

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales

Control of *Rhizoctonia solani* in common beans with rhizobacteria and natural products

Dienelys Hernández Pérez¹, Manuel Díaz Castellanos¹, Reinaldo Quiñones Ramos¹, Ramón Santos Bermúdez², Nayanci Portal González³, Lidcay Herrera Isla¹

¹ Facultad de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

² Facultad de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Estatal Amazónica, Campus principal km 2 ½ vía a Napo, Puyo, Ecuador, CP 160150

³ Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón km 9 ½, Ciego de Ávila, Cuba, CP 69450

E-mail: lidcayhi@uclv.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de rizobacterias y productos naturales sobre el control de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en frijol común, se desarrollaron experimentos *in vitro* y en condiciones semicontroladas. Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *P. aeruginosa* inhibieron totalmente el crecimiento *in vitro* de *R. solani*, en la evaluación del método de cultivo dual o doble capa. *Bacillus subtilis* y *B. cepacia* mostraron un efecto inhibitorio menor, aunque superior al 65 %; mientras que ninguno de los tratamientos evaluados por el método de los pocillos inhibió totalmente el crecimiento del organismo patógeno. Las evaluaciones en condiciones semicontroladas mostraron que todos los tratamientos difieren estadísticamente respecto al control en cuanto a la proporción de plantas enfermas, aunque los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de las rizobacterias, sin diferencias estadísticas respecto al control químico.

Palabras clave: biocontrol, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudomonas*, *Bacillus*

ABSTRACT

With the objective of to evaluate the effect of rhizobacteria and natural products on controlling the disease caused by the soil fungus *Rhizoctonia solani*, *in vitro* an in semi controlled conditions, some experimentes were developed. The *in vitro* growth of *R. solani* was entirely inhibited by *Pseudomonas fluorescens* and *P. aeruginosa* in the assessment by the dual culture method or bilayer, *Bacillus subtilis* and *B. cepacia* showed lower inhibitory effect, although higher than 65 %; whereas the growth of the pathogen was not fully inhibited by any of the treatments tested by the method of the wells. In the evaluations under semi controlled conditions, all treatments showed statistically significant differences with respect to control as to the ratio of diseased

plants, although best results were achieved with the use of studied rhizobacteria, no statistically significant differences with chemical control were appreciated.

Keywords: biocontrol, *Phaseolus vulgaris*, *Pseudomonas*, *Bacillus*

INTRODUCCIÓN

Sobre el cultivo del frijol común influye notablemente la incidencia de enfermedades fúngicas, entre las que se destacan las causadas por hongos que habitan en el suelo, como *Rhizoctonia solani* que causa afectaciones considerables al cultivo (Nerey, 2010). Por eso, determinar el efecto de métodos no convencionales basados en el uso de medios biológicos y productos naturales para reducir la incidencia de estos hongos al cultivo del frijol común, constituye una prioridad.

Las bacterias que pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* se han usado en el control biológico de hongos fitopatógenos (Diaz, 2011) entre los que se encuentra *R. solani*, aunque existen pocos informes sobre su utilización en el frijol común. De este modo, la presente investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la efectividad *in vitro* y en condiciones semicontroladas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, y productos naturales, en el tratamiento a la semilla de frijol, para el control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Para los ensayos en condiciones semicontroladas se usaron semillas de frijol común del cultivar BAT-482 (Blanca), registrada en el Listado oficial de variedades comerciales (MINAGRI, 2009).

Microorganismos utilizados

- *Burkholderia cepacia* (cepa CCIBP556W) procedente del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP)
- *B. subtilis* (cepa ATCC 6051) procedente del Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gent, Bélgica
- *P. aeruginosa* (cepa 7NSK2) procedente del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Ciencias

Biológicas Aplicadas, Universidad de Gent, Bélgica

- *P. fluorescens* (cepa CMR12) procedente del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Ciencias Biológicas Aplicadas, Universidad de Gent, Bélgica
- *Trichoderma viride* (cepa TS-85), *Sclerotium rolfsii*, *R. solani* y *Macrophomina phaseolina*, procedentes del Laboratorio de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV

Productos naturales

- Chitoplant® (Quitosana 99,9 %)

Plaguicidas químicos

- TMTD 80 % PH (Tetrametil Tiuram Disulfuro)

Para la reproducción de *Bacillus subtilis* se utilizó caldo nutriente, y King-B para *P. fluorescens*, los cuales fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 Kg cm⁻² de presión por 15 min. Los microorganismos se mantuvieron en condiciones óptimas de crecimiento (28 ± 1 °C durante 24 h). Estos cultivos, previa evaluación de sus concentraciones (108 ufc ml⁻¹), fueron aprovechados como soluciones para el tratamiento de las semillas.

