



Nit: 900.207.843-7

Prueba de eficacia con fines de registro ICA para el producto PROMOBAC (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus* sp.) En el control de tizón tardío o gota (*Phytophthora infestans*) en cultivo de tomate tipo chonto híbrido Gem 16.

Autores: Rafael Ángel Navarro Alzate

Adolfo Posada Duque

Bioquirama S.A.S: Empresa productora de insumos biológicos para el control de plagas y enfermedades en cultivos.

Marzo 03 de 2016

RESUMEN

Se realizó la evaluación del insumo biológico PROMOBAC compuesto por los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus* sp., para determinar su efecto en la prevención, control y manejo de *P. infestans* en cultivos de tomate de mesa *Lycopersicon esculentum* Mill, híbrido F1, variedad GEM16 y obtener el registro de venta ICA. Para ello se estableció un diseño experimental con bloques al azar, bajo invernadero, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones así: 1) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis alta 10 ml/L, 2) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis media 5ml/L, 3) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis baja 2.5 ml/L, y 4) Producto comercial registrado ante el ICA, cuyo ingrediente activo es *B. subtilis*, el cual sirvió para comparación, se aplicó en la dosis recomendada por la casa comercial 3ml/L y 5) un testigo (sin aplicación de ningún producto antes mencionado). El cultivo se estableció con plantas de un mes de edad fisiológica y se llevó hasta floración y formación del primer racimo. El porcentaje de enfermedad se midió en una escala de 0 (ausencia de gota) a 100 (planta totalmente afectada) basados en porcentaje de daños por área foliar (AFA). Se realizó un análisis de varianza el cual mostró que los tratamientos donde se utilizaron las dosis altas y media presentaron el menor porcentaje de enfermedad; de igual manera, se evidenció que las tres dosis evaluadas del PROMOBAC no presentaron fitotoxicidad.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, control biológico de *Phytophthora infestans*, *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

It was performed an evaluation of biological product PROMOBAC composed of the microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus sp.*, to determine their effect on the prevention, control and management of *P. infestans* in tomato *Lycopersicon esculentum* Mill, F1 hybrid, GEM16 and get the ICA marketing registration. An experimental design was established with randomized block greenhouse with five treatments and four repetitions as follows: 1) PROMOBAC applied to the foliage in high doses 10 ml / L, 2) PROMOBAC applied to the foliage in average dose 5 mL / L, 3) PROMOBAC applied to the foliage at low dose 2.5 mL / L, and 4) A commercial product registered with the ICA, whose active ingredient is *B. subtilis*, which served for comparison, was applied in the dose recommended by the commercial 3mL / L and 5) a control (without application of any product above). The culture was established plants one month of physiological age and brought to flowering and formation of the first cluster. The percentage of disease was measured on a scale of 0 (no drop) to 100 (fully affected plant) based on percentage damage leaf area (DLA). An analysis of variance was used which showed that treatments where high doses and a half had the lowest percentage of disease was made; likewise, it was evidenced that the three doses tested did not show phytotoxicity of PROMOBAC.

KEY WORDS: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, control biológico de *Phytophthora infestans*, *Lycopersicum esculentum*.

INTRODUCCIÓN

Debido a las fluctuaciones de temperatura y humedad del trópico y en especial de los diferentes tipos de pisos térmicos de Colombia, la gota, gotera o tizón tardío es generada en gran proporción en los cultivos de tomate y papa, además de dichos factores ambientales y la alta densidad de siembra de esto cultivos se ve favorecida las condiciones para que se presente el patógeno *Phytophthora infestans*, el cual es una de las principales enfermedades en los cultivos de tomate de mesa y papa, así mismo este microorganismo puede afectar otros cultivos; las estrategias de manejo y control se hacen principalmente con fungicidas de síntesis química. Sin embargo, este tipo de práctica y el uso inadecuado de las dosis a ocasionado que muchos de los productos no funcionen contra el patógeno, ya que algunas poblaciones del hongo han generado ciertas resistencias con algunas moléculas que lo controlan, esto conlleva a buscar

Nit: 900.207.843-7

soluciones y alternativas diferentes al manejo fitosanitario de este microorganismo patógeno en los cultivos donde pueda presentarse con sus respectivos síntomas y signos.

P. infestans es el patógeno que presenta mayores daños y pérdidas en cultivos de tomate en diferentes zonas del territorio Colombiano. La dificultad en el manejo y control de la enfermedad se da principalmente por los altos costos de los insumos para su control y la presión por parte de las aplicaciones que se realizan en este tipo de cultivos. Debido a esto Bioquirama S.A.S genera una opción y alternativa para el manejo y control de *P. infestans*. En cultivos de tomate de mesa con el producto biológico PROMOBAC a base de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus* y *Bacillus* sp.; el manejo fitosanitario propuesto para este patógeno está basado en la técnica de Resistencia Sistémica Inducida (RSI). La resistencia inducida es la respuesta que aparece luego de que una planta ha sido pre inoculada por varios agentes bióticos o previamente tratada con agentes físicos o químicos.

