

UTILIZACIÓN DEL BIOPRODUCTO OBTENIDO A PARTIR DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Y *BACILLUS SUBTILIS* PARA EL CONTROL DE LA MARCHITES VASCULAR Y LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.).

Janet Rodríguez Sánchez¹, Grisel Tejeda González¹, José A. Fresneda Buides¹, Ernesto A. Mesa Vilorio¹, Lázaro Izquierdo Damas², Yoania Ríos Rocafull¹, Marisel Ortega García¹, Armando García Fernández¹, Ulises Socas Estrada¹ y Kattia Cañizares Hernández¹.

1. *Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”*
2. *Sede Universitaria de Artemisa.*

INTRODUCCION

La búsqueda de nuevos bioproductos de amplio espectro para ser utilizados con fines agrícolas se ha convertido en una tarea de primer orden. La elaboración de inoculantes mediante el co-cultivo de microorganismos con potencial biofertilizante y antagonista ha sido poco estudiado hasta el momento; aunque se conoce del uso de procesos mixtos para la obtención de productos empleados con fines medicinales y alimenticios (Kuang *et.al*, 2009).

En Cuba, una de las especies que más se cultiva de forma intensiva en los diferentes sistemas productivos es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), debido a su alta demanda. Sin embargo, es uno de los vegetales más atacados por patógenos, sobre todo en la fase inicial del cultivo y en los sistemas de cultivo protegido.

Fusarium oxysporum fsp. lycopersici Schlecht ex (Fr.) (Sacc.). Snyder and Hans, es el principal causante de la “Marchites Vascular”, que se considera una de las enfermedades más dañinas y persistentes donde quiera que crezca intensivamente el cultivo. Frecuentemente se afectan campos enteros de semilleros, lo que trae consigo disminución de la calidad de los frutos entre 5 y 60%, pérdidas incontables en semillas por concepto de contaminación, reducción importante de los rendimientos y severos daños económicos (Agrios, 2005).

Desde hace unos años en el INIFAT se trabaja en la formulación de un bioproducto de amplio espectro a partir de cepas seleccionadas de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus subtilis*. Los objetivos de la presente investigación fueron: evaluar la actividad antifúngica “*in vitro*” del bioproducto contra *Fusarium oxysporum fsp. lycopersici* y validar su uso para el tratamiento de semillas de tomate en experimentos “*in vivo*” y en condiciones de producción de posturas de la Agricultura Urbana.

MATERIALES Y METODOS

Para la obtención del bioproducto se utilizó la combinación de las cepas INIFAT-12 de *Azotobacter chroococcum* y INIFAT-101 de *Bacillus subtilis*. Las mismas se fermentaron en zaranda rotatoria a 200 r.p.m de agitación y 30°C de temperatura, durante 24 horas en un medio de cultivo propuesto para patente (Tejeda, 2009).

La evaluación de su actividad contra *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* se realizó por el Método de Envenenamiento del Medio (Patil *et.al*, 1986) sobre medio de cultivo PDA, inoculado con las muestras de los productos viables y estériles (autoclaveado) resultantes del proceso fermentativo al 10% de concentración. El experimento contó con cinco réplicas

por variante y se mantuvo durante 7 días a 28°C. La evaluación del crecimiento micelial se realizó a los 5 y 7 días de incubación, tomando la última medición para el cálculo de los porcentajes de control respecto al testigo.

Para validar el efecto del producto “*in vivo*” se utilizó un método de infección artificial con semillas de la variedad “INIFAT-28”, para lo cual fueron inoculadas con una suspensión de esporas del hongo de 10^7 esporas.mL⁻¹/mL o una dosis de 0.1 mL/semilla del bioproducto obtenido, el cual contaba con una concentración superior a 10^8 UFC.mL⁻¹.

Los ensayos tenían un total de cuatro tratamientos:

1. Testigo
2. Testigo Inoculado sólo con el hongo
3. Tratamiento preventivo(MBH)
4. Tratamiento curativo (HMB)

Cada tratamiento contó con cuatro réplicas de 50 semillas cada una. Las variables respuesta fueron evaluadas en distintos momentos. La promoción de la germinación a 24, 48, 72 y 144 horas después de la siembra, tomando como parámetro a la hora 24, la emergencia de la radícula. La estimulación del crecimiento en las plántulas fue determinada a los 7 días. Se midió la longitud de la radícula (cm) desde el cuello de la raíz hasta el extremo de la misma y del hipocótilo (cm), desde el cuello de la raíz hasta el punto de formación de la primera hoja verdadera y se contó el número de hojas de las plantas que las presentaban. La evaluación del número de semillas infectadas con el micelio y esporas del hongo, se realizó a los 15 días, bajo un microscopio estereoscópico para el cálculo de los porcentajes de control de cada producto en ambas formas de aplicación.

