

Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano

Noja Izzeddin A, Luis Medina T.

RESUMEN

Tomando en consideración el efecto adverso que provocan los pesticidas al medio ambiente y la salud y la posibilidad de al menos minimizar su uso, se investigó el efecto del control biológico de tres antagonistas microbianos (*Trichoderma viride*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*), sobre fitopatógenos causantes de enfermedades en vegetales como: tomate, cebolla y pimentón. Los ensayos se realizaron en semillas de estos tres rubros infectadas experimentalmente con tres fitopatógenos (*Phytophthora* spp, *Fusarium monilliforme* y *Rhizoctonia solani*). Inicialmente, el efecto de los antagonistas sobre los fitopatógenos se determinó en medios de cultivo Sabouraud sólido (agar) y líquido (caldo). Posteriormente, 35 semillas de cada una de las especies vegetales seleccionadas se sometieron a diferentes tratamientos: I- Grupo control, sin ninguna adición; II-Grupo tratado con los antagonistas y III- Grupo infectado con los fitopatógenos. Todos los grupos se sembraron en tierra abonada, a cielo abierto y a temperatura ambiente y regados dos veces diariamente con agua. Adicionalmente, al grupo III se le agregó diariamente un inóculo de 0,1 mL de antagonista (10^4 UFC/mL). El desarrollo de las plantas se monitoreo por dos semanas determinándose el número de semillas germinadas, la longitud de las plántulas y el follaje. Los resultados se analizaron a través de Statistix 8.0, pruebas Tukey y Kruskal-wallis. Los antagonistas inhibieron la proliferación de los fitopatógenos en medio Sabouraud. Los experimentos con semillas demostraron una mayor estimulación de la germinación y tamaño de las plántulas en el grupo tratado con fitopatógenos y antagonistas respecto al grupo control ($p < 0,1$).

Palabras clave: control biológico, fitopatógenos, hortalizas.

ABSTRACT

Biological control effect by antagonist on plant pathogens in vegetables for human consumption

Taking in account the negative actions of pesticides exert on natural environment and health and due to the possibility to minimize/eliminate its use, the effect of microbial antagonist (*Trichoderma viride*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*), were evaluated on tomato, onion and pimento seeds experimentally infected with three known phytopatogens (*Phytophthora* spp, *Fusarium monilliforme* and *Rhizoctonia solani*). Initially, the antagonist effect on the phytopatogens were studied on Sabouraud solid (agar) and liquid (broth) media. Further 35 seeds of each vegetable were treated according to the following experimented protocol group I (control): no addition and water, group II (treated): antagonist and water, group III (infected): antagonist, water and phytopathogens. All groups were grown on soil, under sun light, at room temperature and water was added twice a day. Group III was daily infected with 0,1 mL of the antagonist suspensions (10^4 UFC/

mL). The plant development was followed for 2 weeks, determining number of germinated seeds (germination index), plantule length and foliage. The results obtained was analyzed with Statistix 8.0, Tukey and Kruskal-Wallis. The antagonist inhibited the proliferation of the phytopathogens in Sabouraud media. The seed treated and infected showed a higher index of germination and plantule respect to the control and treated groups ($p < 0,1$).

Key words: biological control, plant pathogens, vegetables.

INTRODUCCION

Uno de los métodos más utilizados para contrarrestar las pérdidas en cultivos agrícolas por organismos o plagas causantes de enfermedades es el uso de pesticidas. Estas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de organismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico (1).

Conociendo así los efectos adversos que causan los agroquímicos, actualmente la tendencia en el área agroindustrial, se inclina cada vez más a la disminución tanto de costos en la producción como de la presencia de residuos de pesticidas en los productos agrícolas y en el medio ambiente, situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de plagas (2). Así, con la finalidad de ampliar los estudios realizados en el uso de productos biológicos a nivel agroindustrial se seleccionaron algunos microorganismos causantes de enfermedades en plantas comunes como tomate, pimentón y cebolla, a fin de estudiar la capacidad antagónica de algunos microorganismos.

