

ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE CEPAS DE *BACILLUS* spp CONTRA *CLADOSPORIUM OXYSPORUM* Y *FUSARIUM OXYSPORUM* f.sp *LYCOPERSICI*.

Janet Rodríguez Sánchez, Kattia Cañizares Hernández, Ulises Soca Estrada, Aliana Sosa León y Yoania Ríos Rocafull.

RESUMEN

A partir de 60 cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp, aisladas de suelos ácidos del país, se realizó un estudio comparativo de la actividad antagonista contra *Cladosporium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Para evaluar la misma de forma cualitativa, se empleó el Método de "Enfrentamiento de Cultivos Duales". Su resultado identificó que 34 de las 60 cepas poseen actividad contra *C. oxysporum* y 25 frente a *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*. Posteriormente, se cuantificó la actividad de seis cepas seleccionadas como promisorias mediante el "Método de Difusión Metabólica", el cual arrojó porcentos de control entre 60-90% para los productos viables y entre 20-70% para los metabolitos termoestables y suspensiones acuosas de las cepas. Las fracciones lograron disminuir la velocidad de crecimiento del patógeno con relación al control. Para comprobar la efectividad de la aplicación preventiva o curativa de los bioproductos "in vivo" se usó un método de infección artificial sobre semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad INIFAT-28. Se destacó la cepa B 13.2, procedente de la Isla de la Juventud, por controlar el 100% de la infección en ambas formas contra *Cladosporium oxysporum*, mientras que B 61, proveniente del Macizo de Guamuhaya, redujo el efecto de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* sobresaliendo como preventivo. Este último aspecto permitió proponer a estas cepas para continuar investigaciones encaminadas a la obtención de nuevos bioproductos, destinados a las regiones donde abundan estos tipos de suelos.

Palabras clave: *Bacillus*, hongos fitopatógenos, actividad antagonista.

Antagonistic activity of *Bacillus* strains against *Cladosporium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*.

ABSTRACT

Starting from sixty strains of the *Bacillus* spp genus pertaining isolated in acids soils in the country, to realize comparative studies of the antagonistic activity against *Cladosporium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. To evaluate the same in qualitative form, to employ the

MSc. Janet Rodriguez Sanchez, Investigador Agregado del Grupo de Agrobiotecnología del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), MINAG, Cuba. bioferbiocontrol@inifat.co.cu

“Cooling of Dual Cultures Method”. How results were identified its 34 of the 60 total strains to possess activity against *Cladosporium oxysporum* and 25 in front a *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Later on its quantitative the activity of six strains selected as promising thought “Diffusion Metabolic” Method, which emit control percent between 60-90% for the viable products and 20-70% for the thermo-stables metabolites and strain water suspension. The fractions achieve to diminution the growth velocity this pathogen with relation at the control. To verify effectively of the preventive or curative application of the bioproductos “*in vivo*” were used one method of artificial infection above tomato seeds, variety INIFAT-28. Over the same highlight B 13.2 strain, precedent of Young Island, for the control a 100% of infections in both application forms against *Cladosporium oxysporum*, while B 61, proceeding of Guamuhaya mass, to reduce the effect of *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* to be outstanding with preventive. These last aspect permits propose these strains to continue research to guide to obtaining of new bioproductos, destined of the regions where abundant these type of soils.

Key words: *Bacillus*, *phytopathogens fungus*, *antagonistic activity*.

INTRODUCCION

El aislamiento y caracterización del potencial metabólico de nuevos aislamientos de microorganismos efectivos como biofertilizantes es una tarea constante. La búsqueda de cepas eficientes para el control de organismos fitopatógenos resulta de vital importancia en la actualidad. A partir de una colección de 60 cepas pertenecientes al género *Bacillus*, recientemente aisladas desde ecosistemas cubanos donde predominan suelos alíticos, enclavados en zonas de Pinar del Río, la Isla de la Juventud y el macizo de Guamuhaya, cuya actividad antagonista se desconoce; se llevó a cabo la presente investigación.

El género *Bacillus*, ha sido reconocido por su gran versatilidad metabólica. La presencia de endosporas le permite mayor adaptación a las condiciones adversas del medio ambiente, tales como temperatura, pH, calor, humedad,

deseccación, radiaciones y sustancias químicas, condiciones a las que están expuestos con frecuencia los microorganismos (Sosa *et al.*, 2011). Además presenta una amplia potencialidad para producir sustancias con marcada actividad antagonista contra organismos fitopatógenos, entre las que se incluyen antibióticos, sideróforos, enzimas degradativas y sustancias hormonales semejantes a las fitohormonas (Li *et al.*, 2009). Además, contribuye a la absorción de agua y nutrientes en la raíz, así como a la inducción de resistencia mediante la activación de genes de defensa en las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Los hongos escogidos para realizar esta investigación están considerados patógenos sobre distintas especies de hortalizas y frutales. *Fusarium oxysporum* Schlecht ex Fr. (Sacc.) Snyder and Hans y sus formas

especiales, producen cuantiosas pérdidas en todos los sistemas agrícolas, debido a que provocan *Damping-off* y marchitez vascular en varios cultivos de importancia económica (Pérez *et al.*, 2009). *Cladosporium oxysporum* CKr. hasta hace unos años no era considerado patógeno, pero su vigorosa explosión en los sistemas de cultivo protegido ha hecho que se centre la atención en su control y se denomine enfermedad emergente bajo estas condiciones (Palmero *et al.*, 2008).

El presente estudio tuvo como objetivos determinar la actividad antagonista de cepas del género *Bacillus* spp contra los hongos fitopatógenos *Cladosporium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* mediante el empleo de métodos “*in vitro*” e “*in vivo*” y seleccionar las de mayor potencialidad para la elaboración de bioproductos destinados a su aplicación en ecosistemas con suelos ácidos.

MATERIALES Y METODOS

Las 60 cepas utilizadas para el estudio fueron aisladas en regiones donde predominan suelos ácidos ubicados en la Isla de la Juventud, Pinar del Río y el Macizo montañoso de Guamuhaya entre los años 2009 y 2012. Del total de las 60, 35 proceden de la Isla de la Juventud, 11 de Pinar del Río y 14 de diferentes pisos altitudinales del Macizo de Guamuhaya. Todas se encuentran conservadas dentro de la Colección de Bacterias Beneficiosas del INIFAT.