El recubrimiento con bacterias se realizó después de activarlas en 5 mL de caldo nutriente durante 48 h, posteriormente se multiplicaron dentro de un Erlenmeyer con 100 mL de caldo nutriente (se colocaron en una zaranda orbital Gerhardt durante 24 h a 30 °C), luego se inoculó zeolita para cargarla con bacterias, la que fue secada al aire durante 48 h. Las semillas se cubrieron con la zeolita cargada utilizando almidón de yuca al 8 % como material adherente y después, secadas nuevamente al aire durante 48 h antes de ser sembradas.

El hongo para recubrir la semilla se multiplicó en un medio de cultivo (30 g de miel final y 3 g de levadura disueltos en un litro de agua destilada

con un pH de 5,5) durante 48 h a 30 °C en una zaranda orbital Gerhardt; a diferencia de las bacterias, el hongo no se activó. Ulteriormente, se siguió el mismo procedimiento realizado en el caso de las bacterias para el recubrimiento de las semillas.

Como organismo patógeno se trabajó *R. solani* obtenido del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), el mismo fue sembrado en placas de Petri (9 cm de diámetro) con PDA (Papa Dextrosa Agar), mantenido a 28 °C durante siete días. Para su multiplicación se transfirieron discos de 1 cm de diámetro a Erlenmeyers previamente esterilizados en autoclave (120 °C durante una hora), los cuales se incubaron a 28 °C durante 15 días.

Efecto *in vitro* de bacterias antagonistas

Para evaluar el efecto antagónico *in vitro* de *B. subtilis*, *B. cepacia*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* sobre este hongo fitopatógeno del suelo se utilizaron dos métodos:

- **Cultivo Dual o Doble Capa:** Se utilizó Agar Nutriente en placas de Petri (9 cm de diámetro) las cuales fueron inoculadas con los diferentes microorganismos antagonísticos en forma de zigzag, incubándose a 28 °C durante 24 h. Posteriormente se adicionó una capa de agar papa (PDA) al 2 % y se colocó un disco (0,5 cm de diámetro) de un cultivo puro de los hongos ensayados en el centro de la placa. Se realizaron evaluaciones desde las 24 h hasta las 72 h.
- **Método de los Pocillos:** Las cepas bacterianas se activaron en 5 ml de caldo nutriente, las cuales se encubaron a 28±1 °C por 48 h. Luego en placas de Petri con medio agar nutriente se hicieron dos perforaciones (con un perforador de tapones de 0,5 cm de diámetro) en extremos opuestos de la placa. A estos se les añadió 0,1 ml de suspensión bacteriana, seguidamente se colocó un disco de cada hongo estudiado de 0,5 cm de diámetro en el centro de la placa, incubándose a 28 ± 1 °C, evaluándose el crecimiento durante 24 a 72 h.

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) según Bashan *et al.*

(1996) para cada tratamiento. Como control fue utilizado un tratamiento de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión bacteriana. Para cada cepa bacteriana se emplearon tres réplicas.

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100 \quad (1)$$

- R1 – diámetro de crecimiento micelial del patógeno en ausencia de la bacteria
- R2 – diámetro de crecimiento micelial del patógeno en presencia de la bacteria

Evaluaciones en condiciones semicontroladas

Se utilizaron recipientes de PVC (400 g) a los que se les agregó suelo del tipo Pardo mullido (Hernández *et al.*, 1999) inoculado al 2 % (p/p) con *R. solani*. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con ocho tratamientos y cuatro réplicas.

Se sembraron cinco semillas de frijol común, variedad BAT- 482 (blanca) con un 100 % de germinación, por réplica. La humedad del suelo fue mantenida a partir de la adición de 230 ml de agua, por recipiente.

Se cuantificó la proporción de plantas enfermas para cada tratamiento:

1. Control absoluto (Sin tratamiento)
2. Control químico (TMTD 80 % PH, 3 g l-1) mediante la inmersión de la semilla durante 10 minutos
3. *B. subtilis* 1,5 x 10⁹ UFC ml-1 (recubrimiento de la semilla)
4. *B. cepacia* 4,9 x 10⁹ UFC ml-1 (recubrimiento de la semilla)
5. *P. aeruginosa* 1,8 x 10⁹ UFC ml-1 (recubrimiento de la semilla)
6. *P. fluorescens* 6,6 x 10⁹ UFC ml-1 (recubrimiento de la semilla)
7. Chitoplant® (Quitosana 99.9 %) al 0,1 % (inmersión de la semilla)
8. *T. viride* (cepa TS-85) 1,2 x10⁹ esporas (recubrimiento de la semilla)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto *in vitro* de bacterias antagonistas sobre *R. solani*

Al evaluar el efecto *in vitro* por el método de cultivo dual o doble capa (tabla 1), se encontró que *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* inhibieron totalmente el crecimiento del patógeno, mientras

Tabla 1. Efecto antagónico *in vitro* de bacterias antagonistas sobre *R. solani* (PICR) a las 72 horas

Tratamientos	PICR (%)
<i>P. fluorescens</i>	100 a
<i>P. aeruginosa</i>	100 a
<i>B. subtilis</i>	66,26 b
<i>B. cepacia</i>	67,04 b
EE (±)	5,75
CV (%)	13,20

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0,05$ por Duncan

que *B. subtilis* y *B. cepacia* mostraron un efecto inhibitorio menor, pero superior al 65 %.

