

ORGANISMOS ANTAGONISTAS y CHITOPLANT® (QUITOSANA) EN EL TRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS DE *PHASEOLUS VULGARIS* L. CONTRA *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC.

Yander Fernández Cancio¹, Manuel Díaz Castellano², Marcos T. García González¹, Wilfredo Valdivia Pérez¹, Mailén Lorenzo Castro³, Manuel Rodríguez González¹ y Alexander Calero Hurtado¹.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) "Roberto Rodríguez" ubicada en la carretera a Camajuaní Km 5 ¹/₂, Villa Clara, en un suelo Pardo Sialítico carbonatado, con el objetivo de buscar alternativas para reducir las afectaciones provocadas al cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Sclerotium rolfsii* Sacc. Se evaluó la efectividad de productos naturales y biológicos, así como el efecto de los tratamientos sobre la morfofisiología del cultivo, para lo cual se peletizó las semillas con *Trichoderma viride* Raifi, *Bacillus subtilis* Cohn, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* Migula, *Pseudomonas fluorescens* Migula, y Chitoplant ® (Quitosana) un producto natural al 0.1% aplicado a la semilla por inmersión, comparándolos con el efecto del control químico (testigo estándar) realizado por el TMTD (tetrametiluramdisulfuro) 80% PH tratado por inmersión y un control absoluto. Se obtuvo como resultado que los tratamientos con las bacterias y el producto natural redujeron las afectaciones producidas por *S. rolfsii* significativamente en comparación con el control absoluto e inferiores al TMTD y *T. viride*. Los tratamientos con medios biológicos estimularon el crecimiento, desarrollo del cultivo. El tratamiento a la semilla con productos biológicos y sustancias naturales puede ser utilizado como una alternativa para la reducción de *S. rolfsii* que ocasionan pérdidas en el cultivo del frijol común.

Palabras Clave: Fitopatógeno, semillas, antagonistas

Antagonistic organisms and Chitoplant* in the treatment of the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. against *Sclerotium rolfsii* Sacc.

ABSTRACT

The present work was carried out in the Basic Unit of Cooperative Production (UBPC) "Roberto

¹Yander Fernández Cancio, Profesor de la Universidad de Sancti Spiritus José Martí Pérez; Avenida de los Mártires # 360, Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: yanderfc@suss.co.cu

²Universidad Central Marta Abreu de las Villas; Carretera a Camajuaní Km 6, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

³Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Carretera del Jíbaro Km 2 ¹/₂, Sancti Spiritus, Cuba.

Rodríguez” located on highway Camajuaní Km 5 1/2, Villa Clara, in a brown sialitic carbonate soil, with the objective of looking for alternatives to reduce the negative impact of *Sclerotium rolfsii* Sacc. on the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The effectiveness of natural and biological products was evaluated, as well as the effect of the treatments on the morphophysiology of the crop. Seeds were treated with one of: *Trichoderma viride* Raifi, *Bacillus subtilis* Cohn, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* Migula, *Pseudomonas fluorescens* Migula, or Chitoplant® (Quitosana at 0.1%). Products were applied to the seed by immersion. Control treatments included a water control and a chemical control; TMTD WP (tetrametiltiuramdisulfuro 80%), both applied by immersion. The results obtained were that: the treatments with the bacteria and Chitoplant significantly reduced damage caused by *S. rolfsii* in comparison with the water and chemical controls and *T. viride*. All natural treatments with the exception of Chitoplant stimulated the growth and development of the crop. Seed treatment with biological products and natural substances can be used as an alternative for the reduction of *S. rolfsii* that cause losses in crops of the common bean.

Key Words: Phytopathogenic, seeds, antagonistic

INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) por su elevado contenido nutritivo de origen vegetal al alcance de la mayoría de la población es considerado un cultivo estratégico (Armando, 2011), cuyo grano es una fuente proteica de gran importancia en la dieta diaria. En Cuba, constituye una fuente de alimentación fundamental ya que permite compensar el déficit de otras proteínas, sin embargo la producción estatal solamente cubre el 5 % de la demanda, lo que exige la importación de miles de toneladas del grano.

Dentro de las principales problemáticas agronómicas en la producción se encuentran las pérdidas por el ataque de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Este hongo fitopatógeno del suelo que causan pudriciones en las raíces, puede transmitirse por semilla, así como mediante esclerocios y micelio transportado por semillas

agámicas de diferentes cultivos, suelo, restos de cosecha, implementos agrícolas y por el mismo hombre. La viabilidad de los esclerocios depende del suelo y las condiciones en que se encuentren. También ataca las posturas en los semilleros durante la germinación o posteriormente, causando lesiones en la base de los hipocotilos de las plántulas, como hundimiento, ablandamiento y decoloración de la corteza cerca de la línea del suelo. El proceso ocurre bajo un rango bastante amplio de condiciones, aunque una humedad del suelo entre un 60 y un 70% y temperaturas de 25-30 °C representa las condiciones ideales que puede ocasionar pérdidas entre 60 y 70% a la cosecha (González, 2007).