Para la determinación de la capacidad antagonista se utilizó el Método de

“Enfrentamiento de Cultivos Duales” (Landa *et al.*, 1997; Casadesús *et al.*, 2010), sobre Placas Petri de 90 mm de diámetro con medio sólido de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (BIOCEN, 2011). Una vez solidificado el medio de cultivo se sembró una estría de la bacteria de interés a 2 cm del borde de la misma y en el otro extremo se depositó un pre-cultivo de los hongos fitopatógenos evaluados de 7 mm, colocado a igual distancia del borde de la placa. Luego de efectuar ambas siembras las placas fueron incubadas a 28°C durante 10 días. Las evaluaciones se realizaron a partir de las 48 horas de incubación cada 24 horas de forma cualitativa, lo que permitió definir cuales cepas muestran potencialidad como antagonistas a través de las afectaciones provocadas a las colonias fúngicas.

Para la cuantificación de la actividad de las cepas y sus fracciones metabólicas se utilizó el Método de “Difusión Metabólica” (Valero, 2008). El procedimiento consiste en aplicar la muestra que se desea evaluar en un pozo abierto con un horador de 7 mm de diámetro en cada uno de los cuatro extremos, a una distancia de 1,5 cm del borde de las placas. En cada uno se depositó una cantidad conocida de la muestra.

Para ello se emplearon tres fracciones metabólicas que fueron:

1. Suspensiones acuosas de las Cepas puras conservadas sobre plano inclinado en medio Agar Nutriente (BIOCEN, 2011) en agua destilada estéril, con una concentración de 10^8 UFC/mL⁻¹

determinada por comparación con el tubo cinco de la escala de Mc Farland, lo que permitió evaluar el efecto de los metabolitos totales.

2. Productos Integrales Viables. Los bioproductos derivados de las seis cepas seleccionadas previamente se obtuvieron mediante un proceso de fermentación sumergida a escala de zaranda rotatoria a 200 r.p.m durante 48 horas. Para ello se usó el medio B (Rodríguez, 2010) a una temperatura de 30°C.
3. Metabolitos termoestables. Se obtuvieron mediante un proceso de esterilización en autoclave a 121°C durante 20 minutos a partir de los productos finales del proceso fermentativo.

En cada uno de los pozos se aplicó 100 µL para los Productos Integrales Viables, suspensiones de Cepas puras y el agua destilada estéril usada para los Controles y 250 µL para el caso de los Metabolitos Termoestables.

La evaluación se realizó mediante la medición del diámetro del crecimiento micelial a los tres, cinco y siete días posteriores a la siembra. Los diseños experimentales contaron con un total de 19 tratamientos y tres réplicas (placas) de cada uno, lo que hizo posible obtener un total de 12 observaciones. Fueron repetidos en dos ocasiones para cada patógeno y el valor graficado se tomó como promedio de todos los cálculos efectuados.

Se calculó el porcentaje de control a partir de la fórmula de inhibición micelial propuesta por

Singh (2003) y la velocidad de crecimiento del patógeno según Ros *et al.* (2008).

Para los ensayos "*in vivo*" se utilizó un Método de Infección Artificial de Semillas. La especie elegida fue tomate, variedad INIFAT-28. Para ello se emplearon placas Petri de 150 mm de diámetro con un disco de papel de filtro en el interior. Todo el material de trabajo fue esterilizado previamente en autoclave a 121°C durante una hora. En el interior de cada placa se colocaron 50 semillas, se sembraron cuatro réplicas (placas) por tratamiento, para completar 200 semillas en cada uno.

Los tratamientos en ambos casos, se hicieron mediante inmersión durante 15 minutos. Las semillas aplicadas de forma preventiva fueron sumergidas primeramente en el bioproducto, se orearon durante 30 minutos y luego se introdujeron en una suspensión de conidios del hongo con una concentración equivalente a 1×10^7 conidios/mL, la cual fue valorada por conteo directo en Cámara de Thomas. Este procedimiento se repitió de modo inverso para aplicar los tratamientos curativos. La evaluación se realizó 15 días después de la siembra a través del conteo del número de semillas infectadas con el micelio y los conidios típicos del hongo bajo un microscopio estereoscópico de alta resolución.

Los datos derivados de los experimentos "*in vitro*" e "*in vivo*" fueron procesados estadísticamente a través de un análisis de Varianza siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado. Para la comprobación de las diferencias se empleó una prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 95% de confianza,

todos incluidos en el paquete estadístico STATGRAPH versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Método “Enfrentamiento de Cultivos Duales” contra *Cladosporium oxysporum* arrojó que entre las 60 cepas, 34 presentaron actividad antagonista lo que representa un 57 % del total. Contra *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* el número de cepas fue menor, 25 para un 42 %. Entre los microorganismos que denotaron actividad antagonista positiva, fueron seleccionadas las seis cepas de mayor potencialidad para continuar los estudios de cuantificación con el empleo de métodos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

Frente a *Cladosporium oxysporum* fueron seleccionadas B1.12, B1.6 y B1.2 las cuales proceden de la Isla de la Juventud, B13.2 de Pinar del Río, así como B31 y B51 de Guamuhaya. Estas inducen una disminución del número de colonias en la superficie del medio de cultivo en dirección al crecimiento de la cepa bacteriana, la lisis de las estructuras de los bordes de la colonia, una baja formación de conidios hacia los extremos y un cambio de coloración de verde olivo a blanco, lo que puede estar relacionado con la producción de metabolitos antifúngicos.

Algunos autores plantean que mediante el Método de “Enfrentamiento de Cultivos Duales” se puede deducir si las bacterias involucradas producen algún metabolito responsable de la actividad, aunque no llegue a existir contacto entre los microorganismos implicados.

Normalmente el hinchamiento de las colonias fúngicas y los cambios de coloración demuestran la presencia de metabolitos con características de antibióticos o enzimas hidrolíticas y quitinolíticas, que minimizan las posibilidades de crecimiento de los hongos (Prapagdee *et al*, 2008, Akhtar y Siddiqui, 2010).