Todos los experimentos se mantuvieron durante 15 días a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad.

La evaluación en condiciones de producción de posturas se realizó en el organóponico “Plaza” del municipio Artemisa, provincia La Habana. Las semillas se sembraron en bandejas de cepellones que contenían una mezcla de 50% de suelo Pardo y 50% de humus de lombriz. El producto se aplicó de forma curativa al presentarse un brote natural de la enfermedad, con una dosis de 0.4 mL/semilla.

Todos los datos experimentales fueron procesados estadísticamente mediante Análisis de Varianza con Diseño Completamente Aleatorizado y se determinó la significación de las diferencias mediante Prueba de Rangos Múltiples de Duncan con el empleo del programa STATGRAPH 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSION

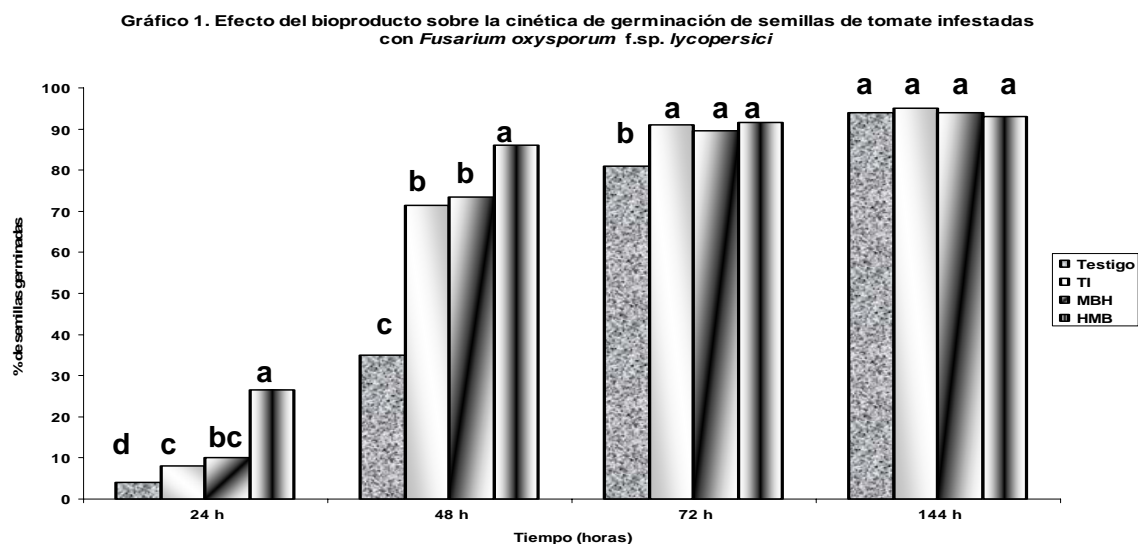
El bioproducto viable mostró un 100% de control contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, mientras que el autoclaveado, donde se encuentran los metabolitos termoestables derivados de ambos microorganismos, muestra un 14% de control respecto al testigo.

Los valores de porcentaje de control elevados en el caso del producto viable se deben fundamentalmente a que las bacterias mantienen su producción metabólica. En el caso de *Bacillus subtilis* se reconocen entre sus metabolitos sustancias antibióticas, antibacterianas y antifúngicas con diferentes mecanismos de acción, la formación de biopelículas, compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica (Souto *et.al*, 2004), enzimas quitinolíticas (Montealegre *et.al*, 2003) y metabolitos sideróforos, (Batch y Díaz, 2008). La capacidad de producir las mismas continúa siendo estudiada desde el punto de vista genético y bioquímico (Schallmey *et.al*, 2004).

En el caso de *Azotobacter chroococcum* se describe la producción de una sustancia fungistática soluble en éter, termoestable, que inhibe el crecimiento de importantes hongos fitopatógenos entre los que se encuentran *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. y *Alternaria* sp. (Durkhead *et.al*, 1998).

