

# AISLAMIENTO DE AGENTES SUPRESORES A *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith, EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum*)<sup>1</sup>

Jorge M. Cartín<sup>2</sup>, Amy Wang<sup>3</sup>

## RESUMEN

**Aislamiento de agentes supresores a *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith en tomate (*Lycopersicon esculentum*).** Se recolectaron tres muestras de suelo de la zona alta de Cartago (Cipreses, Pacayas y Tierra Blanca) Costa Rica, las cuales se colocaron en bandejas individuales y se sembraron, en cada una de ellas, 50 semillas de tomate de la variedad Hayslip. Después de 40 días, se inocularon con *Pseudomonas solanacearum*. Dos semanas después de la inoculación, se incorporaron al suelo tanto plantas sanas como enfermas, y se dejaron en descomposición por 12 días con el fin de permitirle a la bacteria establecerse en el suelo. Transcurrido este período, se procedió a sembrar, en cada bandeja, 70 semillas de tomate. Luego de 42 días, las plantas fueron inoculadas por inundación con una suspensión de 103 UFC/ml de la bacteria fitopatógena. Las plantas sobrevivientes fueron nevasdas al laboratorio y se desinfectaron; se tomaron trozos de la base del tallo, se les eliminó la epidermis y se colocaron en tubos de ensayo con agua estéril por 90 minutos. Seguidamente, se incubaron por 48 horas a 28 (2 C. De las bacterias que crecieron, se determinó su efecto antagónico sobre *P. solanacearum*. De las 22 bacterias, que se obtuvieron inicialmente, 12 presentaron efecto antagónico sobre *P. solanacearum*. Se cree que el efecto se pudo deber a la presencia de sustancias antibióticas.

## ABSTRACT

**Isolation of suppressing agents of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith in tomato (*Lycopersicon esculentum*).** Three soil samples were collected at the highlands of Cartago (Cipreses, Pacayas and Tierra Blanca) Costa Rica and were placed in individual trays. Then, 50 seeds of tomato variety Hayslip were sown in each tray. After 40 days, plants were inoculated with a *Pseudomonas solanacearum*. Two weeks after the inoculation, healthy and diseased plants were incorporated and left to decompose for 12 days, in order to allow establishment of the bacteria in the soil. Then, 70 seeds were sown in each tray. After 42 days, plants were inoculated by inundation with a suspension of 103 CFU/ml of *P. solanacearum*. Surviving plants were taken to the laboratory and disinfected; cuts were made at the base of the stems, then the epidermis was removed and cuts were placed in test tubes containing sterile water for 90 minutes. The Petri dishes were then incubated for 48 hours at 28°C. From the growing bacteria, antagonism on *P. solanacearum* was evaluated by scratching Petri dishes with each bacteria over same medium already described. Out of 22 bacteria originally obtained, 12 showed antagonism on *P. solanacearum*. Antibiotic substances might be involved in this process.



## INTRODUCCIÓN

El desarrollo del tomate se ve limitado por varias plagas y enfermedades que obligan al agricultor a implementar medidas de combate de alto costo, con el consecuente deterioro del ambiente. Los problemas son mayores para enfermedades en donde no existe un combate químico efectivo y el combate cultural no es utilizado (Vargas, 1995). Este es el caso de la marchitez bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum*, considerada como una de las enfermedades más importantes de las solanáceas en general, y se encuentra ampliamente distribuida en Centro y Sur América (CIP,

1984; Alonso y Palma, 1985; Monterroso y Pareja, 1985; Pinochet, 1985; Lastra y Meneses, 1986; Monterroso y Bustamante, 1986; Meneses *et al.*, 1990).

En Costa Rica, los suelos paperas de la zona alta de Cartago, dejaron de manifestar la marchitez en este cultivo a inicios de los años 80. Entre las hipótesis de lo que sucedió, están el desarrollo de organismos antagónicos a *P. solanacearum*, que son los causantes de esta supresividad, así como el inicio de un programa de certificación de semillas, que pudo haber ayudado igualmente a la desaparición casi total de la enfermedad en esta zona (Vargas, 1995).