En este caso particular no se encuentran citas de trabajos realizados con el uso de técnicas “*in vitro*” ya que hasta hace poco tiempo no se consideraba importante la búsqueda de cepas con actividad antagonista frente a él, pues no es un patógeno agresivo en condiciones de campo abierto. Sin embargo, en los últimos años ha aparecido de modo vertiginoso en sistemas de cultivo protegido mermando la calidad y el rendimiento, fundamentalmente en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y las cucurbitáceas (De Cara *et al*, 2008).

Para *Fusarium oxysporum* las cepas seleccionadas fueron B13.2, B1.12, B61, B39, B1.2 y B1.6. La procedencia de estas cepas son tres de la Isla de la Juventud, una de Pinar del Río y dos fueron aisladas en la zona del macizo de Guamuhaya.

La cepa B13.2, posee la mayor capacidad de inhibición ya que provoca deformación de la colonia, disminución del diámetro de la misma en dirección al crecimiento de la bacteria; lisis en las estructuras de la colonia (micelio); disminución en la formación de conidios y un cambio de coloración, en el área del halo de inhibición, de gris a un naranja – marrón, el cual se oscurece hacia el interior de la colonia fúngica con los días. Un comportamiento

similar mostraron las cepas B1.12 y B 61, aunque con un cambio de coloración menos intenso.

Resultados similares fueron encontrados por Silva *et al.* (2010) quienes demostraron la actividad negativa de 65 cepas del género *Bacillus* contra hongos patógenos del cultivo del tabaco y seleccionaron cuatro para continuar estudios vinculados con la determinación de metabolitos promisorios para detener el desarrollo micelial de *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Phytophthora nicotianae*.

Para el caso particular de este patógeno se debe recordar su hábito de crecimiento en este medio de cultivo. Las cepas que mostraron un aumento en su efectividad no dejaron germinar las esporas diseminadas, por lo que no fue posible en ningún momento que incrementaran el diámetro micelial de esas variantes. Las fracciones que no siguieron esa misma conducta permiten la germinación de las esporas, hecho que aumenta drásticamente la medición, debido a la unión de múltiples colonias en un mismo diámetro.

En la Figura 1 se aprecia el comportamiento de *Cladosporium oxysporum* cuando fueron calculados sus por cientos de control, al aplicar las fracciones metabólicas de las cepas empleadas después de siete días de medición por el Método de Difusión Metabólica. En este caso aparecen diferencias entre las suspensiones procedentes de las cepas B 1.2, B 1.6, B 1.12

y B 13.2 con respecto a las derivadas de B 31 y B 51, estas últimas obtuvieron bajos niveles durante el ensayo en esta forma, debido probablemente, a un bajo contenido de sustancias solubles en agua.

Los metabolitos termoestables muestran menores por cientos de control que las demás fracciones. Se destacan los alcanzados por los metabolitos derivados de las cepas B 51, B 1.2 y B1.6 que oscilaron entre 50 – 60%, sin diferencias significativas con la cepa B 13.2, la cual logra elevar sus valores para arrojar un 40% de control aproximadamente. Esta respuesta se debe a la presencia de un conjunto metabólico con marcada actividad antifúngica, que hace suponer que existan altos niveles de compuestos resistentes a las altas temperaturas, lo que las convierte en promisorias para estudios futuros.

Las fracciones provenientes de las cepas B 1.12, y B 31 comenzaron con por cientos muy pobres, por debajo del 10%, sin embargo ellas logran elevar sus valores, para quedar finalmente con valores inferiores al 30 %, lo que denota un bajo contenido de metabolitos termoestables.

Los productos viables alcanzan una efectividad alta, comparable con la suspensión acuosa de las cepas. Sobresalen los por cientos de los biopreparados de las cepas B 1.2, B 1.6, B 1.12 y B 31 cuyos valores oscilan entre 65-80 % de control y muestran diferencias significativas con los productos derivados de B 13.2 y B 51 con niveles inferiores al 40 %.

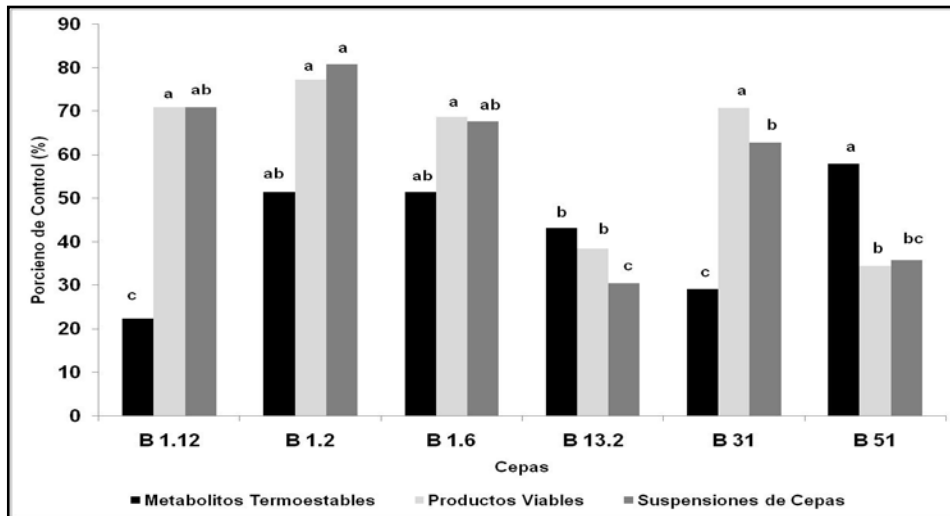


Figura 1. Comportamiento de *Cladosporium oxysporum* frente a distintas fracciones metabólicas de las cepas seleccionadas.

Con respecto a las velocidades de crecimiento la Figura 2 muestra diferencias en cuanto a la conducta de las cepas. Se destacó B 1.2 la cual no permitió el crecimiento del hongo, ya que entre el tercer y quinto día su velocidad fue cero, lo que se corresponde con el período de esporulación del patógeno, de lo que se deduce que impidió su desarrollo en esta fase. Entre el quinto y séptimo día el hongo logró crecer a un ritmo muy lento.

