

POTENCIAL USO DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS DE FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TOMATE Y PAPA¹

Cristina Vargas-Chacón²

RESUMEN

Potencial uso de microorganismos antagonistas de fitopatógenos que afectan el cultivo de tomate y papa. El objetivo fue evaluar la potencial eficacia biológica de bacterias endofíticas y rizosféricas, sobre patógenos de plantas solanáceas. Se aislaron los fitopatógenos *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. de plantas con síntomas de enfermedad. Se evaluó la inhibición del crecimiento de estos fitopátogenos con 61 aislamientos de bacterias del género *Bacillus* spp., aisladas de las raíces y tallos de solanáceas y la bacteria INTA-B37 de la colección del INTA, la cual en estudios anteriores demostró la eficacia biológica con fitopatógenos. Se determinó el halo de inhibición en mm en las evaluaciones con las bacterias fitopatógenas y el porcentaje de inhibición en caso de los hongos. Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos $p < 0.01$. La mayor inhibición de la bacteria *R. solanacearum* la ejerció el aislamiento BP31 y *P. carotovorum* fue significativamente inhibida por los aislamientos BP8 e INTA-B37. El tratamiento con INTA-B37 fue el que mayor porcentaje de inhibición logró contra *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, 60,5 % y 69 % respectivamente. El tratamiento con BP16, fue el que obtuvo la mayor reducción en la producción de estructuras de resistencia de *R. solani* (45 %), con relación al testigo y un porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en un 45.73 %. Tanto la bacteria BP16 e INTA-B37 demostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de los cuatro fitopatógenos evaluados. Se evidencia que existen alternativas biológicas, que pueden valorarse en campo, para ser incorporadas en el manejo integrado de las enfermedades causadas por los fitopatógenos estudiados.

Palabras clave: Control biológico, Solanaceae, Halo de inhibición, Porcentaje de inhibición.

Keywords: Biologic control, Solanaceae, Inhibition, Percentage inhibition.

INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades en los cultivos de papa y tomate son debidas a hongos y bacterias habitantes del suelo las cuales, en sistemas de cultivo convencionales, tradicionalmente se controlan con el uso de agroquímicos sintéticos. Las bacterias *Ralstonia solanacearum* y *Pectobacterium carotovorum* (anteriormente llamada *Erwinia carotovora*) y los hongos *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, son fitopatógenos de

1 FITTACORI e Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica.

2 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. Correo: mvargasch@inta.go.cr.

ambos cultivos, causan pérdidas económicas al productor y representan un problema mayor para los agricultores orgánicos o para aquellos que desean reducir el uso de agroquímicos.

R. solanacearum es el agente causal de la marchitez bacteriana o Maya en tomate causando una muerte rápida del cultivo (Chavez 2010; López 2016). En papa también produce la marchitez bacteriana o podredumbre parda (Rueda-Puente *et al.* 2014). La bacteria *P.carotovorum* produce pudrición suave o necrosis de la médula en tomate (López 2016) y pudrición del tallo y tubérculo en papa (Acuña *et al.* 2015). El hongo *Fusarium oxysporum* es uno de los fitopatógenos de mayor importancia agrícola por contar con una amplia gama de cultivos que afecta, algunos de alta restricción como el FocR4T del cultivo de banano y que no tiene cura. Tiene muchas formas especiales según los géneros de plantas que enferman. Se trata de un hongo que tiene varios mecanismos metabólicos que le permiten permanecer en el suelo por largo tiempo, entre ellos están el rápido crecimiento micelial, la producción de microconidias, macroconidias y clamidosporas, esta última es una estructura de resistencia de paredes gruesas que le permite al hongo permanecer vivo aún en condiciones adversas (Arbeláez 2000). Este hongo se caracteriza por causar marchitez, tizones y pudriciones en diferentes cultivos (Villa-Martínez *et al.* 2014) entre ellos la papa y el tomate. El fitopatógeno *Rhizoctonia solani* es un hongo que causa la necrosis del tallo en tomate y papa además de sarna o costra negra en tubérculos de papa (Escalona *et al.* 2011, Guedez *et al.* 2012).

Para el control de fitopatógenos de suelo, como los mencionados, tradicionalmente se han utilizados agroquímicos sintéticos. Sin embargo, se han estudiado bacterias como las del género *Bacillus*, que forman relaciones simbióticas benéficas con las plantas que favorecen los mecanismos de defensa contra fitopatógenos. Estas bacterias se pueden encontrar en la rizósfera o dentro de los tejidos vegetales (Narula *et al.* 2009) y producen sustancias bioactivas que pueden inhibir el crecimiento e incidencia de estos fitopatógenos mediante diferentes rutas metabólicas, muchas de ellas aún desconocidas (Ferrera y Alarcón 2001, Manzi y Mayz 2003, Monroy y Lizarazo 2010).

Otra de las características de las bacterias del género *Bacillus* spp., y que las hace interesantes para su estudio en el entorno de cambio climático en que vivimos, es que tienen la capacidad de crecer en condiciones ambientales desfavorables (Radhakrishnan *et al.* 2017) son bacilos Gram positivos, móviles, facultativos, forman esporas elipsoidales y pueden mantenerse vivas y reproducirse a temperaturas que van desde los 5 °C hasta los 45 °C (Blanco 2008). Se les reconoce su capacidad biocontroladora por sus múltiples mecanismos como la antibiosis, competencia por nutrientes e inducción de resistencia sistémica en plantas (Chowdhury *et al.* 2015, Fan *et al.* 2017). Con el estudio de estas bacterias se pueden seleccionar alternativas para el control biológico en la reducción de químicos y posiblemente como opción en los sistemas de producción orgánica o en transición. Por lo anterior, el objetivo de esta actividad fue evaluar la potencial eficacia biológica de bacterias endofíticas y rizosféricas, sobre patógenos de plantas solanáceas

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA de marzo del 2019 a agosto del 2020.

Se aislaron los microorganismos fitopatógenos de plantas de tomate y papa con síntomas de enfermedad. Los hongos fueron aislados en

placas Petri con el medio de cultivo comercial, agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido láctico al 25 % en la cantidad suficiente para lograr un pH de 5.0. Las bacterias fueron aisladas en placas Petri con el medio de cultivo comercial agar nutritivo (AN), sin ningún aditivo.

Aislamiento de bacterias provenientes de plantas sanas

Para el aislamiento de microorganismos endófitos y rizosféricos se tomaron muestras, en Oreamuno de Cartago y en Zarcero de Alajuela, de plantas de papa visiblemente vigorosas y sanas, las raíces con suelo y tallo fueron depositados en bolsas plásticas y se llevaron al laboratorio a fin de aislar aquellos microorganismos con potencial uso en el control biológico de enfermedades.