Para disminuir las afectaciones producidas por este hongo se realizan aplicaciones de fungicidas, así como diferentes prácticas

agronómicas como son, el empleo de variedades resistentes, el manejo de la época de siembra, uso adecuado de la fertilización y el riego, alternativas de control biológico, entre otras. El empleo de nuevos métodos biológicos en la agricultura sostenible es de vital importancia para inhibir el desarrollo de los hongos fitopatógenos del suelo reduciendo la contaminación ambiental.

Teniendo en cuenta lo anterior se propuso como objetivo del trabajo determinar la influencia de organismos antagonistas y el Chitoplant® en las semillas de frijol común afectadas por *Sclerotium rolfsii* Sacc, así como en la morfofisiología del cultivo.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Básica de Producción Cooperativa (UBPC) "Roberto Rodríguez" ubicada en la carretera a Camajuaní Km 5¹/₂, perteneciente al Complejo Agroindustrial (CAI) "Heriberto Duquesne" de la provincia Villa Clara, en un suelo Pardo sialítico con carbonato (Hernández *et al.*, 1999).

Las variables climáticas, durante el período de la realización de las evaluaciones, fueron registradas en la Estación Meteorológica del "Yabú". Para todos los tratamientos se emplearon semillas de frijol de la variedad BAT- 482 (Blanca), registrada en el Listado Oficial de Variedades Comerciales. (MINAGRI, 2007). Los tratamientos de las semillas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad

Central "Marta Abreu de Las Villas" (UCLV), y consistieron en la peletización con bacterias y el hongo. Para ello se activaron las cepas y luego se inoculó la zeolita utilizando almidón de yuca al 8% como material adherente y se secó durante 48h para ser sembradas. Para el caso del producto Chitoplant® se empleó el método por inmersión. Se realizaron dos réplicas por tratamiento.

Tratamientos:

1. Control absoluto (semillas sin tratar).
2. *Burkholderia cepacia* (cepa CCIBP556W) procedente del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), con una dosis de 4.6×10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colonias). El método de aplicación fue peletización de las semillas.
3. *Bacillus subtilis* (cepa ATCC 6051) procedente del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent, Bélgica con una dosis de 1.8×10^8 UFC. El método de aplicación fue peletización de las semillas.
4. *Pseudomonas aeruginosa* (cepa 7NSK2) procedente del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Ciencias Biológicas Aplicadas de la Universidad de Gent, Bélgica con una dosis de 1.7×10^8 UFC. El método de aplicación fue peletización de las semillas.
5. *Pseudomonas fluorescens* (cepa CMR12) procedente del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Ciencias Biológicas

Aplicadas de la Universidad de Gent, Bélgica con una dosis de 5.6×10^9 UFC. El método de aplicación fue peletización de las semillas.

6. *Trichoderma viride* (cepa TS-85) procedente del Laboratorio de Microbiología Agrícola de la FCA con una dosis de 1.2×10^9 UFC. El método de aplicación fue peletización de las semillas.
7. Chitoplant® (Quitosana 99,9%) al 0,1%. El método de aplicación fue inmersión de las semillas durante 1 hora.
8. Testigo estándar Tetrametil Tiuram Disulfuro (TMTD 80% PH) a una dosis de 3g/L. El método de aplicación fue inmersión de las semillas durante 10 minutos.

La siembra del cultivo se realizó en parcelas de 0.45 x 0.07 m, en un diseño de bloques al azar. El cultivo se mantuvo en condiciones de secano, no se aplicaron fertilizantes, ni se emplearon químicos para el control de plagas y enfermedades. Las atenciones culturales consistieron en el control mecánico de malezas.

Efecto de los tratamientos de las semillas en las afectaciones producidas por *S. rolfsii*

Se realizaron evaluaciones semanales y las muestras de plantas afectadas se colectaron en sobres de cartón o papel y se llevaron al Laboratorio de Fitopatología perteneciente al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) para la identificación del agente causal.

Efecto de los tratamientos sobre la morfofisiología del cultivo

Se evaluaron cinco plantas por réplica al azar en los surcos intermedios los siguientes parámetros:

- Altura. Se realizó a los 20, 30, 45 días
- Área foliar. Se realizó por el método del factor (0.73) en la fase de floración.
- Peso fresco y peso seco de raíz, tallo y hoja a inicios de floración.