El resto de las cepas mantuvieron una velocidad que puede considerarse baja al compararla con la del testigo, excepto la B 31 que comenzó por encima del mismo y aunque logra disminuirla con el tiempo, continúa siendo superior a la de las demás. Este comportamiento indica un impedimento en el crecimiento, debido más al agotamiento de las escasas fuentes nutritivas presentes en el medio de cultivo que al efecto de esta.

En el caso de los metabolitos termoestables (Figura 3) se aprecia igual tendencia. En los últimos días de medición la mayor velocidad de crecimiento la alcanza el tratamiento control. Los metabolitos derivados de todas las cepas poseen velocidades más altas en esta fracción que en la suspensión acuosa de la cepa.

Sobresale B 1.2 por permitir al hongo crecer a un menor ritmo que las demás, lo que puede ser indicio de un mayor contenido de compuestos resistentes a las altas temperaturas que provocan un efecto deletéreo en el hongo e impiden la germinación de las nuevas esporas.

La fracción procedente de la cepa B 1.12 comenzó con una velocidad superior a la del testigo, pero luego descendió bruscamente para concluir el ensayo con una mayor velocidad que las demás, lo que supone un

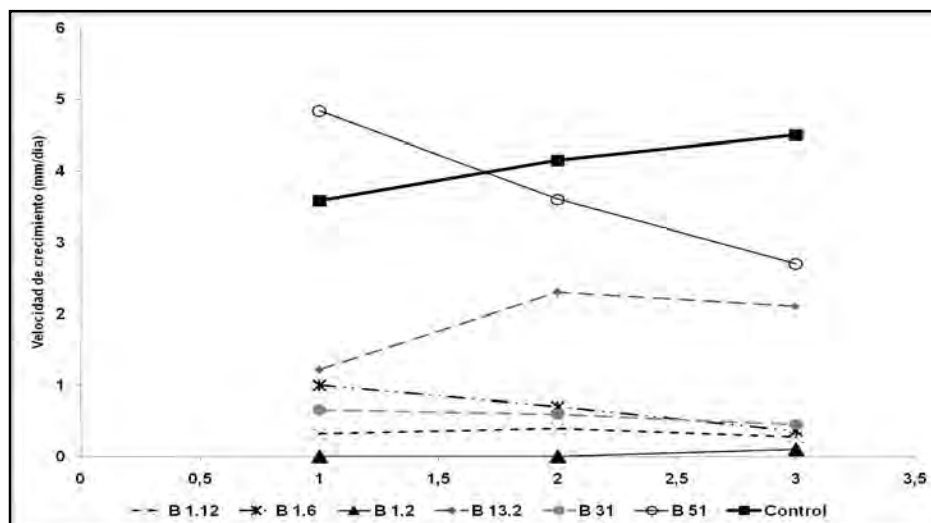


Figura 2. Velocidad de crecimiento de *Cladosporium oxysporum* frente a las suspensiones acuosas de las cepas.

bajo contenido metabólico y la no detención del crecimiento del patógeno en ningún momento.

El uso de esta fracción no disminuye notablemente la velocidad de crecimiento del patógeno con ninguna de ellas, todas se encuentran por encima de 1.5 mm/día, lo que hace pensar en el hecho de que una parte importante de los metabolitos que estas producen, sean compuestos volátiles, que no soportan las altas temperaturas, por lo que el empleo de la misma no se recomienda en estudios "in vivo".

En la Figura 4 se muestra el efecto de los productos viables de estas cepas. En estas muestras está presente todo el pool metabólico que ellas son capaces de excretar al medio de cultivo y también el que está incorporado dentro de la estructura celular. De

esta forma también el tratamiento control alcanzó la mayor velocidad de crecimiento en el último día de evaluación, aunque en principio el producto derivado de la cepa B 51 la superó en más de 2 mm/día.

El producto que logró mayor efectividad fue el de la cepa B 1.2 que no permitió el crecimiento y desarrollo del patógeno en ningún momento, deteniendo a cero su velocidad desde el principio del ensayo. Los derivados de B 1.12, B 1.6 y B 31 alcanzan también velocidades muy bajas, inferiores a 1 mm/día, lo que coincide con las manifestaciones de daños causadas a la parte exterior del micelio fúngico, entre las que sobresale la ruptura de las hifas fúngicas y la represión de la nueva esporulación, lo que se debe a la presencia de sustancias con efecto fungicida o fungistático.

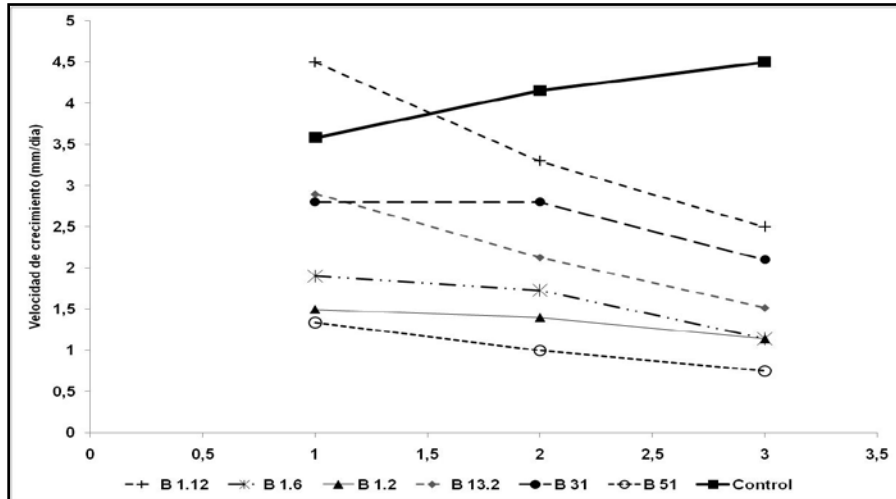


Figura 3. Velocidad de crecimiento de *Cladosporium oxysporum* frente a los Metabolitos Termoestables.

