

# Aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento para el control de *Damping off* en bandejas flotantes

Virginia Balanza, Catalina Egea-Gilbert, Diana Niñirola, Juan A. Martínez, Juan A. Fernández.  
 Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena.  
 30203 Cartagena, Murcia.  
 E-mail: virgibalanza@hotmail.com

**Resumen.** El objetivo de este trabajo fue utilizar rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) para el control de *Rhizoctonia solani* en cultivos de lechuga en bandejas flotantes. Para ello, se realizó un ensayo de escrutinio *in vivo* en el que se inoculó el sustrato y las semillas con *B. subtilis* en una concentración de  $5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> y Larminar en una concentración de 100 g de producto en 100 mL de agua destilada con una riqueza de  $1,7 \cdot 10^9$  UFC L<sup>-1</sup>, evaluando en el momento de la cosecha los parámetros de crecimiento aéreo y radicular, así como la concentración de la bacteria durante el ciclo de cultivo en las raíces mediante PCR cuantitativa. Los métodos más eficaces de inoculación fueron los de inoculación directa tanto de las semillas como del sustrato con Larminar y *B. subtilis*. Una vez optimizado el método de inoculación, se realizó un segundo ensayo de escrutinio de control biológico de *R. solani* con *B. subtilis* y Larminar, en semillas y sustrato, mostrando valores similares de crecimiento tanto en la parte aérea como en la parte radical en plantas tratadas con bacterias y no inoculadas con el patógeno y en plantas tratadas con bacterias e inoculadas con el patógeno.

## 1. Introducción

La producción de plantas en cultivo hidropónico se puede ver afectada por enfermedades que perturban al crecimiento y la calidad del cultivo. El *damping off* es una de las más comunes causada por hongos como *Pythium* spp, *Phytophthora* spp y *Rhizoctonia solani* (Olsen y Young, 1998). En la actualidad, el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) es una buena herramienta de control biológico, ya que producen un beneficio sobre el crecimiento de las plantas debido a la capacidad que tienen para la represión de los agentes patógenos del suelo (Zehnder et al., 2000). De este modo, *B. subtilis* ha sido utilizada desde hace años en el control de la podredumbre producida por *Rhizoctonia* spp. (Broadbent et al., 1971). El objetivo de este trabajo fue optimizar el método de inoculación de diferentes cepas de PGPR en cultivo en bandejas flotantes de lechuga para el control de *R. solani*, así como establecer un método de cuantificación de las bacterias mediante PCR cuantitativa (Q-PCR).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Optimización del método de cuantificación de bacterias

Dos cepas de *Bacillus*, *B. subtilis* y *B. velezensis*, previamente identificadas en ensayos *in vitro* como controladoras, en más de un 80%, del crecimiento de *R. solani*, fueron usadas para la extracción de ADN con DNeasy Blood & Tissue kit (Quiagen). Dichos ADNs fueron sometidos a una PCR convencional usando como cebadores ATCC 6051A, ATCC 54405 y NRRL B-941 descritos por Providenti et al. (2009) para la identificación de *B. subtilis*. Una vez que se

obtuvieron bandas claras de amplificación se realizó una PCR cuantitativa (q-PCR), con los mismos cebadores a una temperatura de anillamiento de 60°C, con el Kit SYBR Green Premix Ex Taq (Takara). Por último, se realizó mediante q-PCR una curva estándar de cuantificación de *B. subtilis*.

### 2.2. Optimización del método de inoculación y cuantificación de PGPR

El material vegetal del ensayo fue lechuga tipo *baby leaf* var. Diveria. 480 semillas fueron desinfectadas con Domestos al 20% y se dispusieron en 6 placas Petri. Las inoculaciones se realizaron con semillas no germinadas y con semillas pregerminadas 48h por imbibición, durante 90 min, respectivamente, con: (1) 20 mL de un cultivo de *B. subtilis* puro ( $5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), (2) Larminar (100 g/100 mL y una riqueza en *B. subtilis* de  $1,7 \cdot 10^9$  UFC L<sup>-1</sup>) y (3) MgSO<sub>4</sub> (10 mM) como control. Posteriormente las semillas se dispusieron en bandejas styrofloat cuyo sustrato fue inoculado por riego directo previamente de distintas formas: (1) con 20 mL de *B. subtilis* puro ( $5 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), (2) con Larminar (100 g/100 mL) y (3) con agua (control). Las bandejas se trasladaron a una cámara a temperatura constante de 25°C (16 h luz, 8h oscuridad y 90% HR) y se depositaron en pequeñas balsas con solución nutritiva conteniendo los siguientes elementos en  $\mu\text{mol L}^{-1}$ : NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 7200; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 4800; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 2000; Ca<sup>+2</sup>, 2000; K<sup>+</sup>, 6000; Mg<sup>+2</sup>, 1500 y una mezcla de microelementos a una concentración 0,02 g L<sup>-1</sup> y quelato de hierro a una concentración 0,015 g L<sup>-1</sup>. En la recolección (21 días después de la germinación de las semillas de ambos tratamientos de inoculación) se midieron parámetros de crecimiento de la parte aérea y la parte radical. Los datos fueron sometidos a un estudio estadístico

bifactorial mediante el programa StatGraphic 2.1, utilizando un ANOVA con el test LSD (95%) para el cálculo del análisis de la varianza y de separación de medias.