Se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion v.15 Romano 2006 sobre Windows. El procesamiento estadístico de los datos consistió en la realización de análisis de ANOVA simple, prueba de Duncan y comparación de proporciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de los tratamientos de las semillas en las afectaciones producidas por *S. rolfsii*

Todos los tratamientos estudiados disminuyeron la incidencia de *S. rolfsii* con diferencias estadísticas en comparación con el control absoluto (Figura 1), destacándose el TMTD 80% PH y *T. viride* con los valores más bajos de infestación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fajardo, (2008), puesto que obtuvo una reducción en la incidencia de este hongo con tratamientos en las semillas de frijol con *P. fluorescens*, *B. subtilis*, TMTD 80% PH y Chitoplant al 0.1%.

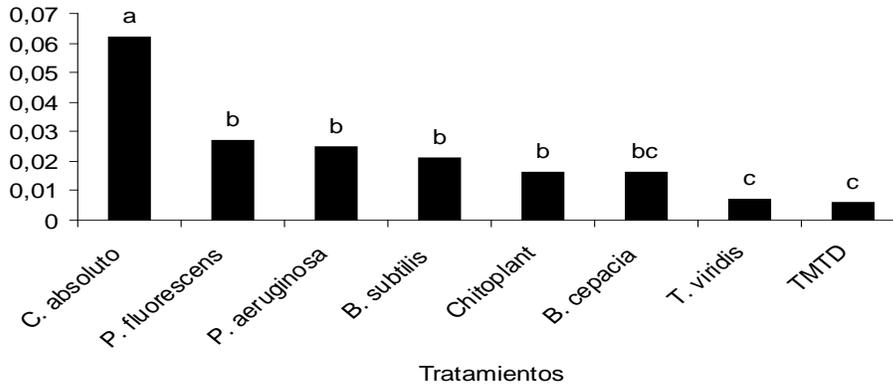


Figura 1. Proporción de infestación de *S. rolfsii*. Letras desiguales difieren por comparación de proporciones.

Autores como Butt *et al.* (1999) refieren que el tratamiento de las semillas con *B. subtilis* protege a las plantas contra patógenos de las raíces. Miguel *et al.*, (2000) obtuvieron una disminución de la incidencia de hongos del suelo en el cultivo del arroz utilizando esta bacteria como antagonista.

Lacha *et al.* (1996) destacan la actividad antagonista de *P. fluorescens* frente a un espectro amplio de hongos del suelo. Villa *et al.*, (2001) reportan a *P. aeruginosa* como otra especie del género *Pseudomonas* empleada como antagonista reduciendo la afectación por hongos fitopatógenos en cultivos como tabaco, papa y tomate. Según Deacon (2006), *T. harzianum* exhibe una fuerte competencia rizoosférica, pues es capaz de colonizar todo el sistema radical y persistir durante todo el desarrollo del cultivo coincidiendo con estos resultados donde otra especie de este género resultó ser el mejor en la inhibición del crecimiento de *S.rolfsii*.

Efecto de los tratamientos sobre morfofisiología del cultivo.

En la Tabla 1 se muestra el comportamiento de la altura del cultivo, donde se destaca que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos durante los primeros 20 días. A partir de los 30 días se observa que las semillas tratadas con Chitoplant tienen un crecimiento significativamente inferior a los demás tratamientos. Los tratamientos con bacterias no tuvieron diferencias con el control absoluto y el TMTD 80% PH. Pasados 45 días de la siembra se encontró que el Chitoplant tuvo un crecimiento significativamente menor al TMTD 80% sin mostrar diferencias en comparación con el control absoluto. El tratamiento con TMTD 80% PH fue el que mayor altura presentó, aunque no difiere estadísticamente de los tratamientos con medios biológicos.

Tabla1. Altura del cultivo en diferentes momentos de su desarrollo y área foliar a inicios de floración. Letras desiguales en una misma columna difieren según Duncan para $p \leq 0.05$.

Tratamientos	*20 días (cm)	*30 días (cm)	*45 días (cm)	Área foliar (dm ²)
C. absoluto	6.25 ab	20.5 ab	25.3 bc	524,52 b
<i>B. cepacia</i>	7.35 ab	21.5 ab	34.5 ab	507,373 b
<i>B. subtilis</i>	8.55 a	23.0 ab	34.2 ab	731,902 ab
<i>P. aeruginosa</i>	7.45 ab	20.0 ab	35.0 ab	635,068 ab
<i>P. fluorescens</i>	8.30 a	24.5 a	36.7 ab	828,24 ab
<i>T. viride</i>	8.33 a	18.0 ab	30.6 ab	809,452 ab
Chitoplant	7.40 ab	15.5 c	25.4 bc	445,15 b
TMTD 80% PH	8.15 a	20.0 ab	40.6 a	1001,64 a
EE (±)	0.51	0.66	0.89	0.41
CV (%)	21.51	15.98	22.2	21.3

*Días contados a partir de la siembra.