A través de la producción de bacteriocinas o antibióticos, ciertos microorganismos afectan negativamente el desarrollo de fitopatógenos, limitando así la iniciación y propagación de la enfermedad (3-5). Uno de estos géneros antagónicos es *Bacillus*, dadas sus potencialidades en inhibición de fitopatógenos de suelos y promoción de crecimiento de las plantas (6). Investigaciones realizadas han demostrado que el uso de bioantagonistas como *Paenibacillus lentimorbus*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma polysporum*, pueden controlar el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (7, 8).

Los resultados indicaron que la aplicación de estas cepas podría ser recomendada dentro de un programa de control integrado de *R. solani*. Además, se ha demostrado que el uso de conidias de ciertos hongos antagonistas inhibe el crecimiento del patógeno *Phytophthora capsici* (9). Otro estudio mostró que los hongos micorrizógenos promueven el crecimiento y producción de plantas de interés agrícola, debido a que facilitan la absorción de nutrientes, mejoran

Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada.
Departamento de Microbiología. Universidad de Carabobo

Correspondencia: Noja Izzeddin.

E-mail: nizzeddin@uc.edu.ve

Recibido: Enero 2010. **Aceptado:** Junio 2011

la estructura del suelo, el balance hídrico y protegen a las plantas contra patógenos (5). Uno de estos hongos es *Trichoderma*, el cual ha demostrado ser uno de los productos más eficientes tanto para el control de plagas en el suelo y en cultivos, como para la estimulación de la planta (7, 10, 11). Por el mecanismo responsable de la actividad antagonista en la parte subterránea de la planta, *T. harzianum* induce a una reacción de resistencia sistémica frente a patógenos, lo que se traduce en una reducción de la necrosis causada por algunos microorganismos como: *P. capsici* y *A. alternata* (6).

Por lo tanto, para estudiar la capacidad antagonista de algunos microorganismos, se seleccionaron tres fitopatógenos comunes en cultivos de tomate, pimentón y cebolla, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium monilliforme*, los cuales se enfrentaron a *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* en diversos ensayos, además, se realizó tratamiento de semillas para observar si este proceso es beneficioso para el crecimiento de las plántulas. Así, el uso de productos biológicos para el control de plagas a nivel agrícola puede aportar información valiosa, logrando disminuir no sólo pérdidas económicas elevadas, sino también, el exagerado uso de pesticidas, que pueden provocar impacto adverso a la salud y ambiente (8).

MATERIALES Y METODOS

La muestra estuvo representada por cepas de tres fitopatógenos comunes en cultivos de tomate, pimentón y cebolla, *Phytophthora* spp., *Fusarium monilliforme* y *Rhizoctonia solani* que fueron donados por la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Clínica de Plantas. Estas cepas fueron consignadas en tubos con agar Sabouraud inclinado con 72 horas de sembradas. Para verificar que efectivamente son las cepas a estudiar se realizó la identificación en cuanto a género y especie de cada uno de estos microorganismos.

Cultivo de Patógenos. Los fitopatógenos se sembraron en Erlenmeyer con 150mL de caldo Sabouraud (HIMEDIA Sabouraud borth and agar) estéril y se incubaron a temperatura ambiente por cinco días. Una vez observada la viabilidad de los patógenos, estos se sembraron sobre placas de agar Sabouraud (BBL Agar Dextrosa Sabouraud 500g) utilizando una espátula de Drigalsky por extendido con un volumen de 0.1mL. Nuevamente se incubaron a temperatura ambiente por cinco días (1). La conservación de estas cepas se realizó utilizando agar y caldo Sabouraud y preparándolas para cada ensayo con un máximo de 72 horas de incubación, es decir, cepas jóvenes. Luego se realizó el recuento de las Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

Cultivo de Antagonistas. El grupo microbiológico antagonista comprende los géneros *Trichoderma viride*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Se prepararon 3 Erlenmeyer con 150mL de caldo nutritivo (HIMEDIA Nutrient agar) estéril, donde se sembró por separado cada antagonista. Se incubó a temperatura ambiente por cinco días (3). Para la preparación del grupo antagonista en solución se sembraron 50mL de cada caldo

previamente inoculado con cada antagonista con un tiempo de crecimiento de 72 horas y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días. Luego se realizó el recuento de las UFC/mL.