Por su parte, ninguno de los tratamientos evaluados por el método de los pocillos inhibió totalmente el crecimiento *R. solani* (tabla 2), resultando *B. cepacia* y *P. aeruginosa* como las más efectivas, con valores de PICR de 49,70 y 47,90 % respectivamente.

Ramírez (2014) en estudios sobre el efecto antagonista de bacterias en el tratamiento a la semilla de frijol común contra hongos fitopatógenos que habitan en el suelo, reportó que las bacterias antagonistas ensayadas inhibieron *in vitro* el crecimiento micelial de *S. rolfisii*, *M. phaseolina* y *R. solani*. En condiciones de campo las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas de los cultivares estudiados.

Cruz (2015) al evaluar el potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, demostró que una cepa puede inhibir el crecimiento del patógeno *in vitro* a través de varios mecanismos. Específicamente, la cepa nativa *B. pumilus* CCIBP-C5 aislada

Tabla 2. Efecto antagónico *in vitro* de bacterias antagonistas sobre *R. solani* a las 72 horas (PICR)

Tratamientos	Inhibición crecimiento (%)
<i>B. cepacia</i>	49,70 a
<i>P. aeruginosa</i>	47,90 a
<i>P. fluorescens</i>	28,13 b
<i>B. subtilis</i>	27,16 b
EE (±)	3,67
CV (%)	13,22

Medias con letras desiguales difieren para $p < 0,05$ por Duncan

de la filosfera de 'FHIA-18' (AAAB) produce metabolitos con acción sobre el organismo patógeno, la respuesta de defensa de la planta y la expresión de la enfermedad.

Mavrodí et al. (2006) y Picard y Bosco (2008) señalaron que especies de *Pseudomonas* y otros géneros bacterianos sintetizan fenazinas e incluyen alrededor de 50 metabólicos secundarios pigmentados, los cuales ejercen efecto antifúngico. Adicionalmente, Parra et al. (2009) evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* de cuatro cepas de *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos y demostraron que las cuatro cepas tienen actividad antifúngica similar a *T. viride* porque ocasionan la inhibición total o parcial de la esporulación en hongos como *Fusarium moniliforme*, *F. solani*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. También Álvarez et al. (2011) identificaron metabolitos de tipo lipopéptido en el filtrado de cultivo de cepas de *B. amyloliquefaciens*, capaces de producir similares deformaciones en el micelio de *Sclerotinia sclerotiorum* (de Bary).

Condiciones semicontroladas

En las evaluaciones realizadas todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control absoluto respecto a la proporción de plantas enfermas, aunque los mejores resultados se obtuvieron con las bacterias estudiadas, sin diferencias estadísticas con el control químico (TMTD 80 % PH). Además, las rizobacterias resultaron superiores a los productos naturales en la protección de las plantas frente a este organismo patógeno (figura).

Tanto los medios biológicos como los productos naturales utilizados tuvieron un efecto preventivo en la protección de las plantas de frijol contra este hongo del suelo. Arcos y Zúñiga (2015) evaluaron el efecto de rizobacterias en el cultivo de papa y reportaron que las cepas de *B. subtilis* (Bac17M8 y Bac17M9) y *B. amyloliquefaciens*, nativas de la región altiplánica del Perú y Bolivia, inoculadas a plántulas de dos cultivares de papa (Ccompis y Andina), mostraron la capacidad de inhibir la infección por *R. solani*. En ambos cultivares, las tres cepas de rizobacterias controlaron al fitopatógeno con una reducción del porcentaje de muerte de plántulas, y la disminución del porcentaje de tubérculos infectados, en comparación al tratamiento no inoculado.

