor grado de susceptibilidad.

4.2 Determinación del efecto *in vitro* de bacterias antagonistas, sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos del suelo.

Los mayores valores de inhibición se encontraron en *S. rolfsii* para *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *B. cepacia* con 100, 100 y 80.72 % respectivamente y en *R. solani* para *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* con 100 %. (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento micelial *in vitro* de *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina* en presencia de bacterias antagonistas, a las 72 horas.

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial*			
Tratamiento <i>M. phaseolina</i>	<i>S. Rolfsii</i>	<i>R. solani</i>	
<i>B. cepacia</i>	80.72 a	67.04 b	70.27 ab
<i>B. subtilis</i>	100.00 a	66.26 b	78.30 a
<i>P. aeruginosa</i>	100.00 a	100.00 a	55.82 b
<i>P. fluorescens</i>	40.97 b	100.00 a	61.42 ab
EE (±)	7.76	5.75	3.62
CV (%)	13.30	23.20	18.20

Valores con letras desiguales en una misma columna difieren para $P < 0.05$ por la Prueba de Duncan.

Estos resultados pudieran estar relacionados con que determinadas especies de *Pseudomonas* y otros géneros bacterianos sintetizan fenazinas, que incluyen alrededor de 50 metabolitos secundarios pigmentados, los cuales ejercen efecto antifúngico (Ongena *et al.*, 2004).

Referencias

- Dewanto W., Wu X. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agric. Food Chem*, 50: 3010-3014, (2002).
- Díaz, AM y Caldas GV. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International*, 43 (2): 595–601, (2010).
- González M. Enfermedades fungosas del frijol en Cuba. Editorial Científico-Técnica. Ciudad de La Habana. Cuba. pp.152, (1988).
- Herrera L. Los hongos fitopatógenos el suelo en Cuba. Tesis presentada para la obtención del científico de Doctor en Ciencias. Santa Clara. Vila Clara. Cuba, pp. 287, (2004).
- Killani, A. S., Abaidoo, R. C., Akintokun, A. K., and Abiala, M. A. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. *Sciencepub*, 3(3), 11-18, 2011.
- Liu, B y Zhu Y. Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. *J. Food Eng*, 78: 584-587, (2007).
- Samaniego, G.; S. Ulloa y S. Herrera. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatología*, 8:86-95, (1989).
- Telek, L.; Freytag, G.F. Componentes fenólicos de las testas del fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios PCCMCA. Reunión Anual (Santo Domingo, República Dominicana), (1985).
- Ongena M, Duby F, Rossignol F, Fauconnier ML, Dommes J, Thonart P. Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a non-pathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 17, 1009–1018, (2004).