Bioensayos in Vitro. En medio sólido: Para estudiar el efecto de los antagonistas sobre el crecimiento de los fitopatógenos en medio sólido se utilizó el método Kirby-Bauer o difusión en agar, donde se sembró por extensión con espátula de Drigalsky en tres placas de agar Sabouraud, 0,1 mL de cada fitopatógenos con una concentración de 10^2 UFC/mL. Inmediatamente, se tomaron discos de papel de filtro de 5mm de diámetro con una pinza estéril y se sumergieron en la suspensión del antagonista a una concentración de 10^2 UFC/mL, para luego sembrarse sobre las placas. Se incubaron durante cinco días a temperatura ambiente.

En medio líquido: Para estudiar el efecto del antagonista en solución sobre el desarrollo de los fitopatógenos, se utilizó el método suspensión en caldo, donde se prepararon tres Erlenmeyer de caldo Sabouraud, en los que se sembró el fitopatógeno puro. Simultáneamente se prepararon nueve Erlenmeyer de caldo Sabouraud donde se sembró cada antagonista con cada fitopatógeno a una dilución de 1:100. Luego se sumergieron discos de papel de filtro de 5mm de diámetro con la suspensión de cada ensayo y se colocaron sobre placas de agar Sabouraud. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días.

Bioensayos In Vitro, en semilleros. Se utilizaron 35 semillas de tomate, 35 de cebolla y 35 de pimentón por cada ensayo, es decir se utilizaron un total de 105 semillas por cada rubro. Se seleccionaron 2 semilleros de 100 posillos, uno para semillas tratadas y sin tratar y otro para infectadas y tratadas, se utilizó tierra abonada adquirida de forma comercial y una vez sembrados con las semillas a ensayar se colocaron en un cuarto a cielo abierto a fin de acondicionarlos a las condiciones reales de siembras sin invernadero, y se fueron regando dos veces por día (mañana y tarde) con agua corriente. Estas condiciones se aplicaron a los ensayos posteriores. Cabe destacar, que las semillas fueron manipuladas utilizando pinzas estériles.

Tratamiento de las semillas con el controlador biológico y sin controlador biológico: Para el tratamiento de semillas de tomate, pimentón y cebolla, se seleccionaron 35 semillas de cada rubro, las cuales se colocaron en placas de Petri estériles, donde se agregó una suspensión del controlador biológico, sumergiéndose por 24 horas a temperatura ambiente. Luego las semillas tratadas se colocaron sobre un papel de filtro estéril dejando escurrir un poco el cultivo excedente y luego fueron sembradas en semilleros. Además, se realizó la siembra de 35 semillas de tomate, pimentón y cebolla que no fueron tratadas con el producto biológico, sino sumergidas en agua destilada estéril. Este ensayo sirvió para comparar el crecimiento de estas plántulas en relación a las infectadas con los fitopatógenos.

Semillas infectadas y tratadas: Se colocaron, en placas de Petri estériles, 35 semillas de tomate, pimentón y cebolla

a las que se les agregó la suspensión de cada fitopatógeno, sumergiéndose durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron sembradas en semilleros. A una parte de las semillas (12/35) sumergidas en la suspensión de los fitopatógenos, luego de ser sembradas, se les agregó diariamente una dosis de 0.1mL por semilla del antagonista con una concentración de 10^4 UFC/mL.

Durante dos semanas se fueron realizando las observaciones: Se llevo a cabo el recuento del número de semillas germinadas, medida de la longitud de las plántulas. Se comparó el crecimiento entre las plantas tratadas y las infectadas no tratadas, tomando en cuenta su longitud, número de plantas y follaje. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Análisis de datos. Los resultados se analizaron con el programa Statistix 8.0, empleando pruebas de medias Tukey y análisis de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 90%.