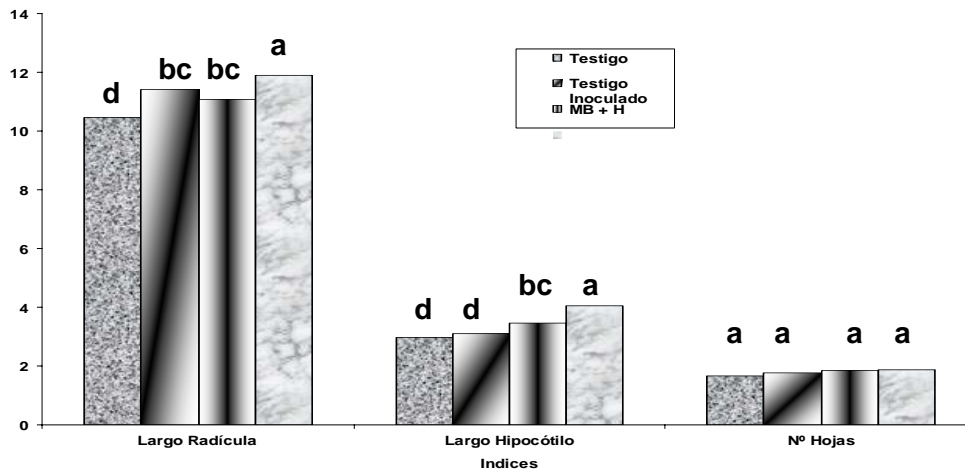
La actividad de los metabolitos termoestables, sin embargo, es baja. Esto puede atribuirse a la producción de sustancias termolábiles y volátiles, con marcado carácter antifúngico, que dan una respuesta óptima cuando las bacterias están presentes y que se pierden durante el proceso de esterilización, establecido para la obtención de los mismos, Estos resultados coinciden con una hipótesis planteada por Montesinos *et.al.*, (2002) quienes encontraron metabolitos volátiles en formas alcohólicas y de etileno derivados de una cepa de *Bacillus subtilis*.

El efecto del bioproducto sobre la germinación de las semillas de tomate, durante los ensayos de infección artificial, se muestra en el Gráfico 1. Se observa que a la hora 24 comenzó la emergencia de la radícula, siendo mayor en los dos tratamientos del producto, con diferencias significativas con respecto a los testigos. El incremento de la germinación fue de 23% para el caso donde el bioproducto fue aplicado de forma curativa y de 12% cuando se aplicó de forma preventiva.



El comportamiento de los principales índices fisiológicos en el primer estadio se muestra en el Gráfico 2. El bioproducto logró un incremento entre 6 y 14% en la longitud de la radícula y de 16% en la longitud del hipocótilo, cuando fue aplicado previamente y 36% cuando se aplicó de forma curativa, lo cual hace que esta forma de aplicación difiera significativamente del testigo.

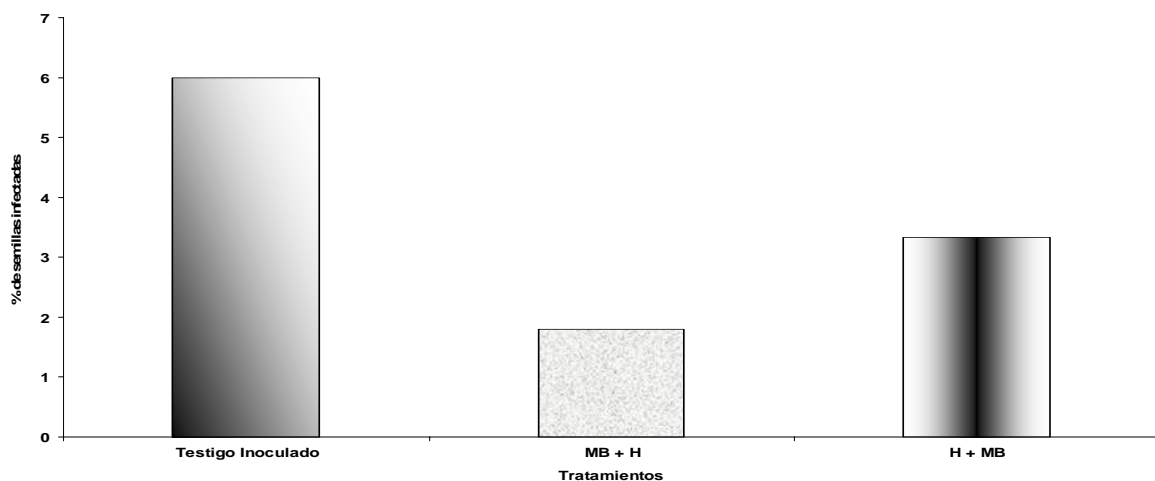
Gráfico 2: Efecto del bioproducto sobre los principales índices fisiológicos de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