Una vez en el laboratorio, las raíces se sacudieron un poco a fin de dejar solo una pequeña cantidad de suelo adherida y con ayuda de un pincel, ese suelo rizosférico fue depositado en una placa Petri estéril. Se siguió el método descrito por Niedmann (2006), el cual utiliza la pasteurización como proceso selectivo de bacterias termorresistentes, como lo son las del género *Bacillus* spp, las cuales producen esporas que les permiten resistir estos cambios bruscos de temperatura. Para ello, se pesó 1g de suelo rizosférico y se colocó en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril. Seguidamente, el tubo se colocó en un baño maría a 65 °C por 30 minutos luego de los cuales se pasó inmediatamente a un baño de hielo, donde se mantuvo por 30 min. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron 10 ml a un tubo cónico de 2 ml y se agregaron 190 ml de agua destilada estéril. Finalmente, con un asa bacteriológica se tomó una asada y se rayó por dilución en una placa Petri con el medio comercial agar Luria Bertani (LB) y se incubó a 28 °C por 24 horas, a fin de obtener un crecimiento de bacterias separadas. Las bacterias fueron observadas por la morfología de la colonia, bordes, elevación, color y se repicaron separadamente en placas Petri con agar LB, se les asignó un código y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Para el aislamiento de microorganismos endófitos se tomaron los tallos y raíces de plantas sanas, se lavaron con abundante agua potable y se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 3.5 % por dos minutos. Seguidamente, se lavaron tres veces con abundante agua destilada estéril y se colocaron sobre servilletas estériles para eliminar el exceso de agua. El material vegetal fue colocado en placas Petri estériles, se cortaron en trozos de aproximadamente 0.5 cm de longitud y se sembraron en placas Petri con agar nutritivo (AN).

Las placas fueron incubadas en oscuridad a 30 °C por 2 a 5 días. Los microorganismos que crecieron fueron aislados en colonias individuales. Una vez puros, se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tinciones y pruebas bioquímicas

A las bacterias aisladas se les realizó las tinciones de Gram y de esporas. Además, se les realizó las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa a fin de confirmar que pertenecían al grupo de los bacilos esporulados, los cuales son Gram positivos, producen esporas, son catalasa positivo y oxidasa negativo.

Para la tinción de Gram, se realizó un frotis de la bacteria pura, de 24 h de cultivada, en un portaobjetos y se fijó pasándola varias veces por la llama. Seguidamente, se le colocó el tinte cristal violeta y se dejó por un minuto y se lavó con agua de tubo. Posteriormente, se dejó secar y se cubrió con la solución de lugol durante un minuto. Se eliminó el exceso de lugol y se decoloró con metanol al 95 %, se lavó con abundante agua y finalmente se agregó el colorante safranina por medio minuto, luego se lavó con agua y se dejó secar. Las bacterias Gram positivas se tiñeron de color violeta-azul y las Gram negativas de rosado.

Para la tinción de esporas un frotis de la bacteria fijado en la llama, se cubrió con el colorante verde de malaquita y se aplicó vapor de agua durante 5 minutos, luego se lavó con abundante agua de tubo y se le agregó el colorante safranina por un minuto, luego del cual se lavó con agua y se dejó secar. Al observar la lámina en el microscopio de luz, en el lente de inmersión de 100X, se observaron las esporas de color verde.

Para la prueba de catalasa, se colocó una colonia de la bacteria de 24 h sobre un portaobjetos y se le agregó unas gotas de peróxido de hidrógeno. Las bacterias catalasa positivo producen burbujas al agregar el peróxido.

Para la prueba de oxidasa, una colonia de la bacteria de 24 h se colocó sobre una tira de reacción de oxidasa. Las bacterias oxidasa positiva produjeron un color azul-negro y las negativas no produjeron ningún color.

Pruebas preliminares

Dado el gran número de bacterias con potencial biocontrolador aisladas, se realizaron pruebas preliminares a fin de seleccionar, mediante observación de la reducción del crecimiento radial de hongos fitopatógenos y la formación de halos de inhibición con bacterias fitopatógenas. Estas pruebas se realizaron por duplicado. Las bacterias con mayor potencial para ser usadas en el control biológico fueron utilizadas para realizar los bioensayos.

La metodología de las pruebas preliminares y las del bioensayo fue igual, excepto porque en las preliminares se realizan por duplicado en una misma placa Petri y su evaluación fue cualitativa; mientras que en los bioensayos se realizaron más repeticiones en placas diferentes y la valoración fue cuantitativa.

Método para evaluar el efecto de bacterias aisladas de plantas sanas sobre hongos fitopatógenos

Se colocó un disco del hongo fitopatógeno (crecido previamente en PDA), de aproximadamente 5 mm de diámetro en el centro de una placa Petri con el medio de cultivo PDA sin ácido. Seguidamente, se trazó una línea con la bacteria (de 48 horas de crecimiento previo), a cada lado del disco central a una distancia de 2,0 cm del borde de la placa (Figura 1). En el caso del hongo fitopatógeno de rápido crecimiento *R.solani*, la bacteria se colocó un día antes que el hongo. Los platos se incubaron a temperatura ambiente durante 3 a 6 días (según fue la velocidad de crecimiento del hongo).

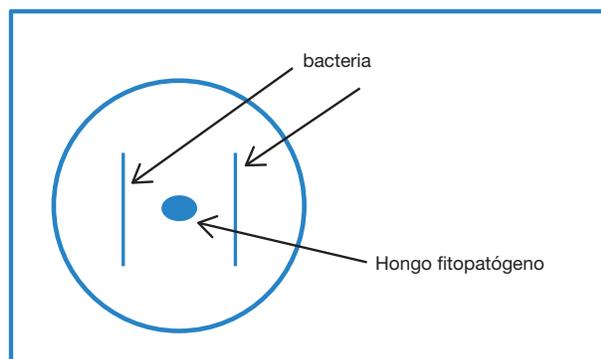


Figura 1: Ubicación de los microorganismos en la prueba de antagonismo.

La inhibición del crecimiento del hongo se evaluó para las pruebas preliminares, observando la inhibición del crecimiento radial del hongo y para los bioensayos se cuantificó el porcentaje de inhibición, para lo cual se midió la expansión de micelio R2, comparado con los controles en la misma placa (R1, lados sin bacteria) mediante la fórmula de Whipps (1987): $(R1-R2)/R1 \times 100$ (Figura 2).

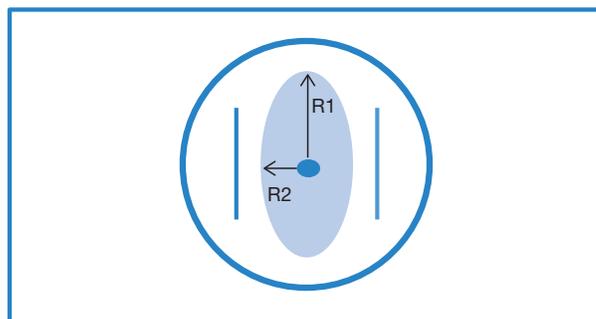


Figura 2: Líneas de medición para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento.

