

SELECCION *IN VITRO* DE BACTERIAS ANTAGONICAS A *Alternaria solani**

Shuichi Okumoto**
Elkin Bustamante**

ABSTRACT

Bacillus spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. isolates collected from the field were tested under laboratory conditions for their antagonism to *A. solani*. Some of them showed antagonism when the fungus's germ-tubes growth decreased. Antagonistic isolates simultaneously reduced the growth of germ-tubes and number of thier ramifications. However, the number of germ-tubes were not reduced. The *Bacillus* spp. isolates evaluated were more antagonistic and numerous than those of the fluorescent *Pseudomonas* spp. Some of the antagonistic isolates presented the characteristic of chitinase production, which can degrade the fungi cell wall. Most of the chitinolytic isolates were collected from the field treatment, with chitin alone or combined with other products.

RESUMEN

Cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes aisladas del campo fueron probadas bajo condiciones de laboratorio por su antagonismo a *A. solani*. Varias de ellas mostraron antagonismo al disminuir el crecimiento de tubos germinativos del hongo. Las cepas antagonicas redujeron simultaneamente el crecimiento de tubos germinativos y el número de sus ramificaciones. Sin embargo, no disminuyeron el número de tubos germinativos. Las cepas evaluadas de *Bacillus* spp. fueron más antagonicas y numerosas que las de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Algunas cepas antagonicas presentan la característica de producir quitinasa, la cual puede degradar la pared celular del hongo. La mayoría de las cepas quitinolíticas se aislaron del tratamiento de campo de quitina sola o combinada con otros productos.

INTRODUCCION

El control biológico de patógenos de plantas se considera un componente importante del manejo integrado de plagas, en especial como una alternativa a otros componentes que pueden traer riesgos de contaminación, promover otras plagas u otros efectos secundarios.

El tizón temprano, causado por *Alternaria solani*, afecta el follaje y frutos del tomate. La enfermedad se maneja regularmente con fungicidas químicos, cuyos residuos llegan a la mesa de los consumidores en frutos frescos. Para eliminar estas contaminaciones y disminuir los costos de control se emplean prácticas culturales, variedades resistentes y agentes de control biológico. Las bacterias, *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes, se consideran buenos candidatos como agentes de control biológico por su amplia distribución y capacidad de producir enzimas degradadoras de tejidos fungosos.

El propósito de este ensayo fué evaluar el efecto de bacterias antagonicas sobre el desarrollo de *A. solani* bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Fitopatología del CATIE. Se consideraron como tratamiento de este experimento cepas de bacterias evaluadas así: 15 de *Bacillus* spp. y 18 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes aisladas el 9 de Enero de 1992 y 11 de *Bacillus* spp. y 49 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes aisladas el 17 de Enero de 1992, las cuales provenian de hojas de tomate con tratamientos iguales a los descritos en el primer experimento realizado por Okumoto (1992), en el cultivo sembrado el 3 de Septiembre de 1991.

Se prepararon las suspensiones bacteriales a partir de cultivos crecidos por 24 horas en AN (Agar Nutriente), a 30°C y se ajustaron a 10⁹ células/ml con la ayuda de la cámara de conteo Petroff-Hausser (French y Herbert 1982).

El aislamiento de *A. solani* se obtuvo de las hojas de tomate no asperjadas con químicos, utilizando los medios de cultivo agar-agua y V-8. La esporulación de *A. solani* se indujo mediante el método de luz ultravioleta, combinado con el de Dhingra y Sinclair (1985). La concentración de conidias se ajustó a 2x10⁴ conidias/ml e inmediatamente se mezcló con igual volumen de suspensión bacterial o con agua destilada esteril (Testigo).

El porta-objeto cubierto con agar-agua se colocó en una placa petri que disponía en su base, de papel filtro mojado y un tubo de vidrio en forma de

Recibido: 14/06/93. Aprobado: 08/10/93.

*Basado en la Tesis de Mag. Sc. del primer autor, Programa de Posgrado, CATIE Turrialba, Costa Rica.

**CATIE, Area de Fitoprotección, 7170 Turrialba, Costa Rica.

V. De cada suspensión bacteriana se colocó una gota (0.01 ml) con conidias en la superficie del porta-objeto, la temperatura de incubación varió de 25-28°C. Las conidias y el tubo germinativo fueron teñidos con azul de algodón en lactofenol después de 24 horas (Fravel y Spurr Jr. 1977).

Se tomaron en cuenta las siguientes mediciones microscópicas: porcentaje de germinación, número de tubos germinativos por conidia, longitud del tubo germinativo más largo de la conidia y su número de ramificaciones.

El nivel de antagonismo se determinó mediante la prueba de Dunnett (Steel y Torrie 1980) para comparar los tratamientos contra el testigo, de acuerdo con cada categoría de medición en diferentes períodos.