La cuantificación de las bacterias se realizó a partir de 20 plántulas a los 7 y 14 días después de la germinación.

### 2.3. Estudio del control mediante PGPR de *R. solani* en bandejas flotantes

Las etapas del experimento fueron idénticas a las descritas anteriormente y los tratamientos de inoculación fueron los mismos para las semillas y el sustrato salvo que se utilizaron únicamente semillas inoculadas antes de la germinación y que *R. solani* fue inoculado en el sustrato a los 7 días después de la siembra.

## 3. Resultados y discusión

Los cebadores específicos de *B. subtilis* ATCC 6051A y ATCC 54405 amplificaron en PCR convencional con las muestras de ADN extraído de *B. subtilis* y *B. velezensis*. Las reacciones de q-PCR con el cebador ATCC 6051A permitieron distinguir las dos bacterias (Fig. 1), pero solo se pudo realizar la curva de calibrado para la cuantificación de *B. subtilis*, por lo que sólo se utilizó únicamente esta especie en los demás experimentos.

De los diferentes métodos de inoculación usados, los más eficaces fueron aquellos en los que la inoculación de la semillas se realizó antes de germinación con Larminar y *B. subtilis* en la propia semilla y en el sustrato (resultados no mostrados). La pregerminación de semillas antes de la inoculación

fue descartada por ser demasiado laboriosa y delicada para una futura aplicación en campo. Los resultados del ensayo de control biológico de *R. solani* con *B. subtilis* y Larminar, en semillas y sustrato, mostraron valores similares de crecimiento tanto en la parte aérea como en la parte radical en plantas tratadas con las bacterias y no inoculadas con el patógeno y en plantas tratadas con las bacterias e inoculadas con el patógeno (Tablas 1 y 2). Esto podría deberse a que *B. subtilis* y Larminar consiguieron controlar al patógeno. Sin embargo, Adesina et al. (2009) mostraron que la inoculación de *R. solani* junto con PGPR en lechuga, provocó la reducción de la biomasa aérea. La cuantificación de las bacterias a los 7 y 14 días después de la germinación se muestra en la Tabla 3, donde se aprecia un aumento de la concentración bacteriana con el tiempo.

## 4. Conclusión

Los cebadores específicos de *B. subtilis* ATCC 6051 y ATCC 54405 amplificaron en PCR convencional con las muestras de ADN extraído de *B. subtilis* y *B. velezensis*. De los diferentes métodos de inoculación usados, los más eficaces fueron aquellos en los que la inoculación de la semillas se realizó antes de germinación con Larminar y *B. subtilis* en la propia semilla y en el sustrato. Los resultados del ensayo de control biológico de *R. solani* con *B. subtilis* y Larminar, en semillas y sustrato, mostraron valores similares tanto en la parte aérea como en la parte radical. Esto puede ser debido a que *B. subtilis* y Larminar consiguieron controlar al patógeno o a un posible problema en la infección de la planta. En la cuantificación de bacterias, se apreció un aumento de la concentración bacteriana con el tiempo.

Tabla 1. Crecimiento aéreo y radicular de plantas de lechuga procedentes de semillas tratadas antes de la germinación con *B. subtilis* e inoculadas con *R. solani*. Inoculación de semillas (I.SE) con *B. subtilis* (*B.s*), Larminar (L) y control con MgSO<sub>4</sub> (C); Inoculación del sustrato (I.SU) con *B. subtilis* (*B.s*), Larminar (L) y agua (C); Inoculación con *R. solani* (*IR.s*), no inoculadas (NI) e inoculadas (I).