Método para evaluar el efecto de bacterias aisladas de plantas sanas sobre bacterias fitopatógenas

Para determinar este tipo de antagonismo se siguió el principio de estudio de doble capa propuesto por Dopazo (1988) con una modificación (uso de luz UV por 2 horas en lugar de cloroformo para matar la bacteria).

Las bacterias aisladas de plantas sanas, se cultivaron en caldo nutritivo comercial (CN) durante 18-24 horas hasta tener un crecimiento abundante, observable por la turbidez que alcanza el tubo. En una placa Petri con agar nutritivo, se colocaron tres gotas de 10 ml de la bacteria cultivada y se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se colocaron las placas bajo la luz ultravioleta por 2 horas a fin de matar la bacteria y solo dejar sus metabolitos. En la metodología original de Dopazo (1988) las bacterias se matan con vapores de cloroformo, pero dado que no se dispone de capilla de extracción, se realizó con luz UV a fin de evitar los vapores del solvente en el ambiente.

Con la bacteria fitopatógena, se preparó una solución bacteriana con el estándar de McFarland 2 equivalente a 6×10^8 UFC/ml y se agregó a un medio de cultivo tibio de AN, en una proporción del 10 %, y se agregó una segunda capa de 7 ml aproximadamente (segunda capa) sobre la placa Petri que contenía la bacteria muerta (primera capa) y se dejó gelificar. Los platos se incubaron por 2 a 4 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se observó la existencia de halos alrededor de la colonia “benéfica”, lo cual es indicativo de la actividad antibacteriana de los metabolitos producidos. En el caso de las pruebas preliminares, solo se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición y en los bioensayos se midió el halo de inhibición en cada repetición.

Bioensayos y pruebas estadísticas

Luego de las pruebas preliminares se seleccionaron las bacterias que evidenciaron mayor actividad antagonica, con las que se establecieron cuatro bioensayos, uno para cada fitopatógeno aislado. Se evaluaron siete tratamientos, incluido el testigo y cada tratamiento con seis repeticiones. Los tratamientos se dispusieron en un diseño irrestricto al azar.

Las variables a evaluar fueron: el halo de inhibición en el caso de bacterias fitopatógenas y el porcentaje de inhibición con los hongos fitopatógenos.

Para el hongo fitopatógeno *R.solani* además del porcentaje de inhibición se determinó el número de estructuras de resistencia (esclerocios) característicos de este hongo, producidos al tercer día de establecido el ensayo.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para las variables de tamaño y porcentajes de inhibición empleando modelos lineales generales y mixtos y una prueba de separación de medias según Fisher a una probabilidad de $p < 0,05$ para todas las comparaciones (Infostat 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron dos bacterias y dos hongos fitopatógenos de las plantas enfermas. Las bacterias fitopatógenas identificadas fueron *Ralstonia solanacearum* causante de la marchitez bacteriana en papa y en tomate (también conocida como maya) y *Pectobacterium carotovorum*, causante del pie negro en el tallo y la pudrición blanda en tubérculos de papa y el tallo suave o necrosis de la médula en tomate y los hongos aislados fueron *Fusarium oxysporum* causante de la marchitez fungosa o vascular en papa y tomate y *Rhizoctonia solani* agente causal de la necrosis del tallo en tomate y papa además de sarna o costra negra en tubérculos de papa.

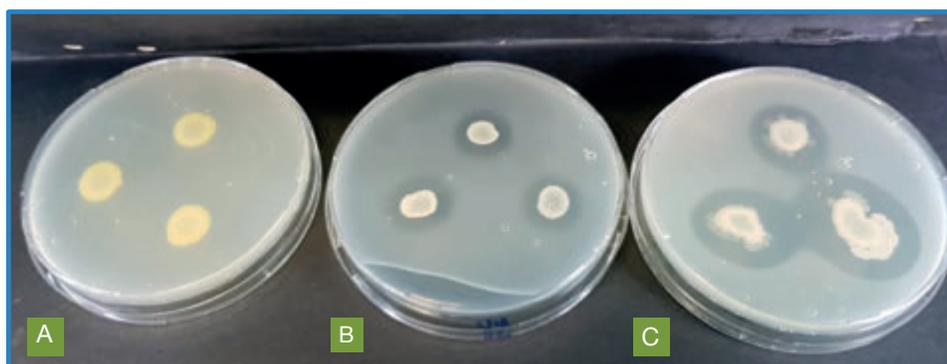
En total se aislaron 102 bacterias de plantas sanas de las cuales, se seleccionaron 61 aislamientos que, mediante las tinciones de Gram, esporas y las pruebas bioquímicas, catalasa y oxidasa fueron caracterizadas como bacterias del grupo de los *Bacillus* spp., al ser Gram positivas, producir esporas, y ser catalasa positivo y oxidasa negativo (Figura 3). Las esporas formadas por algunas de las bacterias aisladas fueron tan grandes (3-4mm), desde el punto de vista microbiológico, que no fue necesario teñirlas con verde de malaquita para poder ser observadas al microscopio a aumento de 100X.



Figura 3. Pruebas ejecutadas para selección de *Bacillus* spp. A) oxidasa negativo reacción sin color. B) oxidasa positivo, reacción con color. C) catalasa positivo con formación de burbujas. D) bacterias bacilares Gram positivas con endosporas.

Pruebas preliminares de bacterias del grupo *Bacillus* spp., sobre bacterias fitopatógenas

La formación de un halo de inhibición alrededor de la bacteria del grupo *Bacillus* spp., fue indicativo de que producto de su metabolismo se excretaron sustancias que se dispersaron por el medio de cultivo en forma radial y que impidieron la reproducción de la bacteria fitopatógena, en el área donde lograron llegar dichos metabolitos. En la figura 4, se observan los diferentes resultados obtenidos con la técnica utilizada. En el centro de las placas se encuentra la bacteria *Bacillus* spp., y lo opaco corresponde a la segunda capa que contiene la bacteria fitopatógena.



Bacillus spp.: Puntos centrales de crecimiento en las placas Petri.

Bacteria fitopatógena: área turbia en las placas Petri.

Metabolitos de *Bacillus* spp., con efecto antagonístico: Halo alrededor de los *Bacillus* spp.

Figura 4. Reacciones de inhibición. A) no hay inhibición. B) y C) hay inhibición en grado ascendente.