Algunas cepas antagonistas fueron probadas por su característica de producción de quitinasa, confirmada por la presencia de zonas transparentes alrededor del crecimiento de bacterias en el medio agar nutriente+quitina (2.3% de agar nutriente y 0.5% de suspensión coloidal de quitina). La suspensión coloidal de quitina se preparó de exoesqueletos de camarones, mediante el método de Backman modificado (comunicación personal).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la mayoría de los tratamientos se presentó más del 90% de germinación de las conidias de hongo. Sin embargo, muchas cepas bacteriales mostraron el antagonismo a *A. solani*, al afectar el crecimiento del tubo germinativo, en especial su longitud (Cuadro 1).

Los aislados del género *Bacillus* fueron los más antagonistas (medido como el % de inhibición del crecimiento de los tubos germinativos). La mayoría de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no fueron tan efectivas en la inhibición del crecimiento del hongo. Además, se observó el antagonismo de las cepas de *Bacillus* en un número mayor que en las de *Pseudomonas* fluorescentes. Las 11 mejores cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo en más de 80% (Fig. 1).

El crecimiento de tubos germinativos y el número de ramificaciones en estos tubos fueron inhibidos simultáneamente por las bacterias y se encontró una correlación altamente significativa ($p < 0.01$) entre la longitud del tubo germinativo más largo y número de ramificaciones del mismo. Sin embargo, no disminuyó el número de tubos germinativos (Cuadro 1).

CUADRO 1. Correlación entre el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo, con la presencia de las diferentes cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp fluorescentes, aisladas el 9 y el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

VARIABLE	COEFICIENTE DE CORRELACION					
	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Aisladas 9 de enero, 1992						
X1: Número de tubos germ.	1.000	1.000	-0.031	0.045	0.023	0.367**
X2: Longitud de tubo germ. más largo			1.000	1.000	0.898**	0.570**
X3: Número de ramificaciones en tubo germ.					1.000	1.000
Aisladas 17 de enero, 1992						
X1: Número de tubos germ.	1.000	1.000	0.331	0.069	0.303	0.264
X2: Longitud de tubo germ. más largo			1.000	1.000	0.941**	0.757**
X3: Número de ramificaciones en tubo germ.					1.000	1.000

**Nivel de significancia al 1%.

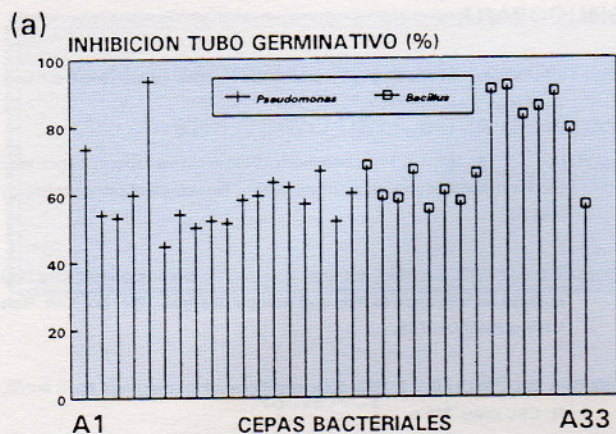
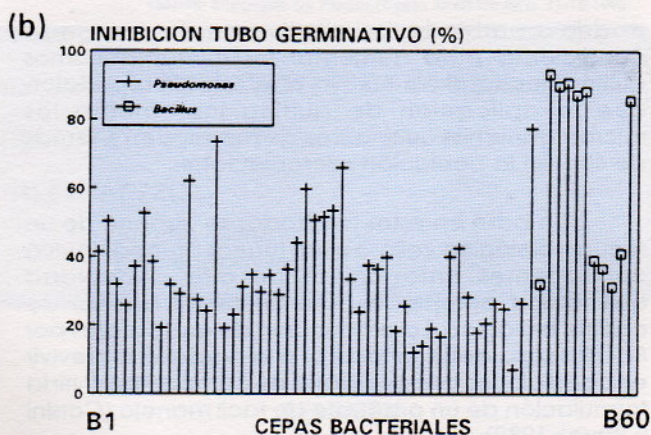


Fig. 1. Porcentaje de inhibición a *A. solani* de *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp., aisladas el 9 (a) y 17 (b) de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1992.

En la observación microscópica, se encontró un crecimiento anormal de los tubos germinativos, los cuales se dilataban y formaban bulbos. Observaciones similares fueron hechas por Vasudeva Y Chakravarthi (1951) en un filtrado del cultivo de un aislado de *Bacillus subtilis* antagonístico a *A. solani*. La bacteria produjo malformación de los tubos germinativos con un desarrollo posterior de bulbos. Este filtrado mostró una acción fungistática y fungicida.

De acuerdo con las observaciones microscópicas, no se detectó la producción de lisis en los tubos germinativos de las conidias de *A. solani* estudiadas. Otros estudios señalan que la producción de lisis, debido a la interacción entre bacteria y hongo, es una probable causa de inhibición del hongo (Baker y Cook 1974, Blakeman y Fraser 1974, Fokkema y Lorbeer 1974, Morgan 1963). Sin embargo, Fravel y Spurr Jr. (1977) afirman que diferentes mecanismos se involucraron en la supresión del



crecimiento del hongo; sustancias tóxicas producidas por bacterias tienen una mayor influencia que la producción de lisis por enzimas, lo cual coincide con el resultado de este estudio.