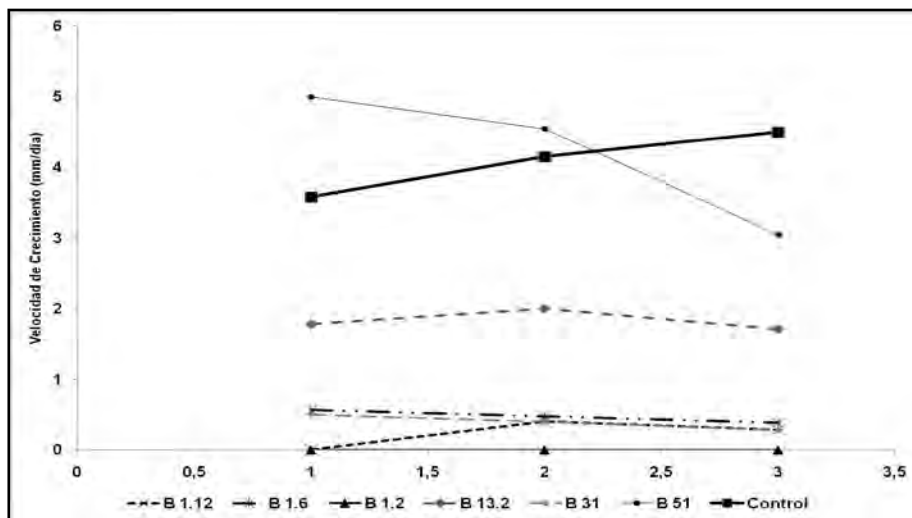


Figura 4. Velocidad de crecimiento de los Productos Viables contra *Cladosporium oxysporum*.

Contra *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* las suspensiones acuosas de las cepas seleccionadas previamente, mantienen un crecimiento gradual del por ciento de control para la mayoría de las cepas (Figura 5). Sobresalen las suspensiones de las cepas

B 1.12, B 1.6 y B 61 que no arrojan diferencias entre sí en ningún momento. Estas alcanzan valores muy altos de actividad antifúngica, muy cercana al 90% de control, lo que sugiere la presencia de metabolitos totales con una poderosa acción contra el

mismo. El resto de las fracciones logran porcentos de control inferiores, aunque no deben considerarse bajos pues están alrededor del 70 % para dos de ellas y superior al 60 % para la otra.

En el caso de los Metabolitos Termoestables resultan altamente significativas las diferencias alcanzadas por los metabolitos de B 61 con un valor por encima del 70 % de control. Otra cepa destacada resultó ser la B 1.12 con 63 % de control. La cepa B 1.6 supera el 50 %. Las otras tres no poseen un alto contenido de metabolitos resistentes a temperaturas elevadas bajo estas condiciones. Estos resultados coinciden con las afirmaciones de Kumar *et al*, (2009)

quienes encontraron e identificaron distintos compuestos metabólicos activos al variar la composición de los medios de cultivo y demostraron su efectividad contra hongos del género *Colletotrichum* spp.

El comportamiento de los productos viables no mostró diferencias significativas entre los bioproductos procedentes de las cepas B 61, B 1.12 y B 1.6, con valores cercanos al 90 % de control. Además B 1.2 alcanza un valor por encima del 80 %. Aunque presenta diferencias significativas con los biopreparados mencionados anteriormente, no debe descartarse la posibilidad de su aplicación inmediata debido a la efectividad que ha demostrado.

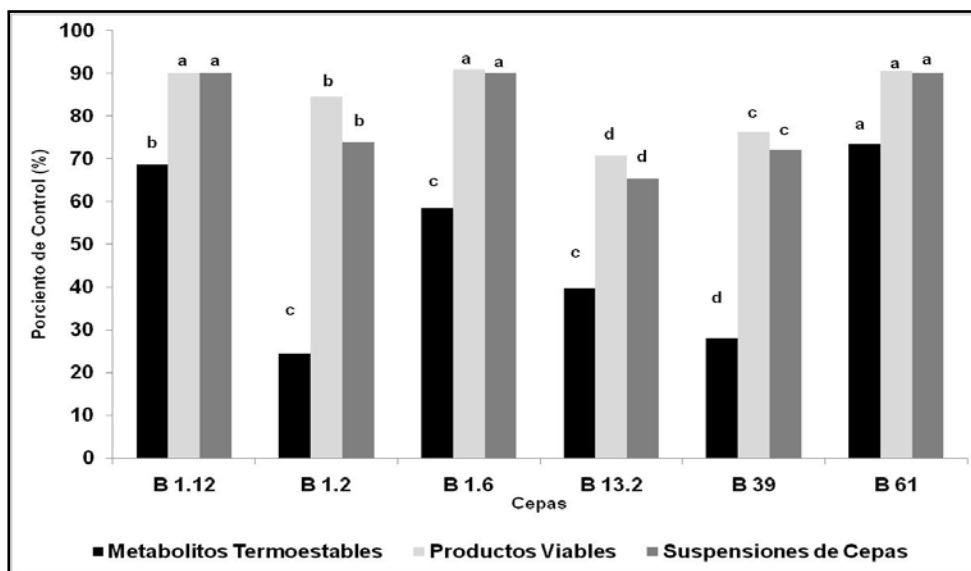


Figura 5. Comportamiento de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* frente a distintas fracciones metabólicas de las cepas seleccionadas.

En la Figura 6 se evidencia que la velocidad de crecimiento de este patógeno es muy superior en el tratamiento control que en las

cepas. Frente a este hongo, que tiene un crecimiento radial uniforme, todas las cepas resultan efectivas, ya que logran minimizar y

en muchos casos hacer nulo o mantener muy cercana a cero, la velocidad durante todo el tiempo, lo cual se corresponde con la disminución del incremento del diámetro de la colonia fúngica.

Las cepas B 1.12, B 1.6 y B 13.2 influyen directamente sobre este parámetro y no dejan que el patógeno empiece a crecer durante todo el tiempo de los ensayos, lo que se atribuye a un elevado contenido de metabolitos totales, con características antifúngicas que inciden en su desarrollo. El

empleo de tratamientos en semillas utilizando las cepas más eficientes puede contribuir a minimizar el efecto negativo que este hongo provoca en numerosos cultivos de importancia agrícola, ya que a él le es posible permanecer en el suelo por grandes períodos de tiempo. La eficiencia de estas cepas también puede deberse al establecimiento de mecanismos de competencia entre los mismos.