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Parte de la tesis de grado de Lic. en Ing. Agr. con énfasis en Fitotecnia, Universidad de Costa Rica.

<sup>2</sup> Cyanamid de Costa Rica.

<sup>3</sup> Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

Los objetivos de este trabajo fueron aislar agentes supresores de *P. solanacearum* a partir de suelos papeiros y comprobar in vitro, su efecto antagonístico sobre *P. solanacearum* aislado de tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de *Pseudomonas solanacearum*

Se utilizaron aislamientos de *P. solanacearum* raza 1 (Astúa, 1995), provenientes de la colección del Departamento de Manejo Integrado de Plagas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Las bacterias se mantuvieron en tubos de ensayo con agua de lluvia estéril durante el desarrollo de las pruebas pues se ha encontrado que perduran muy bien en este medio (Vargas, 1994).

Para multiplicar artificialmente la bacteria, se seleccionó el medio de Kclman (1954) o de cloruro de tetrazolio (TZC), el cual es muy utilizado para aislar e identificar a bacterias del género *Pseudomonas* entre otras.

### Muestreo de suelo

En 1996, en Tierra Blanca, Cipreses y Pacayas de Cartago, Costa Rica, donde la marchitez bacteriana dejó de manifestarse y ser problema para los agricultores de papa (Vargas, 1994), se tomaron 10 submuestras de suelo a una profundidad de 15 - 20 cm, para obtener una muestra compuesta por localidad. En todos los casos, los terrenos estaban sembrados con papa en estado de prefloración.

### Pruebas de laboratorio

#### *Aislamiento de agentes supresores*

Las muestras de suelo se colocaron separadamente en bandejas plásticas de 13 x 24 x 31 cm que se mantu-

vieron en los invernaderos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica. En cada una de las bandejas se sembraron 50 semillas de tomate variedad Hayslip, la cual es susceptible de *P. solanacearum* y muy utilizada por los agricultores nacionales (Saborío, 1993).

A los 40 días después de la siembra, se inocularon la" plantas de tomate. La inoculación se realizó inyectando, mediante una aguja hipodérmica de un ml, una gota de una suspensión de bacterias de  $10^8$  UFC/ml (determinada con tubos de McFarland), en la axila de una de las hojas cotiledonales. En aquellas plantas que carecían de éstas, se inyectó en la axila de la primera hoja basal. Dos semanas después de la inoculación, se incorporaron al suelo tanto las plantas que presentaron la marchitez como aquellas sanas, con el fin de permitirle a la bacteria establecerse en el suelo, en este período se mantuvo húmedo el suelo. Una vez descompuesto este material (unos 12 días), se sembraron 70 semillas de tomate variedad Hayslip y 42 días después se realizó, a la mitad de las plantas de cada bandeja, heridas en las raíces con la ayuda de un bisturí, para luego proceder a inocularlas, mediante inundación, con 1.750 ml de una suspensión de bacterias de  $10^3$  UFC/ml.

Dos semanas después, se recolectaron, de cada bandeja, cuatro plantas provenientes del tratamiento con heridas en la raíz y cuatro sin heridas. A dichas plantas se les desinfectó la base de tallo y se tomó un trozo de aproximadamente seis centímetros, el cual se introdujo en la cámara de transferencias en donde se le eliminó la epidermis y se colocó dentro de un tubo de ensayo con agua destilada estéril durante 90 minutos. Luego se agitó el tubo y se inocularon platos Petri con los medios de tetrazolio (TZC) y agar nutriente (AN) (Figura 1). Para cada medio de cultivo se utilizaron dos repeticiones. Se incubaron durante 48 horas a  $28 \pm 2$  C. Al cabo de este período se reprodujeron todas aquellas bacterias que crecieron y se mantuvieron en tubos de ensayo con agua de lluvia estéril a temperatura ambiente.