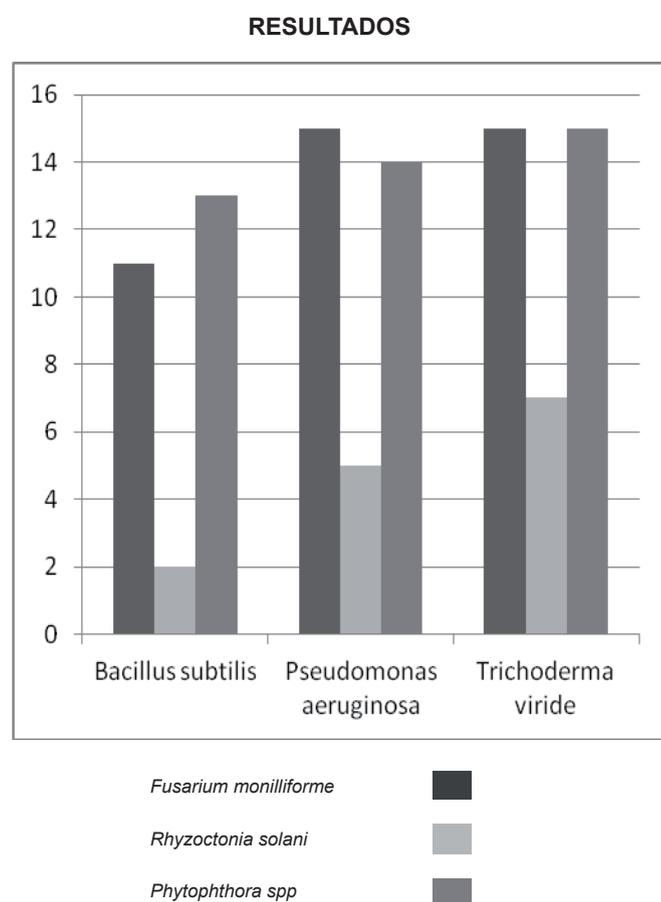


Figura 1. Efecto antagónico *in vitro* a través de la medida del halo de inhibición de tres controladores biológicos sobre fitopatógenos en medio sólido.

Las barras representan el halo de inhibición en milímetros cuando los fitopatógenos son sembrados *in vitro* mediante enfrentamiento en medio sólido con cada antagonista esta medida así, representa la susceptibilidad de cada fitopatógeno frente a cada controlador biológico, para mostrar el efecto antagónico que estos poseen. En la figura 1 se observa que los fitopatógenos mostraron sensibilidad

ante cada antagonista sobre medios de cultivo sólidos, obteniéndose halos de inhibición entre 2 y 15 mm. Se muestra que *R. solani* es el fitopatógeno que muestra menor sensibilidad en los tres casos. *T. viride* fue el antagonista más eficiente por inhibir en mayor grado a los fitopatógenos ($p=0,0000$).