En la Figura 7 se aprecia semejanza en cuanto a la conducta del tratamiento control respecto a las demás fracciones.

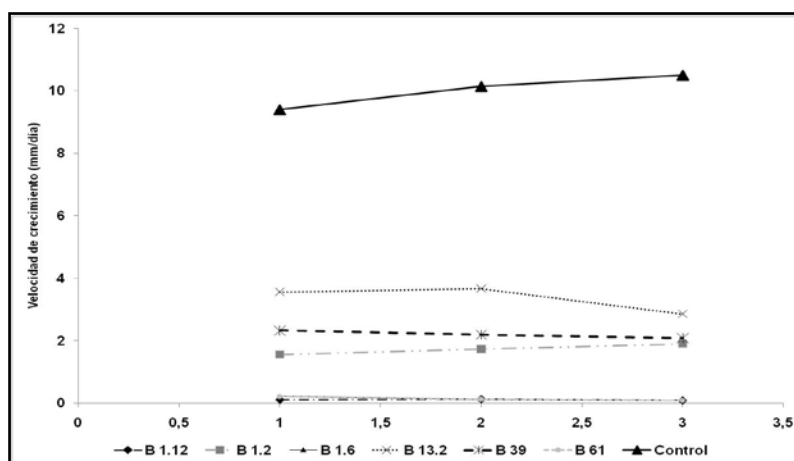


Figura 6. Velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* frente a las Suspensiones acuosas de las Cepas.

En este caso es válido resaltar que la velocidad alcanzada por el patógeno es mayor, lo que hace suponer que el contenido metabólico que soporta las altas temperaturas es bajo y además, puede deberse a la no especificidad de los mismos para detener el desarrollo micelial del patógeno. En este caso se ha descrito la existencia de numerosas razas y formas especiales asociadas a cultivos específicos cuya actividad es solo

minimizada por algunas familias de compuestos químicos (Jurado *et al.*, 2004). También puede encontrarse relacionado con el uso de un solo medio de cultivo, en el cual se desconoce la magnitud de la producción metabólica.

Reyes *et al.* (2011) evaluaron un grupo de cepas pertenecientes al género *Bacillus* spp para encontrar algunas efectivas contra las enfermedades provocadas por *Macrophomina phaseolina*, hongo anamórfico que afecta a

numerosos cultivos de plantas ornamentales y frutales. Para ello fermentaron la cepa, en tres medios de cultivo con diferente composición. Los resultados demostraron que en los dos medios de cultivo que contienen PDA no aparecieron diferencias significativas en el crecimiento de *Macrophomina phaseolina*. Se observó diferencia significativa solo al utilizar

PDA y Agar Nutriente (AN). El crecimiento en medio Triptona Soya Agarizado (TSA) fue significativamente menor comparado con los otros medios. Solo en PDA se logró un desarrollo óptimo del crecimiento y la coloración característica del hongo esporulado, así como la velocidad de crecimiento descrita para este patógeno.

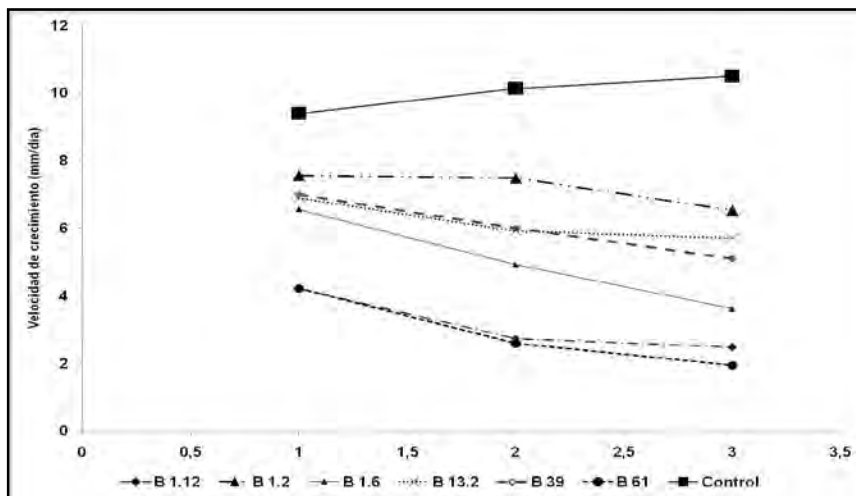


Figura 7. Velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* frente a los metabolitos termoestables.

El comportamiento de los productos viables aparece en la Figura 8. La respuesta de los productos derivados de las cepas B 1.12, B 1.6 y B 61 resulta alentadora, ya que anulan el crecimiento del patógeno desde el inicio y no permiten su aceleración, lo que coincide no solo con la disminución en el diámetro de las colonias sino con el cese de la esporulación del mismo, hecho que impide su desarrollo. Los resultados obtenidos coinciden con los de Ros *et al.* (2008) en que los tratamientos controles se desarrollaron todo el tiempo a

una velocidad por encima de todas las fracciones metabólicas de las cepas evaluadas. Sin embargo, ellos solo prueban este indicador, cuando añadieron al medio la cepa de interés fermentada, por lo tanto, solo podría compararse con la fracción compuesta por el producto viable, el cual, muchas veces durante la presente investigación, no permitió el crecimiento de los patógenos o lo hizo a un ritmo muy lento. En cualquier caso, del trabajo con las demás fracciones no se han encontrado antecedentes.