#### *Prueba de antagonismo in vitro*

Se procedió a rayar sobre TZC y AN todas aquellas bacterias aisladas en la sección anterior, pasando el asa únicamente por el centro del plato de Petri y se incubaron

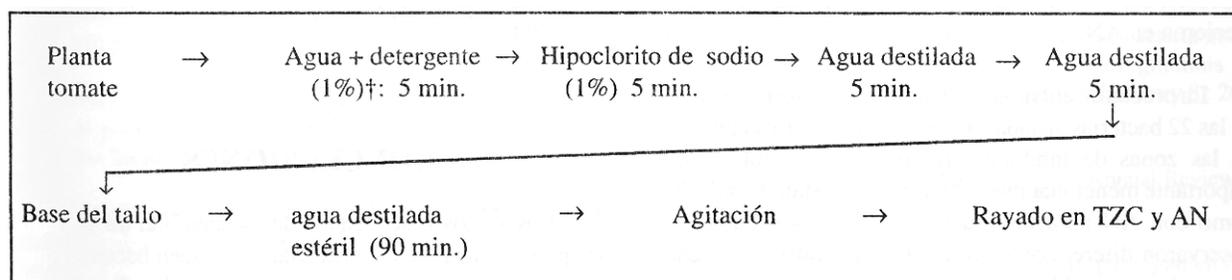


Fig. 1. Proceso de desinfección de plantas de tomate y aislamiento de organismos antagonistas.

durante 48 horas a  $28 \pm 2$  C. Para cada bacteria se contó con tres repeticiones por medio de cultivo. Transcurrido este período, se retiraron las tapas de los platos y los cultivos se expusieron, durante dos horas, a vapores de cloroforno dentro de una cámara plástica herméticamente cerrada. Posteriormente, cada plato se asperjó con una suspensión de *P. solanacearum* de  $10^8$  UFC/ml y se incubaron nuevamente los platos durante 24 horas a  $28 \pm 2$  C. Finalmente, se determinó el efecto antagonista de las bacterias aisladas sobre *P. solanacearum* por la presencia de zonas en las cuales no existió crecimiento de la bacteria fitopatógena.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el aislamiento de los agentes supresores, las plantas de tomate fueron inoculadas con *P. solanacearum* mediante la técnica de inundación, sin embargo, ninguna de ellas presentó síntomas de marchitez, por lo que las cuatro plantas provenientes del tratamiento con heridas en la raíz así como en el que no se practicaron, fueron tomadas al azar. Si bien era de esperar que se presentaran plantas con síntomas, esto no se dió. Ciampi, *et al.* (1987) lograron un 30% de infección al utilizar una concentración de  $10^3$  UFC/ml, mientras que al utilizar concentraciones superiores obtuvieron casi un 100% de plantas enfermas, lo cual no era deseable para fines del experimento, ya que se necesitaba de material vivo para efectuar los aislamientos requeridos. Una vez realizado el proceso de desinfección de la porción basal, se eliminó la epidermis, con el fin de buscar organismos ubicados en los tejidos internos de las plantas y de esta forma eliminar al máximo la contaminación con otros organismos, ya que en la rizosfera existe una alta población microbiana que no está involucrada directamente con la resistencia de las plantas de tomate a *P. solanacearum*. Mediante este mismo procedimiento, Bustamente y Ciampi (1989) lograron aislar organismos antagónicos a *P. solanacearum* a partir de tejidos internos de plantas de papa. En nuestro caso, a las 48 horas de incubación se logró observar, en unos pocos platos, colonias de bacterias. Estas estaban presentes tanto en el caso de plantas a las cuales se les había hecho heridas, como a las que no se les practicó este procedimiento. Así mismo, se pudo aislar bacterias tanto en el medio de TZC como en AN, aunque en el caso de Cipreses, existió una mayor proporción de bacterias que crecieron en AN.