Pruebas preliminares de bacterias del grupo *Bacillus* spp., sobre hongos fitopatógenos

En la evaluación del efecto de bacterias contra hongos fitopatógenos, se observó una reducción en el crecimiento radial de hongo, así como un halo en el sitio donde se dispersaron los metabolitos excretados por la bacteria, que impiden el crecimiento del hongo (figura 5). Se observa en la figura 5a, que la bacteria BP8 liberó sustancias que inhiben el desarrollo del hongo *R. solani*, mientras que BP 41 no inhibe dicho desarrollo. En la figura 5b, la bacteria benéfica inhibió el crecimiento radial de *F. oxysporum* observándose un crecimiento alargado hacia donde la bacteria no está presente y en la figura 5c, se observa que la bacteria colocada a los lados del hongo no produjo sustancias inhibitorias del crecimiento, por lo que el hongo logró un crecimiento radial continuo e incluso el micelio se sobrepuso y sobrepasó a la bacteria.

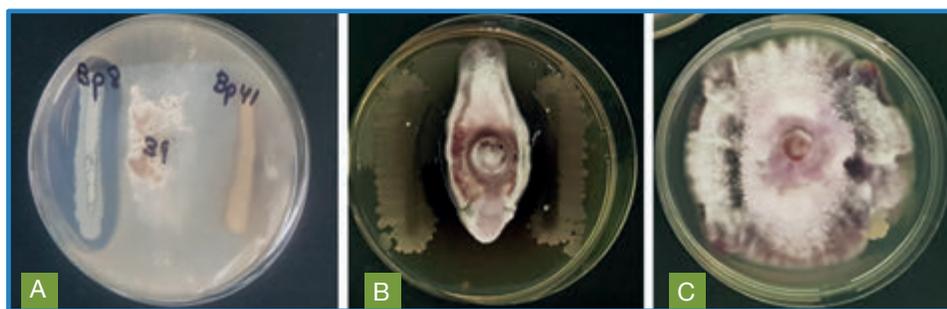


Figura 5. Inhibición de hongos fitopatógenos por efecto de metabolitos liberados por bacterias benéficas. A) bacteria PB8 inhibiendo el crecimiento del hongo *R. solani*, mientras que BP 41 no lo inhibe. B) efecto inhibitorio de una bacteria sobre *F. oxysporum*. C) hongo fitopatógeno sobrepasando el crecimiento bacterial.

En el cuadro 1 (anexo 1), se presentan el detalle de resultados de las pruebas preliminares. Un total de 23 *Bacillus* spp., produjeron halos de inhibición contra la bacteria fitopatógena *R. solanacearum* y solamente tres lo hicieron con *Pectobacterium carotovorum* (BP16, BP37 y B60).

Un total de ocho bacterias limitaron el crecimiento radial de *F. oxysporum* y cinco bacterias limitaron el crecimiento radial del hongo *Rhizoctonia solani*. Se debe destacar que las bacterias codificadas como BP8 y BP 16 lograron inhibir ambos hongos.

La bacteria BP16 presentó una inhibición en el crecimiento de tres de los fitopatógenos estudiados, lo cual la hace muy promisoría para continuar el estudio con otros microorganismos fitopatógenos.

Estos resultados preliminares indican que, si bien solo se tomaron muestras de dos zonas geográficas, la biodiversidad bacteriana de uso benéfico fue bastante grande a pesar de que solo se trabajaron bacterias del género *Bacillus* por lo que existe un gran potencial en nuestro país para trabajar con bacterias que tienen un efecto antagónico contra bacterias y hongos fitopatógenos. Como se observa en el anexo 1, el número de bacterias del género *Bacillus* spp., con efecto antagónico contra bacterias fitopatógenas fue mayor que contra hongos fitopatógenos. En el

INTA se ha trabajado por largo tiempo en el control biológico mediante el uso de hongos benéficos contra hongos fitopatógenos, pero los estudios con bacterias benéficas han sido escasos y en su mayoría han sido con productos comerciales, por lo que este estudio preliminar nos da una base para profundizar en el estudio de bacterias biocontroladoras existentes en diferentes sistemas agroecológicos.

Las bacterias que no presentaron ninguna inhibición con los fitopatógenos estudiados, pueden seguirse estudiando, ya que como se observa en el cuadro 1, los *Bacillus* spp., tuvieron un efecto variable con los patógenos evaluados, y eventualmente podrían tener un efecto benéfico con fitopatógenos diferentes a los incluidos en este estudio. Además, su acción benéfica podría ser la producción de sustancias que contribuyen a la sanidad y desarrollo de la planta, que la hacen más resistente a la presencia de fitopatógenos en el ecosistema. Al respecto, el trabajo realizado por Corrales y colaboradores (2017) indica que este tipo de bacterias puede formar asociaciones con la planta que contribuyen a la fertilización de los cultivos, favoreciendo el crecimiento vegetal produciendo enzimas que solubilizan fósforo, fijan nitrógeno o producen hormonas reguladoras del crecimiento. También se ha determinado, que algunas bacterias pueden inducir o encender los mecanismos de defensa de la planta (García 2014, Pedraza 2020).

Bioensayos

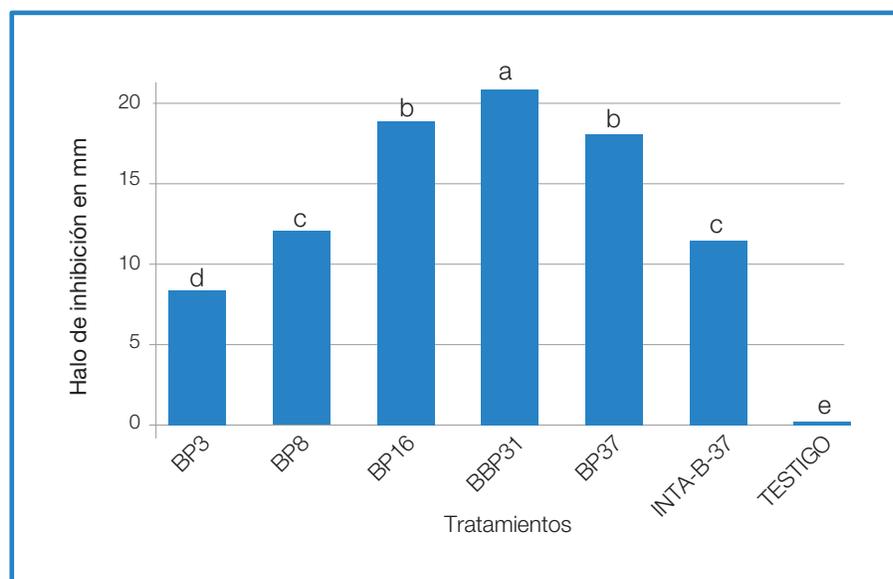
A partir de los resultados del estudio preliminar, se escogieron las seis bacterias indicadas en el cuadro 2. Las bacterias BP3, BP8 y BP16 fueron aisladas de la rizosfera de solanáceas sanas y la BP31 y BP37 son endófitas de la raíz de solanáceas sanas.