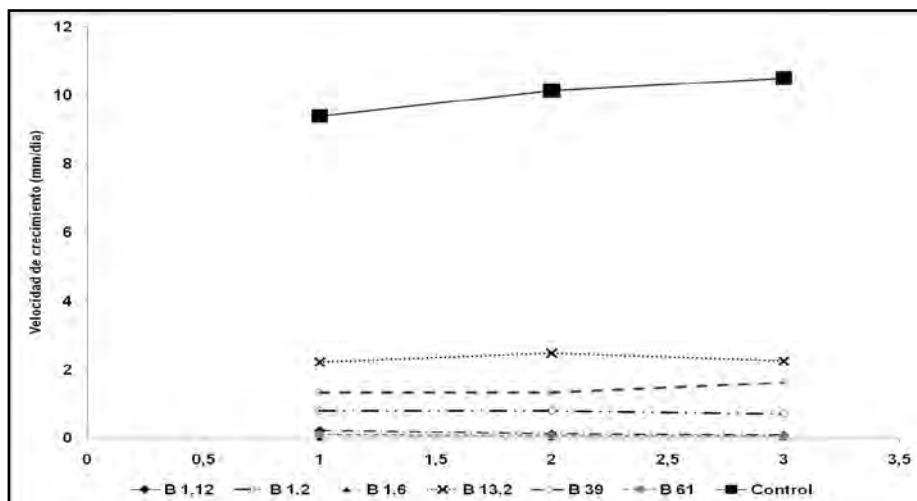


Figura 8. Velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* frente a los productos viables.

Dentro de las especies de *Bacillus* que han mostrado actividad antifúngica “*in vitro*” sobresalen *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamórficos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp y *Macrophomina phaseolina* y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia lunata* y *Pyricularia grisea* (Tendulkar *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011).

Al aplicar los bioproductos derivados de estas cepas sobre semillas de tomate infectadas con una suspensión del hongo *Cladosporium oxysporum* (Figura 9) muchas variantes alcanzan menor cantidad de semillas infectadas que el testigo. En este caso se destacan ambas formas de aplicación de la cepa B 13.2, lo que la convierte en promisoría para ser seleccionada como integrante de un bioproducto para su tratamiento. Obtienen iguales respuestas la forma preventiva de la

cepa B 51 y la curativa de B 31 que muestran una gran especificidad contra este patógeno y que no permitieron la infección de ninguna semilla por lo que arrojaron un 100 % de control.

Para *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* no se logró que ninguna de las cepas redujera la infección hasta cero (Figura 10), o sea, obtuviera 100 % de control. Se destacan las formas preventivas de las cepas B 1.6 y B 61 que alcanzan por cientos de control de alrededor de 95 %.

De Cara *et al.* (2008) identificaron y evaluaron el poder patogénico de cepas aisladas desde tejido de hojas afectadas con *Cladosporium fulvum*, bajo cultivo protegido tomando el inóculo desde hojas de tomate (var. Pitenza) sobre plantas de la misma especie (var. San Pedro) con tres a cuatro hojas verdaderas desarrolladas. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas, entre 25 y 28°C, 60-

90 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 16 horas luz (12000 lux). Como inóculo se tomó una suspensión de los conidios presentes en las hojas disueltos en 100 mL de agua estéril con dos gotas de Tween-80 con

densidad entre $10^2 - 10^3$ UFC/mL. Los resultados comprobaron la patogenicidad del hongo al alcanzar el 100 % de las plantas con manifestación de síntomas y el 75.53 % de las hojas.

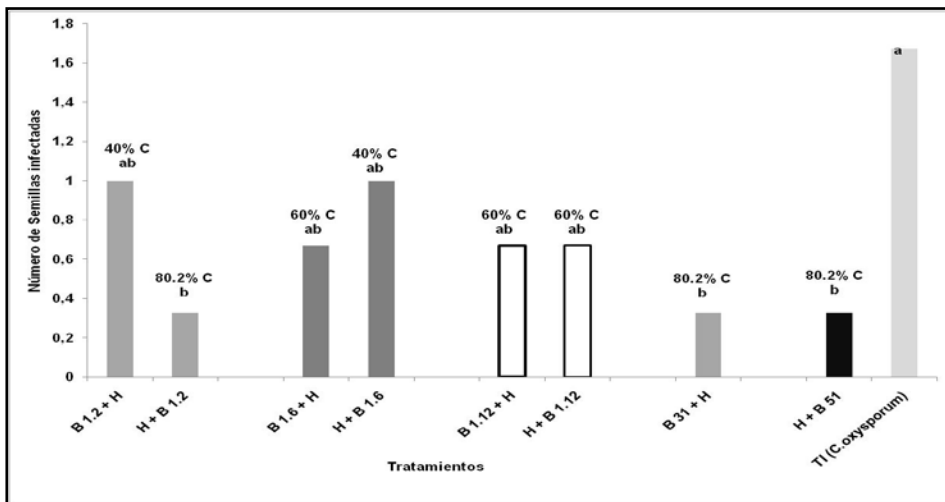


Figura 9. Efecto de distintas formas de aplicación de los bioproductos sobre semillas infectadas con *Cladosporium oxysporum*.

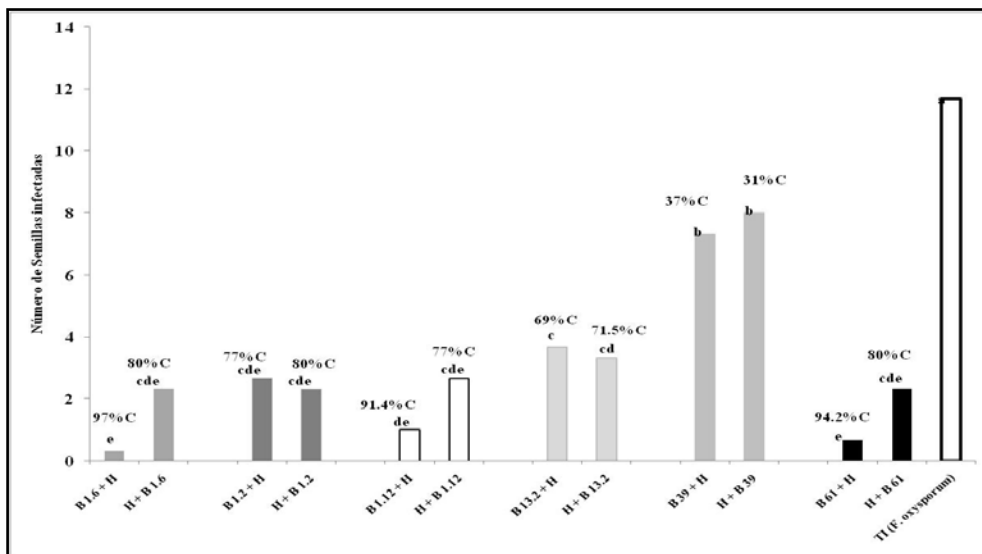


Figura 10. Efecto de distintas formas de aplicación de los bioproductos sobre semillas infectadas con *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