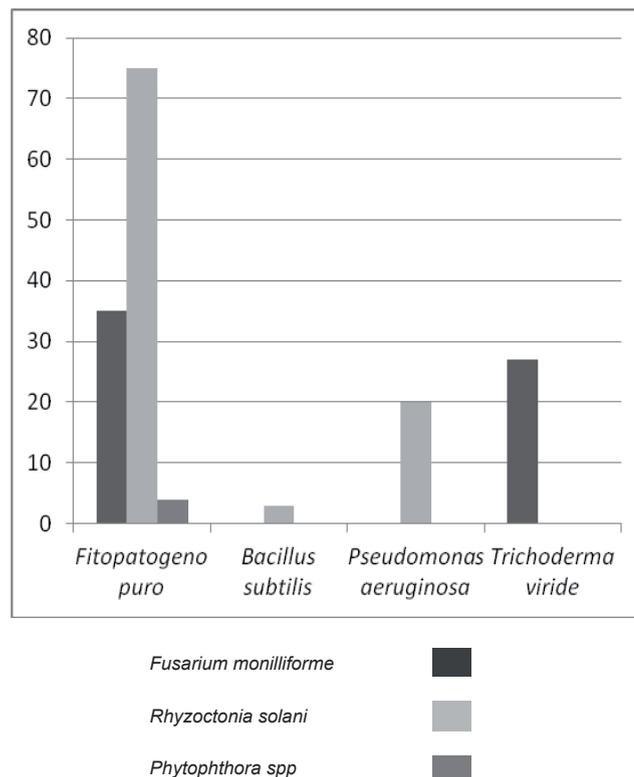


Figura 2. Efecto antagónico *in vitro* a través de la medida del halo de crecimiento de tres controladores biológicos sobre fitopatógenos en medio líquido.

Las primeras tres barras representan el crecimiento del fitopatógeno cultivado puro a partir del medio líquido. Las barras siguientes representan el crecimiento del fitopatógeno una vez que este es sembrado con el antagonista en medio líquido. Se puede apreciar que el crecimiento del fitopatógeno es mayor cuando este es sembrado puro. Además, cuando se siembra en presencia del antagonista este inhibe el crecimiento del fitopatógeno. Cuando los fitopatógenos son enfrentados a *B. subtilis* y *P. aeruginosa* en medio líquido se aprecia como el crecimiento de *F. monilliforme* y *Phytophthora spp* es inhibido totalmente. Sin embargo, y coincidiendo con la figura 1, *R. solani* mostró ligera resistencia, obteniéndose 3 mm y 20 mm relativamente de crecimiento sobre el agar. En el caso de *T. viride* se aprecia que inhibe a *R. solani* y *Phytophthora spp*, con ligero crecimiento de *F. monilliforme* (27mm). El análisis estadístico arroja que existen diferencias significativas entre los fitopatógenos cuando se siembran puros en relación a los sembrados con el antagonista ($p<0,10$).

En la figura 3 se observa como existe una mayor germinación de semillas tratadas de tomate, pimentón y cebolla, en comparación a las semillas no tratadas ($p=0,8165$).

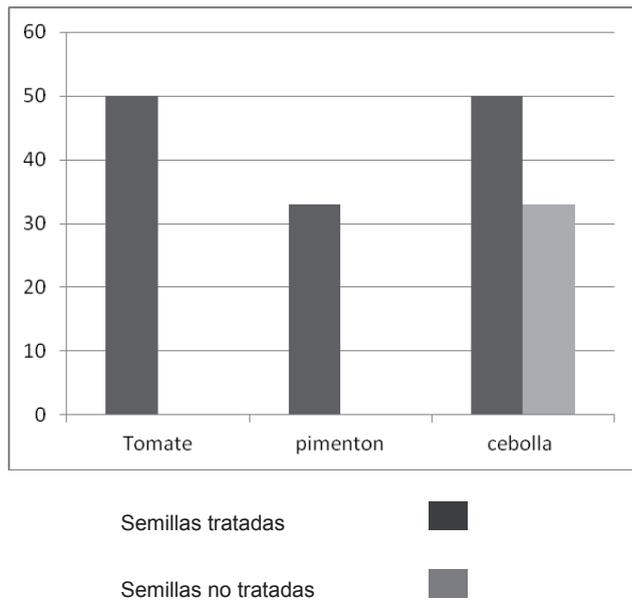


Figura 3. Porcentaje de germinación de las semillas tratadas y no tratadas con el grupo antagonista.