Cuadro 2: Tratamientos utilizados en los bioensayos.

Tratamiento	Código de la bacteria <i>Bacillus</i> spp.	Origen
1	BP3	Estación Experimental Carlos Durán
2	BP8	Estación Experimental Carlos Durán
3	BP16	Estación Experimental Carlos Durán
4	BP31	Estación Experimental Carlos Durán
5	BP37	Zaracero, Tapezco
6	INTA-B37	Desconocido contaminante en el laboratorio.
7	Fitopatógeno (testigo)	<i>R. solanacearum</i> : Nicoya, Guanacaste
		<i>P. carotovorum</i> : Oreamuno, Cartago
		<i>F. oxysporum</i> : Desconocido.
		<i>R. solani</i> : Guanacaste

Eficacia biológica de seis aislamientos de bacterias del género *Bacillus* spp. contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum*

Todos los tratamientos con las bacterias *Bacillus* spp., lograron inhibir el crecimiento de la bacteria fitopatógena *R. solanacearum* en placas Petri. Los seis tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo con una $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.96. El tratamiento BP31 fue el que mayor halo de inhibición logró diferenciándose de BP16 y BP37 ambos con inhibiciones bastante cercanas entre sí. Los tratamientos BP8 e INTA-B37 no se diferenciaron entre ellos e inhibieron al fitopatógeno, en aproximadamente la mitad del halo de inhibición lo que hizo BP31. El tratamiento BP3 se diferenció estadísticamente del resto, siendo el que formó el halo de inhibición del fitopatógeno más pequeño (7,9 mm) lo cual indica que fue el tratamiento que menos efecto tuvo en el desarrollo del fitopatógeno *R. solanacearum* (figura 4).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 4. Inhibición *in vitro* de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* por bacterias del género *Bacillus* spp.

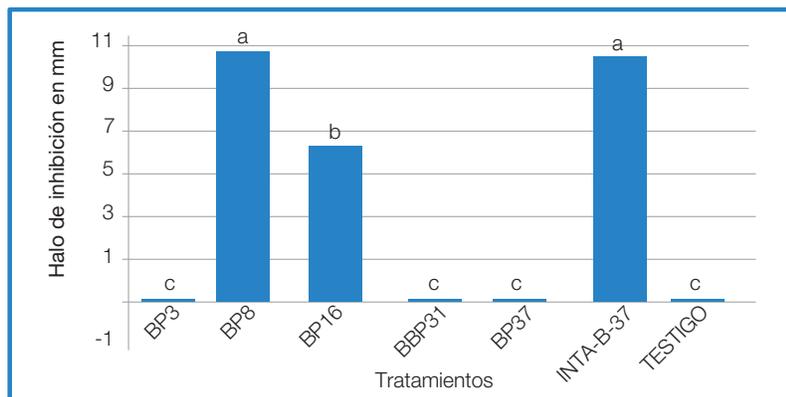
Los tratamientos BP31, BP16 y BP37 son las mejores opciones para continuar los estudios de control biológico, mejorar en los procesos de producción de metabolitos, y elaboración de un producto formulado que pueda ser utilizado en el manejo de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en los cultivos de papa y tomate, siendo más relevantes por la escasa viabilidad del manejo químico de la enfermedad por pequeños y medianos productores (Hernandez y Bunstamante 2001) y su imposibilidad en la agricultura orgánica. Además, el uso del control químico resulta costoso, poco eficaz sumado al impacto en el ambiente por el

uso de este tipo de sustancias (Universidad de Valencia sf).

Estos resultados también permiten cuestionarse, analizar y desarrollar mayor investigación sobre la identificación de las sustancias que están produciendo estas bacterias y la interacción de dichas sustancias a lo interno de la planta, siendo que BP31 y BP37 son bacterias endófitas. No menos interesante, resulta investigar la asociación y los mecanismos de defensa que puede ejercer la bacteria rizosférica BP16, desde la parte externa de la planta.

Eficacia biológica de seis aislamientos de bacterias del género *Bacillus* spp. contra la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas, con $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.89 entre los tratamientos entre los tratamientos BP8, BP16 e INTA-B-37 con relación al testigo en su capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum*. Los tratamientos BP3, BP31 y BP37 no se diferenciaron estadísticamente del testigo. Los mejores tratamientos fueron BP8 e INTA B-37 los cuales no se diferenciaron entre ellos, pero si con BP16 (figura 5).

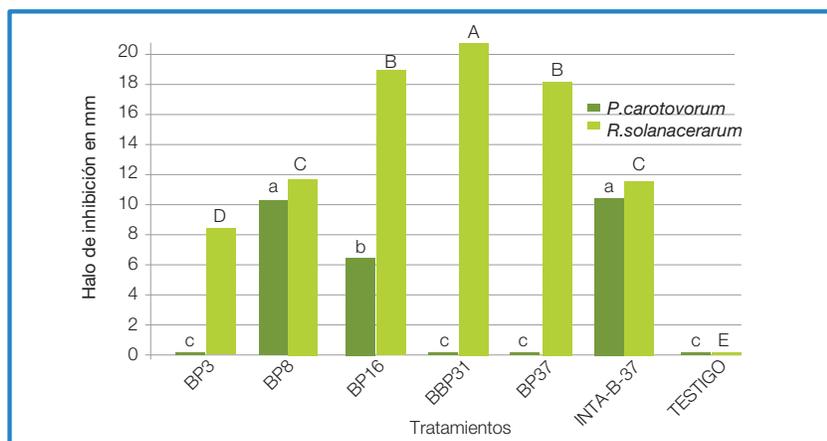


Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 5. Inhibición *in vitro* de la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* por bacterias del género *Bacillus* spp.

En la figura 6, se puede observar con mayor claridad el efecto de los tratamientos con las dos bacterias fitopatógenas evaluadas y nos facilita seleccionar el mejor tratamiento según sea el agente biótico causal de la enfermedad.

A la luz de los resultados, ante la ocurrencia de un problema causado por *R.solanacearum* la mejor opción sería el tratamiento con BP31. Sin embargo, es usual que una planta enferma, sea afectada por más de un fitopatógeno por lo que posiblemente, la mejor opción sea una formulación utilizando una mezcla de éstos *Bacillus* spp. Con estos resultados obtenidos pareciera ser, que una formulación de un consorcio microbiano compuesto por BP31, INTA-B-37 ó BP8 sería la mejor opción para el manejo de las bacterias fitopatógenas en estudio.