Estos resultados coinciden con los mostrados por Hernández y Montiel, (2003) donde reportan a estas bacterias como estimuladoras del crecimiento. Ferreira *et al.* (1991) demostraron que *B. subtilis*, es capaz de estimular el crecimiento vegetal. Fajardo (2008) no obtuvo diferencias estadísticas entre semillas sin tratar y semillas tratadas con *P. fluorescens*, *B. subtilis*, TMTD 80% PH y Chitoplant al 0.1%, pero sí destaca que los medios biológicos estimularon el crecimiento en comparación con el testigo.

La Tabla 1 muestra como las bacterias excepto *B. cepacia* estimularon el área foliar en comparación al control absoluto e inferiores al TMTD 80% PH, aunque no hubo diferencias estadísticas. Los resultados del tratamiento con TMTD 80% PH fueron estadísticamente superiores en relación con

los resultados obtenidos con *B. cepacia* y Chitoplant.

P. fluorescens tiene acción como promotora del crecimiento de las plantas según Lacha *et al.*, (1996). Leifert *et al.* (1994) señalan que algunas cepas de *Pseudomonas* producen hormonas reguladoras de crecimiento vegetal como etileno, auxina y citoquinina y que estas sustancias ejercen su efecto a muy bajas concentraciones.

Efecto sobre el peso fresco y seco de los órganos de la planta.

En la Tabla 2 se muestra la determinación del peso fresco y seco de los órganos de la planta. En el peso fresco de las hojas los organismos antagonistas, excepto *B. cepacia*, muestran diferencias significativas con el control absoluto y Chitoplant. Todos los

tratamientos con bacterias y *T. viride* tuvieron un peso fresco estadísticamente igual al TMTD 80% PH y el mejor resultado se obtuvo con *P. fluorescens*. El tratamiento con TMTD 80% PH fue significativamente superior al tratamiento con Chitoplant. La evaluación del peso seco de la hoja mostró que los tratamientos con TMTD 80% PH y *P. fluorescens* tuvieron un peso mayor en comparación con *B. cepacia*, control absoluto y Chitoplant. Los tratamientos con *T. viride*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* no tuvieron diferencia con el TMTD 80% PH.

Los valores de peso fresco del tallo (Tabla 2) muestran que TMTD 80% PH y *P. fluorescens*

tuvieron un peso significativamente superior al obtenido por el control absoluto y Chitoplant. Los tratamientos con las bacterias y *T. viride* no mostraron diferencias estadísticas con el TMTD 80% PH y el control absoluto. En los resultados del peso seco se obtuvieron diferencias estadísticas entre los tratamientos. El TMTD 80% PH fue el tratamiento que mayor peso seco presentó, siendo significativamente superior a los demás tratamientos con excepción de las bacterias del género *Pseudomonas*. Los tratamientos con medios biológicos y el producto natural no tuvieron diferencias estadísticas en comparación con el control absoluto.

Tabla 2. Peso fresco (P.f) y peso seco (P.s) de los órganos. Letras desiguales en una misma columna difieren según Duncan para $p \leq 0.05$.

Tratamientos	Hoja		Tallo		Raíz	
	P.f	P.s	P.f	P.s	P.f	P.s
<i>P. fluorescens</i>	271 a	35.94 a	77.5 a	15.98 ab	11.5 cd	3.27 a
TMTD 80% PH	259 ab	35.7 a	85.5 a	19.37 a	12.0 ab	3.27 a
<i>T. viride</i>	221 ab	29.62 ab	62.0 ab	11.31 bc	7.5 cd	1.77 ab
<i>P. aeruginosa</i>	209 ab	33.43 ab	61.5 ab	12.28 abc	8.5 cd	2.35 ab
<i>B. subtilis</i>	194 ab	27.06 ab	57.5 ab	10.89 bc	15.0 a	2.82 ab
<i>B. cepacia</i>	170 bc	23.01 bc	50.5 ab	8.57 bc	7.0 d	1.87 ab
C. absoluto	144 c	19.65 bc	38.5 b	7.96 bc	7.0 d	1.74 ab
Chitoplant	137 c	16.99 bc	37.0 b	5.45 c	5.5 d	1.4 ab
EE (±)	6.18	2.34	4.49	1.25	0.89	0.22
CV (%)	32.25	33.39	34.01	43.8	38.33	37.9