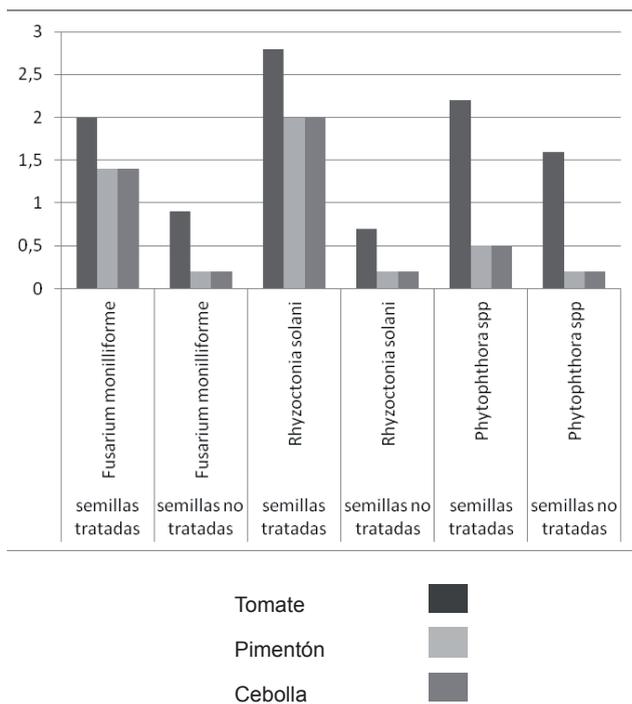


Figura 4. Longitud de las plántulas de semillas infectadas tratadas y semillas infectadas sin tratamiento.

En la figura 4 se aprecia que las plántulas de semillas tratadas posterior a la infección, presentaron una longitud mayor que aquellas que fueron infectadas y no tratadas. En cuanto al análisis estadístico se evidenció que existen diferencias significativas entre la longitud de las plantas tratadas en relación a las no tratadas en cuanto a cada rubro. Tomate ($p=0,0004$), pimentón ($p=0,0024$) y cebolla ($p=0,0006$). Además se observó que el comportamiento de cada antagonista es específico en cada caso, es decir, que no se evidenció diferencia significativa en cuanto a poder antagonista de cada uno.

DISCUSION

En los ensayos *in vitro*, al enfrentar los microorganismos antagonísticos *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* sobre fitopatógenos comunes en cultivos de tomate, pimentón y cebolla, se demostró que el crecimiento de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* puede ser inhibido. Resultados similares fueron obtenidos por Lacey y colaboradores (10), a través de pruebas *in vitro*, donde demostraron el control de fitopatógenos derivados del suelo al utilizar como antagonista a *Trichoderma* spp. Además, otros investigadores estudiaron los metabolitos no volátiles producidos por este microorganismo capaces de inhibir fitopatógenos como es el caso de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* (11, 12). En el estudio *Trichoderma viride* mostró la mayor eficiencia en cuanto a que el efecto inhibitorio fue significativamente mayor al de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Algunos autores señalan que *Trichoderma* ha sido merecedora de una mayor atención en temas de control biológico, ya que su actividad resulta de una combinación de microparasitismo y una producción de metabolitos capaces de controlar un gran número de plagas (11).

Otros microorganismos mostraron su efecto antagonístico como fue el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual mostró tener efecto antagonístico sobre los fitopatógenos en estudio al obtenerse halos de inhibición mayores a 5mm de diámetro. Frías (13) en el 2006, mostró que esta bacteria inhibe el crecimiento de algunos microorganismos patógenos como *Alternaria alternata*, a través de la producción de metabolitos antimicrobianos (13).

Al estudiar el efecto antagonístico que *Bacillus* podría tener sobre los fitopatógenos, se observaron halos de inhibición en los ensayos *in vitro* que confirman nuestra hipótesis. Lagunas y colaboradores (14) al estudiar *in vitro* la capacidad antagonística de *Bacillus* frente a *Phytophthora capsici* lograron la inhibición del crecimiento micelial de este fitopatógeno común en tomate.