La prueba de antagonismo *in vitro* fue positiva para 12 de las 22 bacterias aisladas de los tres suelos. Los tamaños de las zonas de inhibición fueron muy variables. Es importante mencionar que si bien se trabajó tanto con TZC como con AN para las pruebas de antagonismo, no se observaron diferencias entre medios de cultivo para una misma bacteria. Algunas de ellas no ejercieron ningún efecto sobre *P. solanacearum*, lo que hace pensar

que en los tejidos internos de las plantas de tomate hay microorganismos que forman parte de la flora microbiana y cuyo papel no está totalmente claro (Ciampi, 1981).

En la prueba de antagonismo *in vitro*, las bacterias aisladas fueron expuestas a vapores de cloroformo con el fin de matar las células bacterianas y de esta forma, su contenido fuera liberado, para luego evaluar si existía algún efecto antagonista sobre *P. solanacearum*. El efecto antagonista se observó 24 horas después en cinco bacterias aisladas de plantas sembradas en suelo de Cipreses, tres de Pacayas y cuatro de Tierra Blanca (Cuadro 1). Vidaver (1983) indica que ésta es una forma sencilla de comprobar la presencia de bacteriocinas en organismos productores de las mismas. Por tanto, se puede decir que el efecto antagonista observado sobre *P. solanacearum* podría deberse a bacteriocinas producidas por las bacterias aisladas. No obstante, para ser denominadas bacteriocinas, los organismos productores de las mismas tienen que ser *P. solanacearum*. El mismo autor también menciona que la producción de estas sustancias es muy influenciada por ciertas condiciones como medio de cultivo y temperatura así como por el estado de crecimiento del organismo productor. Por lo cual, si el efecto antagonista observado en este experimento, se debiera a la presencia de bacteriocinas, sería estrictamente bajo las condiciones empleadas en el mismo.

Debido a que se desconoce el o los géneros a los cuales pertenecen las bacterias aquí aisladas, es mejor considerar que el efecto antagonista es causado por sustancias antibióticas. Sin embargo, no se puede descartar que también actúen como estimuladores del sistema de defensa de las plantas, por ejemplo de las fitoalexinas (Kempe y Sequeira, 1983; Agrios, 1991) o tal vez éste sea el papel de las bacterias que no presentaron, *in vitro*, efecto inhibitorio sobre *P. solanacearum*.

En otros países se conoce experimentalmente que los suelos pueden llegar a ser supresivos al introducir organismos que presenten efectos antagónicos sobre un determinado patógeno, siempre y cuando las condiciones sean adecuadas para la sobrevivencia de los mismos (Hornby, 1983; Cook y Rovira, 1976; Scher y Baker, 1982). La presencia de estos organismos antagónicos en los suelos de Cartago y el efecto protector dentro de las plantas constituyen posibles factores causantes de la supresión de la marchitez bacteriana, aunque también pueden influir la temperatura y la altitud.

## CONCLUSIONES

Los suelos muestreados de la zona alta de Cartago (Cipreses, Pacayas y Tierra Blanca) poseen bacterias que presentan un efecto antagonista *in vitro* sobre *Pseudomonas solanacearum*.

**Cuadro 1.** Algunas bacterias aisladas de plantas de tomate sembradas en suelo procedente de Cipreses, Pacayas y Tierra Blanca, medios de cultivo en los cuales fueron aislados así como el efecto antagonista *in vitro* sobre *Pseudomonas solanacearum*.

Procedencia	Tratamiento	Planta número	Medio de cultivo	Antagonismo
Cipreses	Con heridas	4	TZC	Si
	Con heridas	4	AN	Si
	Sin heridas	3	AN	Si
	Sin heridas	1	AN	Si
	Sin heridas	2	AN	No
Pacayas	Con heridas	3	TZC	Si
	Sin heridas	2	AN	No
	Sin heridas	4	AN	Si
	Sin heridas	4	TZC	Si
Tierra Blanca	Con heridas	3	AN	Si
	Con heridas	4	TZC	No
	Sin heridas	4	TZC	No
	Sin heridas	4	AN	Si
	Con heridas	1	TZC	No
	Con heridas	1	AN	No
	Sin heridas	1	TZC	Si
	Sin heridas	1	AN	Si

El efecto antagonista sobre *Pseudomonas solanacearum* de estas bacterias se podría deber a la producción de sustancias antibióticas.

