Comunicación corta

NUEVOS AISLADOS DE *BACILLUS* SPP. ANTAGONISTAS A *SCLEROTIUM ROLFSI, RHIZOCTONIA SOLANI* Y *PYTHIUM APHANIDERMATUM*

Acenet I. Sosa López,[1] Victoria Pazos Álvarez-Rivera[2] y Marleny González García[1]

[1] *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, asosa@inisav.cu*

[2] *Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Calle 25 no. 453 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10500*

El cultivo del tabaco ocupa un lugar importante en la agricultura cubana por los aportes y beneficios que reporta anualmente al país, y al poseer amplia venta en el mercado europeo adquiere una elevada importancia, por lo que recibe una atención priorizada [Pérez *et al*., 2000].

Anualmente los semilleros de tabaco muestran afectaciones provocadas por numerosas plagas y enfermedades, cuyos daños severos ocasionan el colapso total de las plántulas, fundamentalmente en la fase temprana del cultivo; por lo general los hongos fitopatógenos del suelo ocasionan estas enfermedades. Hay estudios que muestran que las especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* son las más frecuentemente encontradas, en muchas ocasiones debido a las condiciones climáticas que se registran anualmente en el país [Brada *et al.*, 1995].

El control biológico como alternativa o como complemento del control químico ocupa un lugar muy importante en el control de plagas y enfermedades. El grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, el hongo *Trichoderma harzianum* y bacterias pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizan por presentar un elevado potencial en el control de tales patógenos. Estas últimas son productoras de hormonas, antibióticos y metabolitos termoestables que les confieren una alta capacidad de colonización en los ambientes agrícolas y a su vez impide el establecimiento de otros microorganismos patógenos [Bochow *et al.*, 1995].

El objetivo de este trabajo fue obtener aislados bacterianos, pertenecientes al género *Bacillus*, con efecto antagonista para el control de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Rs10) y *Pythium aphanidermatum* en condiciones *in vitro*, a partir de muestras de hojas, suelo, raíces y rizosferas colectadas en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Ciudad de La Habana, Sancti Spíritus, Cienfuegos, Granma, Santiago de Cuba y Las Tunas.

Los patógenos empleados en este estudio para la realización de las pruebas de antagonismo pertenecen a la colección del Laboratorio de Fitopatología del INISAV. Las muestras se procesaron según procedimiento descrito por Fernández-Larrea (1999). Para determinar las características morfológicas y culturales de las colonias y de las células cultivadas en agar nutritivo se realizaron observaciones al microscopio estereoscópico (100X) y al microscopio óptico (1000X). Para la determinación del género *Bacillus* se utilizó el *Manual de Bergey* [Claus y Berkeley, 1986]. La actividad biológica de los aislados identificados como *Bacillus* spp. se evaluó *in vitro* mediante un enfrentamiento dual con los patógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Rs10) y *Pythium aphanidermatum*. Como testigo se empleó solo el patógeno, sembrado en el centro de las placas de Petri que contenían PDA; luego se incubó todo por el período de veintiún días y se realizaron observaciones diarias del experimento, con el fin de detectar alguna manifestación de antagonismo, y además observar el comportamiento de ambos microorganismos durante el período de incubación. Las evaluaciones se hicieron a los cinco, quince y veintiún días, además de repetirse el experimento tres veces.

Se obtuvo un total de 323 aislados nativos, con características semejantes a las descritas para el género *Bacillus* al presentar células en forma de bastón, alargadas, presencia de endoesporas y esporas, por responder positivamente a la tinción de Gram y ser catalasa positiva. Dentro de ellos, 17 mostraron efecto antagonista a los hongos *S. rolfsii, R. solani* (Rs10) y *P. aphanidermatum*, ya que al tercer día de iniciado el experimento los testigos de los tres patógenos habían cubierto la placa de Petri completamente; sin embargo, al enfrentarse con los *Bacillus* fueron susceptibles a 17 de ellos, al presentar diferentes manifestaciones de antagonismo. En una el crecimiento micelial del patógeno fue diferente al testigo, con el micelio enroscado y sin llegar a cubrir la placa completa; en otra el micelio alcanzó a cubrir la placa, pero no se distinguió a simple vista, sino mediante el microscopio estereoscópico 100X debido a que no presentaba la misma coloración con respecto al testigo, y además era un micelio empobrecido pegado a la superficie del medio de cultivo. Otro caso presentó una inhibición total del crecimiento micelial del patógeno, y por último se observó la presencia de una zona clara que separaba a un microorganismo de otro sin crecimiento aparente por parte de ambos. Todo parece indicar que tanto el hongo como la bacteria segregan algún tipo de metabolito al medio que impide el crecimiento del patógeno, y aunque a simple vista no se observa crecimiento bacteriano, se demostró experimentalmente que sí, pero que la población de este último fue menor que en el resto de la placa, lo que prueba que este grupo es resistente al metabolito producido por el patógeno.

El proceso de selección de bacterias antagonistas *in vitro* se considera el paso más difícil en el desarrollo de un candidato promisorio para el control biológico de enfermedades [Talavera *et al.*, 1998]. Estos autores plantean además que de 25 aislamientos a partir de la rizosfera de cereales, solo uno produjo una zona de inhibición contra algunos de los microorganismos probados, mientras que Jiménez *et al*. (2001) seleccionaron solo una cepa que podía inhibir diferentes tipos de patógenos entre los 30 aislamientos obtenidos de rizosfera de papa.

Este trabajo demuestra metodológicamente que a partir de este tipo de interacción antagónica es posible encontrar bacterias antagonistas evaluables para el biocontrol, a pesar de la desproporción entre el total de aislamientos obtenidos y el número de antagonistas encontrados, lo que indica que pese a que la microbiota del suelo es abundante y diversa, el número de antagonistas no es proporcional.

REFERENCIAS

Bochow, H.; K. Gantcheva; A. Vanachter: «Soil Introductions of *Bacillus subtilis* As Biocontrol Agent and Its Population and Activity Dynamic», Fourth International Symposium on Soil and Substrate Infestation and Desinfestations, Leuven, Bélgica, Sept., *Acta-Horticultural* 382:164-172, 1995.

Brada, I. E.; E. Quintana; E. Pelaya; T. Araújo: «Efecto de *Bacillus* spp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporium* Schl. var. *cubensis* Smith», Resúmenes Bioplag 95, INIFAT, 26-28 abr., La Habana, 1995.

Claus, D.; R. C. W. Berkeley: «Genus Bacillus. Bergey's», *Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed., vol. 2, Williams & Wilkins, pp. 1105-1139, 1986.

Fernández-Larrea, O.: «Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario», Informe final, PNCT, Biotecnología Avícola, INISAV, Cuba. 1999.

Jiménez, Rocío; G. V. Calleros; S. T. Franco; V. O. Portugal: «Bacterias promotoras del crecimiento de plantas», *Agro-Biotecnología. Avance y Perspectivas* 20:395-400, 2001.

Pérez, E.; A. Fernández; V. Andino; M. García; E. Paredes; B. L. Muiño; M. Stefanova; F. Piedra; C. Hernández; O. Rodríguez; C. M. Medina: *Tecnología para la eliminación del bromuro de metilo. Semilleros de tabaco con sustrato orgánico y uso de medios biológico*. Proyecto Eliminación total del bromuro de metilo en el cultivo del tabaco en Cuba, INISAV, MINAGRI, La Habana, 2000.

Talavera, M. E.; E. Bustamante; R. González; V. Sánchez: «Selección y evaluación en el laboratorio y campo de microorganismos glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*», *Manejo Integrado de Plagas*, 47:24-30, 1998.