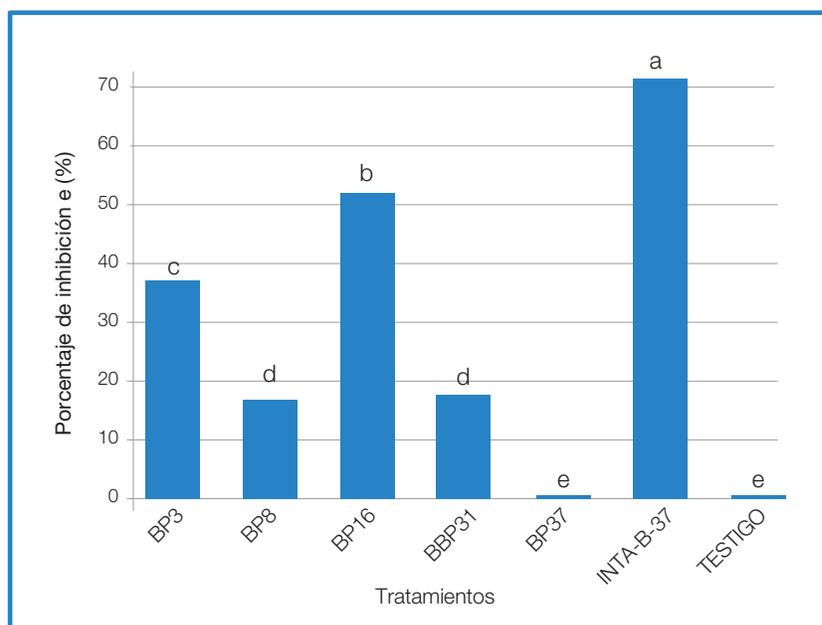


Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 6: Inhibición *in vitro* de las bacterias fitopatógenas (*Pectobacterium carotovorum* y *Ralstonia solanacearum*) por bacterias del género *Bacillus* spp.

Eficacia biológica de seis aislamientos de bacterias del género *Bacillus* spp. contra el hongo fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*

En este caso, un total de cinco tratamientos lograron inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. El tratamiento BP37 no se diferenció estadísticamente del testigo. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas, con $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.95, entre los tratamientos BP3, BP8, BP16, BP31 e INTA-B-37 y el testigo. El mejor porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* fue el tratamiento INTA-B-37 con un 69 %, le siguieron BP 16 y BP3 con un 57 % y un 42 % respectivamente. Los tratamientos que menor inhibición en el crecimiento del fitopatógeno fueron BP31 y BP8 con un 15 % y 10 % de inhibición respectivamente, estos tratamientos no se diferenciaron estadísticamente entre ellos (figura 7).



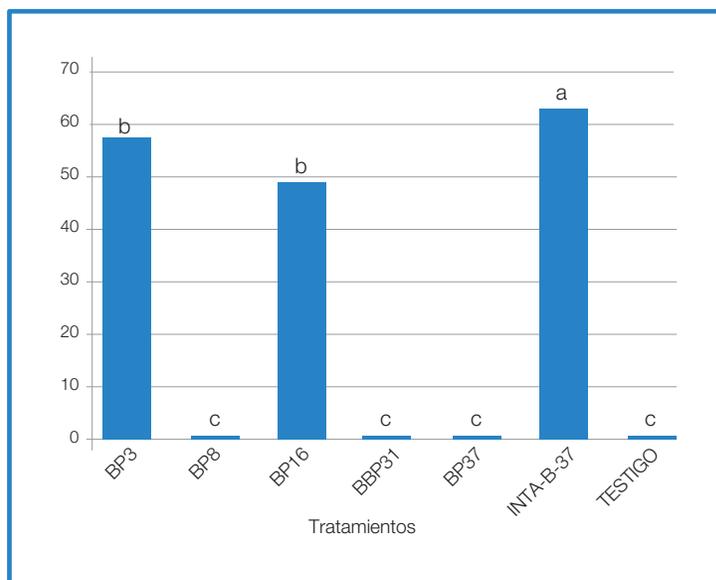
Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 7. Inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* por bacterias del género *Bacillus* spp.

Siendo éste un hongo fitopatógeno que afecta una gran cantidad de cultivos de importancia agrícola y que posee muchos mecanismos para permanecer en los sistemas productivos por largo tiempo, resulta importante continuar evaluando la producción de los metabolitos producidos por las bacterias estudiadas. Al respecto se ha determinado que algunos aislamientos de *B. subtilis* producen el antibiótico Iturina A, que a una concentración de 151.805 mg/L inhibió el crecimiento de *Fusarium* sp., en condiciones *in vitro* entre el 70 al 100 % (Ariza y Sánchez 2012). En este estudio, como se mencionó anteriormente, el bacilo INTA-B-37 logró una inhibición del 69 % queda pendiente determinar los metabolitos y mejorar el proceso de producción los mismos.

Eficacia biológica de seis aislamientos de bacterias del género *Bacillus* spp. contra el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

De los seis *Bacillus* spp., evaluados, tres lograron inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *R. solani*. Los tratamientos BP8, BP31, BP37 no lograron inhibir en absoluto al fitopatógeno. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas, con $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.89, entre los tratamientos BP3, BP16 e INTA-B-37 y el testigo. El mejor porcentaje de inhibición del crecimiento de *R. solani* fue logrado por el tratamiento INTA-B-37 con un 61 %, le siguieron BP3 y BP16 con un 46 % y un 45 % respectivamente. Los últimos dos tratamientos no se diferenciaron estadísticamente entre ellos (figura 8).



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 8: Inhibición en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* por bacterias del género *Bacillus* spp.

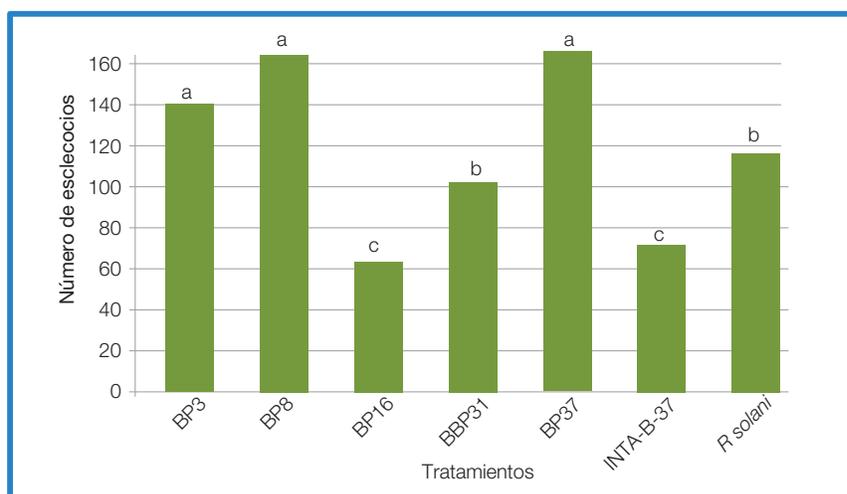
Se logró observar un efecto de los tratamientos respecto al número de estructuras de resistencia (esclerocios) producidos por el hongo fitopatógeno (figura 9).



Figura 9. Esclerocios producidos con varios tratamientos.