Los resultados obtenidos denotan la tendencia del bioproducto como promotor de la germinación y estimulador del crecimiento vegetal, lo que permite afirmar que la capacidad de *Azotobacter chroococcum*, para producir fitohormonas y sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, no se pierde con la inclusión de cepas de *Bacillus subtilis* en el producto. Éste a su vez, provee a la semilla de mecanismos de defensa y logra inducir resistencia frente al ataque de los patógenos.

El Gráfico 3 muestra el control de la infección provocada a la semilla por el hongo. En el mismo se aprecia que ambos tratamientos logran disminuir el porcentaje de semillas infectadas. Fue más efectivo cuando se aplicó de forma preventiva donde alcanzó el 70% de control. En forma curativa sólo logra un 44% de control. Este comportamiento puede deberse a que la bacteria no deja establecer o completar el desarrollo de las estructuras fúngicas.

Gráfico 3: Efecto del bioproducto sobre el porcentaje de control de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



El efecto de la aplicación en condiciones de producción de posturas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto del bioproducto sobre los principales índices fisiológicos y en el control de la marchites vascular.

Variantes	Long. Raíz	Long. Tallo	Altura Plantas	Nº Hojas	Área Foliar	Diámetro Tallo	% Control
Testigo	4.55 a	8.60 b	13.85 b	3.77 a	27.85 b	0.201 a	--
INIFAT-12 + INIFAT-101	4.21 a	11.96 a	18.18 a	3.74 a	40.61 a	0.203 a	29.2
Desv. Est	0.1799	1.7711	2.28491	0.0283	6.7252	0.0024	
EsX	0.0077	0.0132	0.0424	0.0111	0.0139	0.001	
CV (%)	4.11	17.23	14.27	0.76	19.65	1.17	

Nota: Datos en columna con letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0.05$.

En la misma se aprecia que el bioproducto logra estimular la mayor parte de los índices fisiológicos evaluados en esta fase. En cuanto al control de la infección, el bioproducto manifestó su potencial de control en forma curativa, lo que se atribuye a la competencia que puede establecerse entre los microorganismos que no permiten la total inclusión del micelio en las plantas.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G. N. "The concept of Diseases in Plant and Types of Plant Diseases". *"Plant Pathology"*. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press, London. pp 29-31. (2005).
2. Bach, A. T y Díaz, M. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura Orgánica* (3): 35-38. ISSN: 1028-2130. (2008).
3. Durkhead, P; David, A. and Suninger, P. "Bioautography shows antibiotic production by soil bacteria isolated antagonistic to fungal dry rot of potatoes". *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (12): 1611-1616. (1998).
4. Kuang, Z; Ye, M; Xu, Z; Qiu, Y; Zhao, X; Luo, G; Pan, M and Cheu, W. Preparation method of fermented bean pulp rich in function peptide for feeding. Patente Nº 101455267. (2009).
5. Montealegre, J; Reyes, R; Pérez, L; Herrera, R; Silva, P and Bessoaiu, X. "Selection of Bioantagonistic Bacteria to be used in Biological Control of *Rhizoctonia solani* in Tomato". *Electronic Journal of Biotechnology*. ISSN: 0717-3458. (2003).
6. Montesinos, E; Bonaterra, A; Badosa, E; Francés, J; Alemany, J; Llorente, I and Moragrera, C. "Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control". *Int. Microbiol* 5: 169-175. (2002).
7. Patil, I. S; Kulkarni, S and Hedge, R. K. IV Encuentro Andaluz-Marroquí sobre la Química de Productos Naturales y I Congreso Marroquí-Español sobre la Química Orgánica. *Pesticides* 30-31. (1986).
8. Schallmeyer, M; Singh, A and Ward, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50 (1): 150 pp. (2004).
9. Souto, G; Correa, O; Montecchia, M; Kerber, N; Puchen, N; Bachur, M and García, A. "Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp Strain Excreting Surfactin and Antifungal Metabolites Partially Identified as Iturin- Like compounds". *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256, (2004).
10. Tejada, G. G. Comunicación personal. (2009).