Tratamientos			Parte aérea			Parte radical			
I.SE	I.SU	I.	A.foliar	P.fresco	P.seco	Longitud	Área	Diámetro	Volumen
		<i>R.s</i>	(cm <sup>2</sup> /pl)	(g/pl)	(g/pl)	(cm/pl)	(cm <sup>2</sup> /pl)	(mm/pl)	(cm <sup>3</sup> /pl)
<i>B.s</i>	<i>B.s</i>	NI	102,4	3,1	0,2	115,4	8,9	0,8	0,5
	<i>B.s</i>	I	104	3,0	0,1	115,3	9,1	0,7	0,6
L	L	NI	93,9	3,0	0,1	92,3	6,8	0,7	0,5
	L	I	122,8	3,2	0,1	132,5	11,1	0,8	0,7
C	C	NI	91,3	2,8	0,1	125,2	9,7	0,8	0,5
	C	I	60,4	1,9	0,07	70,5	6,1	0,7	0,4



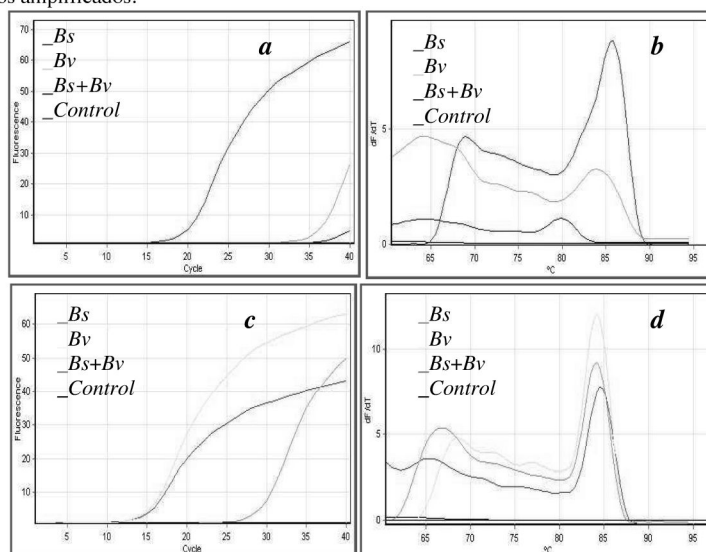
Tabla 2. Resultados estadísticos obtenidos para altura y número de hojas en plantas infectadas con *R. solani*. I: inoculaciones; IR: Inoculación *R. solani*.

Parámetros	Inoculaciones		Inoculación <i>R.solani</i>		I	IR	IxIR	
	Bacteria	Larminar	Control	Inoculadas				No inoculadas
Altura(cm)	15,5b	16,1b	12,8a	13,4a	16,2b	***	***	***
Nº hojas	5,9b	5,5b	4,2a	4,92a	5,49b	***	**	***

Tabla 3. Cuantificación de bacterias en raíces de lechuga a los 7 y 14 días después de los diferentes tratamientos de germinación de semillas (G.S): antes (N.G) y después de la germinación (P) y de inoculación de semillas (I.SE): con *B. subtilis* (*B.s*), Larminar (L) y control con MgSO<sub>4</sub>.

Tratamientos		Día 7	Día 14
G.S	I.SE	Nº bacterias (UFC/mL)	Nº bacterias (UFC/mL)
N.G	<i>B.s</i>	1,9x10 <sup>3</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>
	L	7,8 x10 <sup>3</sup>	2,6 x10 <sup>4</sup>
	C	0	0
P	<i>B.s</i>	7,4 x10 <sup>3</sup>	1,7 x10 <sup>4</sup>
	L	2,7 x10 <sup>3</sup>	5,1 x10 <sup>3</sup>
	C	0	0

Figura 1. PCR en tiempo real de ADN de *Bacillus* con el primer ATCC 6051A (a y b) y con el primer ATCC 54405 (c y d). Se utilizó 1µL para cada reacción de PCR. (a y c) aumento de la señal de fluorescencia en relación con el número de ciclos y (b y d) análisis de la curva de fusión de los fragmentos amplificados.



## 5. Referencias

- [1] Adesina, M.F., Grosch, R., Lembke, A., Vatchev, T.D. and Smalla, K. 2009. *In vitro* antagonists of *Rhizoctonia solani* tested on lettuce: rhizosphere competence, biocontrol efficiency rhizosphere microbial community response. FEMS Microbiol. Ecol. 69: 62-74.
- [2] Broadbent, P., Baker, K.F. and Waterworth, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. Biol. Sci. 24: 925-944.
- [3] Olsen, M.W. and Young, D.J. 1998. Plant Disease Management: Horticultural Crops Department of Plant Pathology. University of Arizona. (9-10).
- [4] Providenti, M.A., Begin, M., Hynes, S., Lamarche, C., Chitty, D., Hahn, J., Beaudette, L.A., Scroggins, R. and Smith, M.L. 2009. Identification and application of AFLP-derived genetic markers for quantitative PCR-based tracking of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. released in soil. Can. J. Microbiol. 55: 1166-1175.
- [5] Zehnder, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E.J. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic virus by plant growth-promoting rhizobacteria. Biol. Control 45: 127-137.