Se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos (figura 10) con $p < 0.0001$ y un R^2 de 0.71. Los tratamientos BP3, BP8 y BP37 incentivaron entre un 20 % y un 43 % la producción de las estructuras de resistencia (cuadro 3), lo cual no es conveniente ya que estas estructuras le permiten al hongo permanecer y resistir mayor tiempo en el suelo. La producción de esclerocios por el tratamiento BP31 no se diferenció estadísticamente del testigo.

Los únicos tratamientos que redujeron la producción de esclerocios fueron los tratamientos BP16 e INTA-B37. El hongo fitopatógeno sin efecto de ningún tratamiento produjo en promedio 112 esclerocios, por efecto del tratamiento BP 16 se redujo el número promedio a 64 esclerocios y con INTA-B37 a 69, equivalentes 43 % y 38 % respectivamente.



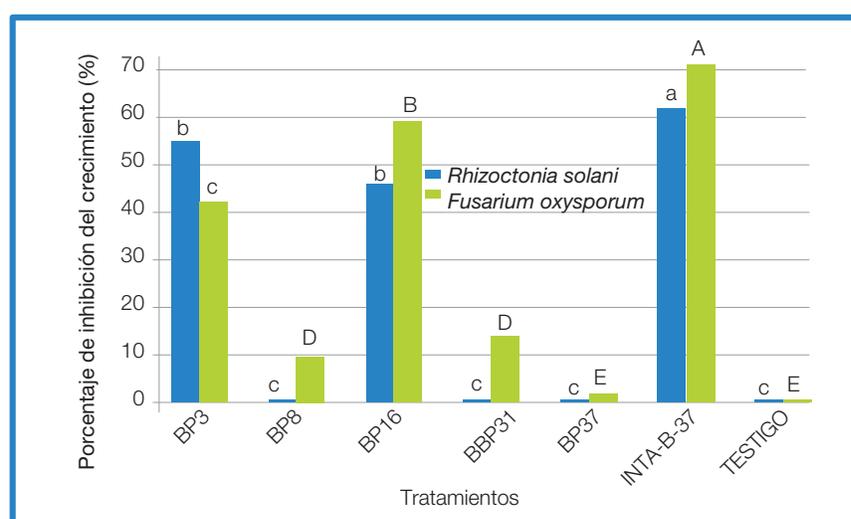
Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 10: Esclerocios producidos por *Rhizoctonia solani* en los diferentes tratamientos.

Cuadro 3: Porcentaje de incremento o reducción en el número de esclerocios según los tratamientos.

Tratamiento	N° de esclerocios	Porcentaje de reducción de esclerocios	Porcentaje de aumento de esclerocios
BP3	135	-	21
BP8	159	-	42
BP16	64	42	-
BP31	105	6	-
BP37	160	-	43
INTA-B37	69	38	-
Testigo (<i>R.solani</i>)	112	-	-

En la figura 11 se observa la combinación de los resultados de los tratamientos contra los dos hongos fitopatógenos de este estudio.



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,001$

Figura 11. Inhibición en el crecimiento de hongos fitopatógenos (*Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*) por bacterias del género *Bacillus* spp.

La bacteria benéfica INTA-B-37, es una buena opción para continuar los estudios de inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos. Sin embargo, si tomamos en cuenta la inhibición de la producción de esclerocios la combinación de esta bacteria con la BP16 puede ser beneficiosa ya que la BP16 inhibe mejor la producción de estas estructuras que la que hace INTA-B37.

CONCLUSIONES

En los sistemas agroproductivos existe una gran biodiversidad microbiológica que debe seguirse estudiando a fin de explorar opciones de control biológico de fitopatógenos de suelo.

Para el manejo de las bacterias fitopatógenas en estudio, los *Bacillus* sp., que mejor resultado dieron fueron BP8, BP31 e INTA-B-37.

Para el manejo de los hongos fitopatógenos en estudio, los *Bacillus* sp., que mejor resultado dieron fueron BP16 e INTA-B-37.

A pesar de que la bacteria BP3 inhibe el desarrollo del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* no se recomienda ya que promueve la formación de esclerocios que son estructuras de resistencia que favorecen la permanencia del hongo en el suelo.

RECOMENDACIONES

Se deben realizar estudios para determinar los metabolitos producidos por las bacterias promisorias.

Realizar investigaciones a fin de mejorar los procesos de producción de metabolitos eficientes por los *Bacillus* promisorios.

Realizar estudios con mezclas o consorcios microbianos promisorias en el control biológico para una posible formulación.

Realizar estudios en campo, con base en los resultados obtenidos de este estudio.

LITERATURA CITADA

Acuña, I; Muñoz, M; Snadaña, P; Orena, S; Bravo, R; Kalazich, J; Tejada, P; Castro, M; Sandoval, C. 2015. Manual interactivo de la papa (en línea). INIA, Chile. Consultado el 30 ene. 2021. Disponible en <https://manualinia.papachile.cl/?page=home>

Arbeláez, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum* (en línea). Agronomía Colombiana 17:11-22. Consultado el 30 ene. 2021. Disponible en <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538/22543>.

Ariza, Y; Sánchez, L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp (en línea). NOVA 10(18) 149-155. Consultado el 30 ene.2021. Disponible en <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1003>

Blanco, W. 2008. Aislamiento y caracterización parcial de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias o deshidratados (en línea). Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. UCR. San José, Costa Rica. 65p. Consultado el 30 de enero del 2021. Disponible en <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1057/1/29082.pdf>