Algunas cepas que presentan antagonismo, a su vez producen quitinasa que tiene la habilidad de degradar la pared celular del hongo. Se encontró una relación de 1:20 entre las cepas quitinolíticas y no quitinolíticas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, en cambio, en las cepas de *Bacillus* spp., esta fue 1:2.6 (Cuadro 2). Esto significa que se pueden aislar más cepas quitinolíticas en la población de *Bacillus* spp. que en la de *Pseudomonas* fluorescentes.

La mayoría de las cepas caracterizadas como quitinolíticas fueron aisladas de las plantas asperjadas con la sola quitina o en mezcla con otros productos (Cuadro 2). Se considera que la aplicación de quitina, aunque no aumenta la población de bacterias, sí

CUADRO 2. Respuesta a la producción de quitinasa de cepas bacteriales antagonísticas de acuerdo a su tratamiento de origen y a la formación de zonas transparentes en el medio agar nutriente+quitina. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1992.

TRATAMIENTO DE ORIGEN	TRANSPARENCIA EN ANQ DE			
	P. fluorescentes		<i>Bacillus</i> spp.	
	+	-	+	-
Testigo	0	9	0	1
Fungicida	1	7	0	9
Leche	0	4	0	7
Fung. +Leche	0	5	0	1
Quitina	0	9	2	1
Quit. +Fung.	0	1	6	0
Quit. +Leche	0	4	1	3
Quit. +Fung. +Leche	1	1	0	1

podría cambiarla cualitativamente, creando condiciones para aumentar los microorganismos quitinolíticos. Kokalis-Burelle *et al.* (1991) reportaron que la aplicación de quitina incrementó los microorganismos quitinolíticos de menos de 1% a más de 40% en la población microbiana total.

Con base en estos resultados se dispone de un recurso biológico valioso para futuras pruebas *in vivo* con agentes antagonistas de alta capacidad quitinolítica apropiada para un futuro agente de control biológico. La producción de endosporas por *Bacillus* spp., debería facilitar a la bacteria sobrevivir en condiciones desfavorables de campo y permitir la formulación de un producto de fácil manejo (Corsini y Pavek 1989).

CONCLUSIONES

- En el experimento de antagonismo *in vitro*, las cepas de bacterias antagonistas a *A. solani* presentaron una amplia variación en el grado de antagonismo.
- El antagonismo de las cepas bacteriales se manifiesta en la reducción simultánea del crecimiento de tubos germinativos y su número de ramificaciones. Sin embargo, no afecta el número de tubos germinativos.
- Las cepas más antagonistas de *Bacillus* spp., con respecto a inhibición del crecimiento de los tubos germinativos, son más numerosas y menos variables en su antagonismo que las de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.
- Algunas cepas antagonistas mostraron capacidad quitinolítica.
- La relación entre cepas quitinolíticas: no quitinolíticas para *Pseudomonas* spp. fluorescentes es de 1:20 y para *Bacillus* spp. es de 1:2.6
- La mayoría de las cepas quitinolíticas se aislaron en el tratamiento de quitina sola o combinada con otros productos.

RECONOCIMIENTO

Al Natural Resources Institute de Gran Bretaña, por la ayuda financiera para este estudio mediante el contrato extra-mural EMCX-0179, Manejo Integrado de Plagas del suelo en América Central y AID/ROCAP/RENARM, por el apoyo adicional.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1974. *Biological control of plant pathogens*. San Francisco, California. Freeman 433 p.
- BLAKEMAN, J.P.; FRASER, A.K. 1974. Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of chrysanthemum leaves. *Physiological plant pathology* 1:45-54.
- CORSINI, D.L.; PAVEK, J.J. 1988. Evaluation of potato breeding selections and cultivars for resistance to field and storage diseases, 1987. *Biol. Cult. Tests Control Plant Dis.* 3:25.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1985. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, FL. CRC press. 335 p.
- FOKKEMA, N.J.; LORBEER, J.W. 1974. Interactions between *Alternaria porii* and the saprophytic microflora of onion leaves. *Phytopathology*. 64:1128-1133.
- FRAVEL, D.R.; SPURR, H.W.Jr. 1977. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in controlled environment. *Phytopathology*. 67:930-932.
- FRENCH, E.D.; HERBERT, T.T. 1982. *Metodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (ICA). 289 p.
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, D.A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; PLOPER, L.D. 1991. Chitin as foliar amendment to modify microbial ecology and control disease. (Abstr.). *Phytopathology*. 81:1152.
- MORGAN, F.L. 1963. Infection inhibition and germ-tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology*. 53:1346-1348.
- OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmienda sobre bacterias antagonistas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics*. 2nd ed. New York. McGRAW-HILL. 633 p.
- VASUDEVA, R.S.; CHAKRAVARTI, B.P. 1954. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani* (ELL. & MART) JONES & GROU. *Ann. Appl. Biol.* 41(4):612-618.