Es posible que la supresividad de estos suelos pueda deberse, en un alto porcentaje, a la presencia en el suelo de estas bacterias y al efecto antagonico.

La inoculación de bacterias por medio de inundación no parece ser el mejor método para evaluar el efecto antagonico a nivel de invernadero.

## LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. 1991. Fitopatología. 4 ed. México, LIMUSA. 530 p.
- ALONSO, F.; PALMA, M. 1985. Diagnóstico parasitológico preliminar de los principales cultivos de El Salvador. San Salvador. CATIEICENT A. 23 p.
- ASTÚA, G. 1995. Comunicación personal. Universidad de Florida. Florida, Estados Unidos.
- BUSTAMANTE, P.; CIAMPI, L. 1989. Control biológico de la marchitez bacteriana de la papa (*Solanum tuberosum*) inducida por *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. Revista de Microbiología 20 (1): 18-26.
- CIAMPI, L. 1981. Bacterias fitopatógenas y el nicho degradativo. Fitopatología 16 (1): 20-27.
- CIAMPI, L.; BUSTAMANTE, P.; POLETTE, M. 1987. Isolation of soil bacteria with inhibitory activity to *Pseudomonas solanacearum*. In: Plant Pathogenic Bacteria. The Netherlands, Nijhoff Publishers. p. 733-739.
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1984. Marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la papa en América Latina. Lima, Perú, CIP. 120p. Citado por: BUSTAMANTE, P.; CIAMPI, L.; GUAQUIL, V. 1989. Inhibición *in vitro* de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith utilizando la cepa antagonista BC8 de *Pseudomonas fluorescens*. Rev. Microbiol. 20 (1): 27-33.
- COOK, R.; ROVIRA, A. 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. Soil Biology and Biochemistry 8: 269-273.
- HORNBY, D. 1983. Suppressive soils. Annual Review of Phytopathology 21: 65-85.
- KELMAN, A. 1954. The relation of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on the tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.

- KEMPE, J.; SEQUEIRA, L. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease* 67:499-503.
- LASTRA, R.; MENESES, R. 1986. Inventario de plagas y enfermedades de Costa Rica. San José, C.R. CA TIE. (Serie Técnica. Informe técnico N° 8). 30p.
- MENESES, R.; MOREIRA, M.; JIMENEZ, J.; BUSTAMANTE, E. 1990. Respuesta de líneas de tomate de mesa a *Pseudomonas solanacearum* en época de invierno en Costa Rica. *Turrialba* 40(2): 222-228.
- MONTERROSO, D.; BUSTAMANTE, M. 1986. Aspectos generales del desarrollo agrícola y principales problemas fitosanitarios de los principales cultivos de la República de Honduras. CA TIE/MIP, Tegucigalpa (Serie Técnica. Informe Técnico N 128). 61 p.
- MONTERROSO, D.; PAREJA, M. 1985. Inventario de los problemas fitosanitarios de los principales cultivos de la República de Guatemala. CATIE, Guatemala. 54p.
- PINOCHET, J. 1985. Inventario de plagas y enfermedades de Panamá. CA TIE, Panamá (Serie Técnica. Informe Técnico N 70). 18 p.
- SCHER, J.; BAKER, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72 (12): 1567-1573.
- VARGAS, E. 1994. Comunicación personal. Laboratorio de Fitopatología, Universidad de Costa Rica.
- VARGAS, E. 1995. Comunicación personal. Laboratorio de Fitopatología, Universidad de Costa Rica.
- VIDAVER, A. 1983. Bacteriocins: the lure and the reality. *Plant Disease* 57 (5): 471-475.