El control para enfermedades foliares como es el caso de *P. infestans* es conocido como antibiosis o respuesta sistémica inducida (RSI) como se ha venido hablando en este documento, este tipo de práctica se ha evaluado desde hace décadas para el control de hongos, bacterias y virus, la técnica ofrece una alternativa muy atractiva y eficaz como protección, control y manejo natural de patógenos endófitos y facultativos de la mesofauna y el ambiente en general, este tipo de manejo fitosanitario genera un costo beneficio para el agricultor y el medio ambiente, lo cual hace un producto de excelente calidad para el manejo de enfermedades foliares, radicales y de haces vasculares. La presente investigación además de ser con fines comerciales muestra una serie de análisis estadísticos con resultados sobre cada tratamiento y su incidencia sobre la enfermedad, además de los diferentes controles de estas rizobacterias sobre *P. infestans* en cultivos de tomate de mesa ubicados en la empresa Bioquirama S.A.S, en el municipio de Rionegro-Antioquia.

Siembra y Trasplante de Tomate de mesa (*Lycopersicum esculentum* Mill).

Se sembraron semillas de tomate variedad GEM16, híbrido, F1, en canastas de 162 alveolos de la casa comercial Saenz Fety S.A.S, el sustrato utilizado para la germinación fue turba 15Kg y micorriza de Bioquirama 120gr/Kg además de realizar un drench al momento de la siembra con PROMOBAC y así dejar las bandejas en cámara humedad durante 5 días para su óptima germinación, después de pasado los 5 días y de hallar una germinación del 65% se procedió a retirar el plástico que las cubría y se realizó una hidratación con agua más PROMOBAC y el *B. subtilis* de la casa comercial, dando así inicio a los tratamientos de las plantas para llevar a campo y continuar con sus



Nit: 900.207.843-7

aplicaciones foliares cada semana a dosis descritas de 10mL/L; 5mL/L; 2.5mL/L y 3mL/L.

Aplicación de los Tratamientos

Se establecieron cinco tratamientos bajo un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones (plantas de tomate de mesa GEM 16) así: 1) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis alta 10 ml/L, 2) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis media 5mL/L, 3) PROMOBAC aplicado al follaje en dosis baja 2.5 mL/L, y 4) Producto comercial registrado ante el ICA, cuyo ingrediente activo es *B. subtilis*, el cual sirvió para comparación, se aplicó en la dosis recomendada por la casa comercial 3mL/L y 5) un testigo (sin aplicación de ningún producto antes mencionado). El PROMOBAC está formulado con una concentración de 1×10^8 UFC / mL.

Las aplicaciones realizadas durante las pruebas llevaron siempre un itinerario de aplicación junto con sus respectivas dosis sorteadas, el producto a evaluar fue el PROMOBAC de la casa comercial Bioquirama S.A.S, enfrentado con el producto comercial que utiliza el microorganismo *B. subtilis*. Las aplicaciones se realizaron durante todo el proceso de germinación que duró 30 días, estas aplicaciones se realizaron con frascos atomizadores de 500ml, cada tratamiento contaba con un frasco específico lo cual garantizaba que no hubiera contaminaciones ni trazas al hacer sus respectivas mezclas.

Las aplicaciones como se ha indicado anteriormente se realizaron a dosis descritas y se aplicaba semanalmente, después de los tratamientos pre germinativos que duraron 30 días, las plantas pasan a trasplante en campo, las camas disponibles para este trabajo fueron de 33m de largo por 1.20m de ancho, estas camas se dividieron en parcelas de 11m de largo por 1.20m de ancho. La distancia de siembra utilizada fue de 40cm entre plantas y 60cm entre surco dando una densidad de siembra de 54 plantas por parcela. En todos los casos anteriores las aplicaciones de los productos se realizaron cada semana como se venía ejecutando en plantulación. Cuando las plantas se llevaron a campo se continuó empleando sus respectivas dosis y su aplicación se realizó con bomba de aspersión hasta llegar a floración y primer racimo.

Inoculación de *Phytophthora infestans*

Las plantas de tomate en ningún momento se inocularon con el patógeno *P. infestans*, se estaba a la expectativa de que se manifestara, ya que este Oomycete es de vida libre en el ambiente y se habla de tizón tardío por su manifestación tarde y en el momento de



Nit: 900.207.843-7

producción del tomate y la papa, las mediciones realizadas en campo en conjunto con la valoración en laboratorio ayudó a detallar la presencia y ausencia del patógeno.