Las mayores diferencias estadísticas se encontraron en el peso fresco de la raíz (Tabla 2), donde *B. subtilis* y TMTD 80% PH fueron los mejores tratamientos con diferencias estadísticas en comparación con los demás tratamientos. Los resultados de los tratamientos con los organismos antagonistas y sustancias naturales no difirieron estadísticamente del control absoluto, pero se observa un estímulo en el peso fresco de la raíz por parte de las bacterias y *T. viride*. En los valores del peso seco mostrados en la Tabla 2 no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, aunque los tratamientos con las bacterias, *T. viride* y TMTD 80% PH tuvieron valores superiores al control absoluto y al Chitoplant.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sharman *et al.* (1998) donde estas bacterias estimularon el crecimiento de las plantas, indujeron nuevos cambios de desarrollo y aumentaron la resistencia a bajos niveles de concentraciones de microorganismos.

Hernández *et al.* (2003) señalan que un factor importante por el cual las rizobacterias ayudan a las plantas, es por la existencia de ciertas especies que las hacen nutrirse mejor; por ejemplo, *Pseudomonas* sp., que al solubilizar algunos nutrientes poco móviles del suelo, como el fósforo, mejora el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que

se traduce en una mayor cantidad de biomasa.

CONCLUSIONES

- El tratamiento de las semillas con organismos antagonistas y Chitoplant redujo las afectaciones de *S. rolfisii* en condiciones de campo.
- Los tratamientos con organismos antagonistas estimularon el desarrollo morfo-fisiológico del cultivo, no siendo así con la sustancia natural.

RECOMENDACIONES

- Evaluar los tratamientos hasta el rendimiento para poder seleccionar el mejor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Butt, T.M; Raíz, J. G. y Powell, K. A (1999): Microbial biopesticides: The European scene. En: Biopesticides. Use and delivery". F. R Hill &J. J. Menn (Eds.) Humana Press: 23-24.
- Deacon J (2006): Fungal interaction: mechanisms and practical exploitation. In: Fungal Biology- 4th ed.
- Fajardo, Clara Elena. (2008): Alternativas de control de hongos fitopatógenos del suelo en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) TGC; Msc. en Agricultura Sostenible (CA) 55h.
- Ferreira, J. H; Mather, F. Y Tomas, A. C. (1991): Biological control of *Eutypa lata*

- grapevine by and antagonistic strain of *Bacillus subtilis*, *Phytopathology*. 81:283-287.
- González Martínez, Disley (2007): Microflora patógena en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y habichuela (*Vigna unguiculata sesquipedalis*), su efecto en la germinación, y su control. Trabajo de diploma en opción al título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias .UCLV.
- Hernández, L. y Montiel, A. (2003): Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Revista de divulgación científico tecnológica de la Universidad de Veracruz. 16(1).
- Lacha, G. S; Singh, R. P. Y Verna, J. P. (1996): Role of growth promoting Plants. Cereals, Pulses, Oilseeds and crops. Int'l Book and Periodical, New Delhi, India, 2:233-241.
- Leifert, C; Morris, C. E. y Waites, W. M. (1994): Ecology of microbial saprophytes and pathogen in tissue culture and field-growth plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical review in plant sciences*, 13(2): 139-183.
- Armanfo, J; Rosas, U; Ramírez, C; Ulloa, B. E. (2011): El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente, 3(8): 1-5.
- Miguel, A; torres, L. A; Bonilla, Tania y Amat, Zenaida. (2000): Estudios de biocontrol *in vitro* del hongo fitopatógenos *Sarocladium oryzae* con cepas de *Bacillus subtilis*. Fitosanidad un enfoque actual de la sanidad vegetal. Vol. (4), 34:65 – 68.
- MINAGRI. (2007): Listado Oficial de Variedades Comerciales.
- Sharman, V. K. Nowark, J. (1998): Verticillium wilt supresión in tomato wilt *Pseudomonas bacterium*. Can. J. Microbial.
- Villa, Pilar; Días de Villegas, María Elena; Stefanova, Marusia y Michelena, Gergina. (2001): Proceso biotecnológico para la producción de un fungicida a partir de *Pseudomonas* sp. Cepa PSS, con fines fitosanitarios. RAAA, Lima, Perú: 65 – 74.

Fecha recibido: 15 de octubre de 2013.

Fecha aceptado: 18 de diciembre de 2014.