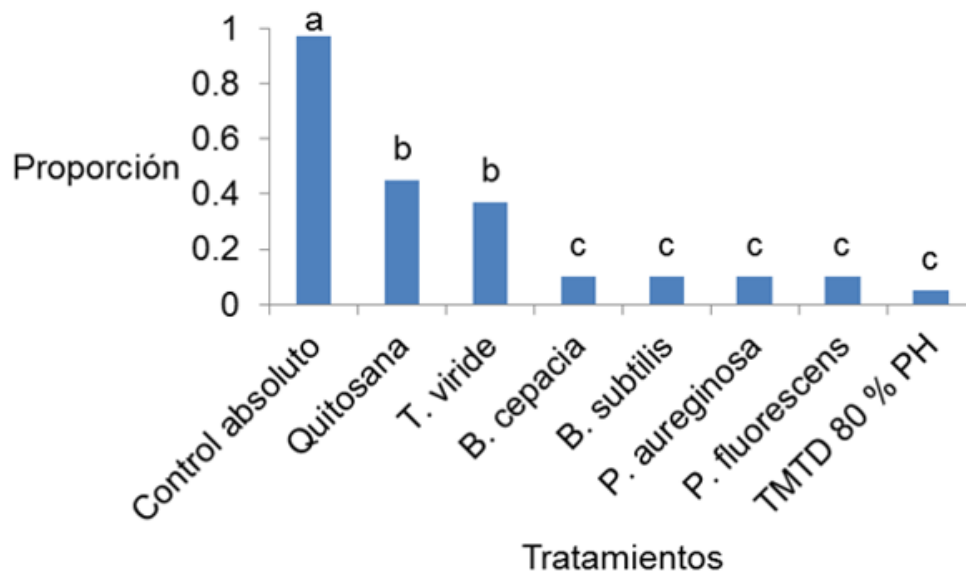


Figura. Efecto del tratamiento a la semilla con organismos antagonistas y sustancias naturales sobre las afectaciones por *R. solani* (Proporción de plantas enfermas)

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente por la prueba de comparación de proporciones

Castillo-Reyes *et al.* (2015) al evaluar la efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *R. solani* encontraron que los aislamientos de *Bacillus* obtenidos de la rizosfera de plantas presentaron un efecto antagonista sobre *R. solani*. La especie más común encontrada fue *B. subtilis*, y en menor presencia *B. pumilus* y *B. atrophaeus*. Respecto a la quitosana, Martínez *et al.* (2004) refieren que este producto sirve de protección ante hongos fitopatógenos, adicionalmente, estimula el crecimiento de la planta, y funciona como un fungicida en general, protegiéndolas para que germinen con mayor efectividad.

CONCLUSIONES

Los tratamientos con bacterias antagonistas inhibieron *in vitro* el crecimiento de *R. solani*. Los mejores resultados se obtuvieron con el método de doble capa.

Las bacterias antagonistas y sustancias naturales fueron superiores al control absoluto y similares al control químico respecto a la reducción de plantas afectadas por *R. solani*, en condiciones semicontroladas.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, F., CASTRO, M., PRÍNCIPE, A., BORIOLI, G., FISCHER, S., *(et al.)*. 2011. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*

strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112:159-174.

ARCOS, J. and ZÚÑIGA, D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecología Aplicada*, 14 (2): 95-101.

BASHAN, J., HOLGUERÍ, G., FERRERA, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, 14:159-192.

CASTILLO-REYES, F., HERNÁNDEZ-CASTILLO, F., GALLEGOS-MORALES, G., FLORES-OLIVAS, A., RODRÍGUEZ-HERRERA, R. y AGUILAR, C. 2015. Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6 (3): 549-562.

CRUZ, M. 2015. Potencial de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la filosfera de *Musa* spp. como agentes de biocontrol de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Villa Clara, Cuba, 100 p.

- DÍAZ, M. 2011. Incidencia de *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii* Y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Villa Clara, Cuba, 100 p.
- HERNÁNDEZ, A., PÉREZ, J.M., BOSCH, D., RIVERO, L. 1999. Nueva Versión de la clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Inst. Suelos, AGRINFOR, Ciudad Habana, Cuba, 64 p.
- MARTÍNEZ, L., BERNSTEN, R., ZAMORA, M. 2004. Estrategias de mercado para el frijol Centroamericano. *Agronomía Mesoamericana*, 2 (15): 121-130.
- MAVRODI, D., BLANKENFELDT, W. y THOMASHOW, L. 2006. Phenazine. Compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 417-445.
- MINAGRI. 2009. Listado oficial de variedades comerciales. MINAGRI, La Habana, Cuba.
- NEREY, Y., Van BENEDEEN, S., FRANCA, S., JIMÉNEZ, A., CUPULL, R. (*et al.*). 2010. Influence of soil type and indigenous pathogenic fungi on bean hypocotyls rot caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HGI in Cuba. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 797-803.
- PARRA, E., CENTENO, S., ARAQUE, Y. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:103-109.
- RAMÍREZ, M. 2014. Bases para el manejo integrado de hongos fitopatógenos del suelo en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Agricultura Sostenible, Mención Sanidad Vegetal. UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido el 5 de febrero de 2016 y aceptado el 15 de marzo de 2018