Varias especies del género *Fusarium* producen macroconidios, microconidios, y esclerocios como cuerpos de resistencia, lo que confiere a esta especie el ser una de las más contaminantes y de mayor velocidad de propagación en semillas. La presencia de varias razas intra-específicas dentro del género puede provocar variaciones en el grado de afectación de los cultivos (Pérez *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

- El estudio de las fracciones metabólicas derivadas de las cepas promisorias mostró diferencias en su comportamiento, lo que constituye punto de partida para el estudio de los metabolitos implicados en el control de patógenos fúngicos.
- Se seleccionan las cepas B 13.2 para aplicar contra *Cladosporium oxysporum* y B 61 en el combate contra los hongos del género *Fusarium* spp al demostrar una capacidad superior de la actividad antagonista “*in vitro*” y en el control ejercido sobre el hongo “*in vivo*” sobre semillas de tomate de la variedad INIFAT-28.
- La selección de estas cepas permitirá continuar los estudios de optimización del proceso fermentativo con el fin de obtener bioproductos con mayor efectividad para ser aplicados en los suelos ácidos del país y en cultivos de importancia económica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, M. S y Siddiqui, Z. A. (2010): Role of Promoting Growth Plant Rhizobacteria in Biocontrol of Plant Diseases and Sustainable Agriculture. In: *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Ed. Maheswari, D. K. India. pp 157-182.
- BIOCEN (2011): Manual de Medios de Cultivo. La Habana. Centro Nacional de Biopreparados. BIOCEN.
- Casadesús, L., Sosa, A., González, M y Pazos, V. (2010): Bacterias esporuladas con uso potencial para el biocontrol de *Rhizoctonia solani*. En: Memorias del XVII Congreso Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. CD: AES-0.21. La Habana. Fecha de consulta: 17/8/2012.
- De Cara, G. M.; Heras, Z. F.; Santos, H. M y Tello, M. J. C. (2008): La Cladosporiosis del Tomate causada por *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri, una enfermedad emergente en los Cultivos Protegidos de Almería (España). En: Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 34 (4): 573-579.
- Jurado, M., Vázquez, C., López, E. E., Patiño, B., y González – Jaén, M. T. (2004): Analysis of the occurrence of *Fusarium* species in spanish cereals by PCR assays. Proc 2nd Int. Symposium on *Fusarium* Head Blight. Orlando, USA: 460-464.
- Kumar, A., Saini, A., Shrivastava, J. N. (2009): Production of Peptide Antifungal Antibiotic and Biocontrol Activity of

- Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 57 – 62
- Landa, B., Hervás, A., Bettiol, W and Jiménez – Díaz, R. (1997): Antagonistic activity of bacteria from chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris*. *Phytoparasitica*, 25, 305-318.
- Li, X; Zhang, H; Su, Z and Zhang, CH. (2009): Separating and extracting method of *Bacillus subtilis* lipopeptide antibiotic substance. Patente Nº: 101372502.
- Lugtenberg, B y Kamilova, F. (2009): Plant-Growth-Promoting. Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63: 541-556.
- Palmero, D., De Cara, M., Iglesias, C., Santos, M., Diezma, F., Lomas, C y Tello, J. C. (2008): Evaluación del poder patógeno de especies de *Fusarium* aisladas de aguas de cauces fluviales y fondos marinos de España sobre cuatro especies vegetales. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 34 (3): 399 – 414.
- Pérez, V. M., Añaños, M. A., Bedriñana, M., de Cara, G., Santos, H. M. y Tello, M. J. C. (2009): Patogénesis y especificidad parasitaria de aislados Españoles de *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 35(2): 297-315.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C and Mongkolsuk, S. (2008): Antifungal potential of Extracelular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. Journal of Biol Sciences*, 4 (5): 330-337.
- Reyes, R.A., Ruíz, S. E., Yam, Ch. C y Dzul, Ch. M. (2011): Selección de *Bacillus* spp con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15 (2): 117-121.
- Rodríguez, S. J. (2010). Formulación de un bioproducto mixto a partir de *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus subtilis* para el tratamiento de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis en opción al Grado Científico de Máster en Ciencias en Agricultura Urbana. INIFAT. La Habana. 80 pp.
- Ros, A. C., Arévalo, A. R y Rodríguez, Y. (2008): Aislamiento y prospección de cepas bacterianas del género *Bacillus* para el control del hongo *Phytophthora nicotianae* en el cultivo del tabaco. *Fitosanidad*, 12 (2): 127-128.
- Silva, K. Y., Franco, Y., Romero, D., González, M., Pérez, Y y Díaz, A. (2010): Aislamiento de bacterias del suelo con efecto antagonista “*in vitro*” frente a hongos fitopatógenos del cultivo del tabaco. En: Memorias del XVII Congreso Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. CD: AES-0.22. La Habana. Fecha de consulta: 17/8/2012.
- Singh, G., Prakosh, O., Lamparsona, M. P y Catalán, C. A. N (2003): Studies on Essential Oils. Chemical and Biological Investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile Oil. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 62 – 65.

- Sosa, L. A. I; Pazos, A-R, V; Torres, C. D y Casadesús, R. L (2011): Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15 (1): 39-43.
- Sun, J. B., Peng, M., Wang, Y. G., Zhao, P. J and Xia, Q. Y. (2011): Isolation and characterization of Antagonistic Bacteria against *Fusarium* Wilt and induction of defense Related Enzymes in banana 0187. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (5): 509-515.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patil, V., Raghutama, S., Munshi, T. K., Balaram, P y Chatao, B. B (2007): Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98 and its effect of phytopathogen magnapor the grisea. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2331-2339.
- Valero, M. C (2008): New reports of methods for biocontrol agents test. *FEMS Journal Microbiology*, 35 (5). <http://redalyc.vaemex.mx/redalyc/pdf/612/61224204.pdf>. Fecha de consulta: 13/10/2011.

Fecha recibido: 7 de octubre de 2013.

Fecha aceptado: 18 de marzo de 2014.