Para poder proteger a la plántula de futuras enfermedades biológicas se trató de demostrar que el tratamiento de semillas es efectivo y puede mejorar las condiciones y desarrollo de las plantas. Así, en los ensayos *in vivo* se demostró que aquellas semillas que fueron tratadas mostraron un porcentaje mayor de germinación en relación a las no tratadas. Estos resultados coinciden con los presentados por Hernández (15), donde prueba que el tratamiento de semillas disminuye la mortalidad y estimula la germinación de la planta. En cuanto al ensayo de semillas infectadas y posteriormente tratadas se demostró una marcada germinación y follaje en relación a las infectadas y no tratadas. Otros investigadores mostraron como las plantas de tomate, al ser tratadas con *Pseudomonas fluorescens* o *Bacillus*, presentaron mayor altura y follaje en un 84% (9, 10). Estudios realizados por Santander y colaboradores (8) en el 2003 con *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium* obtuvieron la reducción de la incidencia y severidad de la marchitez. Sin embargo, en otros estudios realizados por Lagunas y colaboradores (14) al utilizar *Bacillus* como agente antagonístico en un suelo infestado, no se mostró la inhibición de *Phytophthora capsici*, es decir, no redujo la incidencia y marchitez en el jitomate.

CONCLUSIONES

El *T. viride*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* tuvieron un efecto antagonista frente a cada fitopatógeno ($p < 0,1$), observándose que el tratamiento de semillas favorece la germinación y crecimiento de las plántulas ($p < 0,1$). El antagonista con mayor eficiencia fue *Trichoderma viride* y el microorganismo que mostró menor sensibilidad a la acción de los antagonistas fue *R. solani*.

Se concluye que el uso de productos biológicos puede recuperar la plántula una vez que esta haya sido infectada, lo cual posiblemente se puede limitar el uso de pesticidas, a través del uso de microorganismos que no generan daños adversos a la salud y medio ambiente.

REFERENCIAS

1. Aciego J. Efecto rizosfera del cultivo de maíz sobre algunas poblaciones microbianas y características químicas de un suelo tropical. Rev Venesuelos 2006; 6: 39-45.
2. Tanada Y, Kaya HK. Insect pathology. Academic Press, New York. Rev Entomol 2001; 14: 197-270.
3. Ahmed S, Pérez C, Egea C, Candela ME. Evaluation of the capacity of *Trichoderma harzianum* in controlling rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathol 1999; 48: 58-65.
4. Ezziyyani M, Sánchez C, Requena ME, Ahmed S, Candela M. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología 2004; 26: 61-68.
5. Sid Ahmed A. Evaluación del potencial de *Bacillus spp.* y *Trichoderma harzianum* en el biocontrol de enfermedades del pimiento (*Capsicum annuum*) [Tesis]. Universidad de Murcia, 1999.
6. Podile AR, Laxmi VDV. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanine ammonia lipase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. J Phytopathol 1998; 146: 255-259.
7. González M, Guenca G. Respuesta de plantas de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón) a la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares nativos e introducidos, bajo condiciones de campo. Rev Fac Agron (LUZ) 2008; 25: 470-495.
8. Santander C, Montealegre JR, Herrera R. Control Biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y Bromuro de metilo. Cien Inv Agr. 2003; 30: 107-112.
9. Ezziyyani M, Pérez C, Requena ME, Ahmed S, Candela ME. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 2004; 26: 35-45.
10. Lacey LA, Horton DR, Unruh K, Márquez, M. Control biológico de plagas de papas en Norte América. USDA ARS, Yakima Agricultural. Reserch Laboratory, Wapato. 2008. Disponible: www.aenews.wsu.edu/may01AEnews/Spanishpotato.html.
11. Stefanova M, Lleiva A, Larrinaga L y Coronado MF. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev Fac Agron (LUZ) 1999; 16: 509-516.
12. Carrillo-Castañeda G, Juárez-Muñoz J, Ruiz-Landa D, Müller-García R. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. Biotecnología aplicada 2000; 17: 171-176.
13. Frías A. Detección y aislamiento de metabolitos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS para el control de hongos fitopatógenos. Fitosanidad 2006; 10: 143.
14. Lagunas J, Mejía E, Kawasoe S, Ocampo A, Romero I, Huerta H. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* en tomate. Rev Mex Fitopatol. 2001; 19: 57-65.
15. Hernández AM. Uso de *Rhizotrich* en la protección de semillas de frijol. Fitosanidad 2006; 10:162-163.