- Chaves, A. 2010. Identificación, control de plagas y enfermedades en hortalizas con el uso de extractos naturales, hongos antagonistas y entomopatógenos (en línea). Consultado 18 ene. 2018. Disponible en <http://inta.go.cr/images/documentos/manuales/HongosAntagonistas.pdf>
- Chowdhury, SP; Hartmann, A; Gao, X; Borriss, R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers Microbiology* 6:780.
- Corrales, L; Caycedo, L; Gómez, M; Ramos, S; Rodríguez, J. 2017. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova* 15(27):45-65.
- Dopazo, C; Lemos, M, Lodeiros, C; Bolinches, J; Barja, J; Toranzo, A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens (en línea). *Journal of applied bacteriology*. Consultado 24 ene. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/227815245_Inhibitory_activity_of_antibiotic-producing_marine_bacteria_against_fish_pathogens
- Escalona, Y; Rodríguez, D, Hernández, A. 2011. *Rhizoctonia solani* Kühn aislado de papa (*Solanum tuberosum* L) en los estados Táchira, Mérida, Trujillo y Lara. I. Caracterización cultural (en línea). *Bioagro* 23(3):161-168. Consultado el 30 ene. 2021. Disponible en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S1316-33612011000300002&lng=es&tng=es
- Fan, H; Zhang, Z; Li, Y; Zhang, X; Duan, Y; Wang, Q. 2017. Biocontrol of bacterial Fruit Blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonización. *Frontiers in Microbiology* 8:1973.
- Ferrera, R; Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible (en línea). *Ciencia Ergo-sum*. V8(2). Consultado 15 ene. 2019. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10402108>.
- García, A. 2014. Mecanismos de defensa inducidos por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) contra *Phytophthora drechsleri*. Tesis de grado. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. México. 158 p.
- Guedez, C; Cañizales, L; Castillo, C; Olivar, R. 2012. Control de *Rhizoctonia solani* en tomate con el hongo *Trichoderma harzianum* (en línea). *Revista academia*. 11(24):207-213. Consultado 30 ene. 2021. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/236852505_Control_de_Rhizoctonia_solani_en_tomate_con_el_hongo_Trichoderma_harzianum
- Hernández, L; Bustamante, E. Control biológico de la marchitez bacteriana en tomate con el uso de enmiendas orgánicas (en línea). *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)* 62:18-28. Consultada 14 ene.2021. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/reprodoc/A2111e/A2111e.pdf>
- López, L. 2010. Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). INTA (en línea). Consultado 18 ene. 2018. Disponible en http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/06/Manual_tecnico_del_cultivo_de-tomate-3-min.pdf.
- Manzy, LV; Mayz, JC. 2003. Valorando los microorganismos (en línea). *Revista Sociedad Venezolana de Microbiología*. V23(1): 85-88. Consultado ene. 2019. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100018
- Monroy, L; Lizarazo, L. Identificación de hongos fitopatógenos asociados al roble (*Quercus humboldtii Bonpl*) en los municipios de Encino (Santander), Arcabuco y Tipacoque (Boyacá) (en línea). *Revista Colombia Forestal* Vol 13(2): 347-356. Consultado ene. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v13n2/v13n2a11.pdf>.
- Narula, N; Kothe, E; Behl, R. 2009. Role of root exudates in plant-microbe interactions (en línea). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 82: 122-130. Consultado el 25 ene. 2019. Disponible en <https://ojs.openagrar.de/index.php/JABFQ/article/.../2090/2475>
- Niedmann, L. Meza-Basso, L. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura técnica*. 66(3): 235-246.

Pedraza, L; López, C; Uribe-Vélez, D. 2020. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con las plantas(en línea). Acta Biológica Colombiana. 25(1):112-125. Consultada 14 ene. 2021. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v25n1/0120-548X-abc-25-01-112.pdf>.

Radhakrishnan, R; Hashem, A; Abd-Allah, EF. 2017. Bacillus: a biological toll for crop improvement through Bio-molecular changes in adverse environments. Frontiers Physiology 8:667.

Rueda-Puente, E; Hernández-Montiel, L; Holguín-Peña, R; Ruiz, F; López, J; Huez, M; Jiménez, J; Borboa, J; Ortega-García, J. 2014. *Ralstonia solanacearum*: una enfermedad bacteriana de importancia cuarentenaria en el cultivo de *Solanum tuberosum* L (en línea). INVURNUS, 9(1):24-36. Consultado 30 ene. 2021. Disponible en <file:///Users/cristinavargaschacon/Downloads/RuedaPuenteycol20141.pdf>

Samaniego-Gámez, B; Reyes-Ramírez, A; Moreno-Valenzuela, O; Tun-Suárez, J. 2017. Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp (en línea). Revista de Protección Vegetal (32):1. Consultado el 14 ene. 2021. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000100002

Universidad de Valencia. Sf. Procedimiento de control biológico de la marchitez causada por *Ralstonia solanacearum*, a través del uso de bacteriófagos específicos para ello (en línea). Banco de Patentes, España. Consultado el 14 ene.2021. Disponible en <http://bancodepatentes.gva.es/documents/161324488/161643401/marchitez+gonzalez+E.pdf/5d293cbd-2403-48f2-aa41-dc2230ad8010>

Villa-Martínez, A; Pérez-Leal, R; Morales-Morales, A; Basurto-Sotelo, M; Soto-Parra, J; Martínez-Escudero, E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp., y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales (en línea). Acta agronómica 64 (2):194. Consultado el 30 ene. 2021. Disponible en https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/43358/49856

Whipps, JM. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glass-house pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist 107(1): 127–142.

ANEXO 1

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE FITOPATÓGENOS

Pruebas preliminares

Cuadro 1. Resultados de la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas por efecto de bacterias del género *Bacillus* spp., INTA, 2019.

Bacteria	Rs	Pc	Fo	Rzs
BP 1	-	-	-	-
BP2	-	-	-	-
BP3	-	-	-	++++
BP5	-	-	-	-
BP6	-	-	-	-
BP7	-	-	-	-
BP8	-	-	++	++++
BP9	-	-	-	-
BP10	-	-	++++	indefinida +/-
BP11	-	-	++	-

Bacteria	Rs	Pc	Fo	Rzs
BP12	-	-	indefinida +/-	indefinida +/-
BP13	-	-	-	-
BP14	-	-	-	-
BP16	-	+++	+++	++
BP17	-	-	-	-
BP18	+	-	-	-
BP19	-	-	-	-
BP22	-	-	-	-
BP25	-	-	-	-
BP28	-	-	-	-
BP30	++	-	-	+
BP31	++++	-	-	+
BP33	-	-	+	-
BP34	-	-	+	-
BP35	++	-	-	-
BP36	-	-	+	-
BP37	++++	++++	-	-
BP38	-	-	-	-
BP39	-	-	-	-
BP41	-	-	-	-
BP42	-	-	-	-
BP43	-	-	-	-
BP44	-	-	-	-
BP46	-	-	-	-
BP48	-	-	-	-
BP49	-	-	+	-
BP50	+	-	-	-
B29	++++	-	-	-
B30	++++	-	-	-
B32	-	-	-	-
B34	++++	-	-	-
B35	++++	-	-	-
B36	++++	-	-	-
B38	-	-	-	-
B39	++++	-	-	-
B41	++++	-	-	-
B42	++++	-	-	-
B43	++++	-	-	-
B44	++++	-	-	-
B46	++++	-	-	-
B47	-	-	-	-
B48	++++	-	-	-
B50	++++	-	-	-
B51	++++	-	-	-
B52	-	-	-	-
B53	-	-	-	-
B54	-	-	-	-
B58	++++	-	-	-
B59	++++	-	-	-
B60	-	++	-	-
B61	++++	-	-	-

Rs: *Ralstonia solanacearum*. Pc: *Pectobacterium carotovorum*. Fo: *Fusarium oxysporum*. Rzs: *Rhizoctonia solani*.

+: hubo reacción de inhibición

- : No se dio inhibición

+/- Indefinida: la reacción inhibitoria no se mantuvo en el tiempo evaluado.

Cada + representa aproximadamente 1 mm en la inhibición del fitopatógeno