VARIABLES EVALUADAS

Con el propósito de registrar el producto de la empresa Bioquirama S.A.S ante la entidad reguladora de bioinsumos e insumos agrícolas en Colombia ICA y así obtener registro de venta del agro insumo biológico (PROMOBAC) se realizaron una serie de evaluaciones mediante pruebas de eficacia in vivo. Los métodos de evaluación fueron cualitativos y cuantitativos con índices de incidencia, severidad, porcentajes de daño por área foliar con límites y medias, basados en sintomatología, presencia y ausencia de la enfermedad, las valoraciones de las plantas se hacían semanalmente con monitoreo directo parcela por parcela, para generar así un acercamiento exacto de área foliar en las plantas y lograr identificar la presencia o ausencia del patógeno con sus características sintomatológicas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos fueron comprobadas en el paquete estadístico Rwizard 1.3 para las variables de afectación foliar en la escala propuesta por Pérez (s.f) y Navarro (2015). Para hallar las diferencias significativas se realizó un ANOVA el cual sirvió para cumplir con los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia, en la totalidad del ensayo se halló diferencias significativas (ANOVA, $F_{1, 15} = 289,82$, $p < 0,001$).

RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan una serie de datos donde se determinó el porcentaje de enfermedad ocasionada por *P. infestans* en plantas de tomate tipo chonto híbrido Gem 16. Los datos corresponden a cinco tratamientos, cada uno de los cuales tuvo cuatro repeticiones. Se midió el porcentaje de afectación por la enfermedad y la fitotoxicidad del cultivo.

Nit: 900.207.843-7

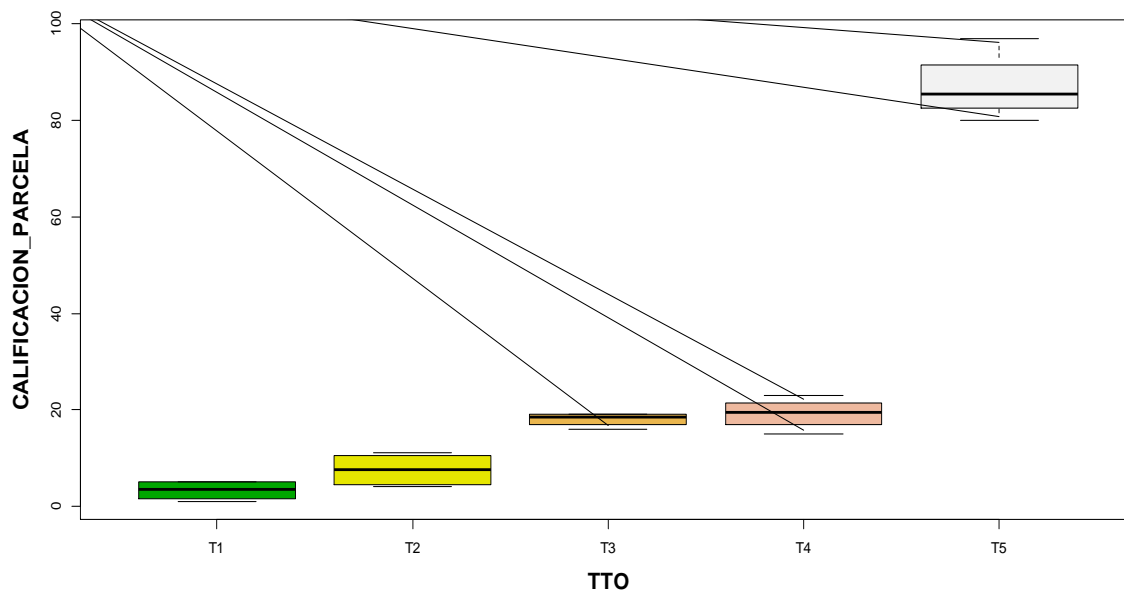
Tabla 1. Índice de daños ocasionados por gota (*P. infestans*) en tomate de mesa. Incidencia y severidad para cada parcela realiza al momento de la evaluación final. El porcentaje de enfermedad (*P. infestans*) se midió en una escala de 0 (ausencia de gota) a 100 (planta totalmente afectada, mediado por la escala de valor).

Tratamiento	Plantas Vivas	Plantas Erradicadas no por Gota	% de <i>P. infestans</i>	Valor escala	Fitotoxicidad
PROMOBAC 10mL/L	52	0	2,00	1	0
PROMOBAC 5 mL/L	52	0	11,00	3	0
PROMOBAC 2.5 mL/L	54	0	16,00	4	0
B. subtilis 3mL/L	51	1	23,00	4	0
Testigo (-)	51	1	85,00	7	0
PROMOBAC 10mL/L	44	0	5,00	3	0
PROMOBAC 5 mL/L	52	0	4,00	1	0
PROMOBAC 2.5 mL/L	56	0	19,00	4	0
B. subtilis 3mL/L	49	1	19,00	4	0
Testigo (-)	51	1	86,00	7	0
PROMOBAC 10mL/L	42	0	5,00	3	0
PROMOBAC 5 mL/L	42	0	10,00	3	0
PROMOBAC 2.5 mL/L	44	0	18,00	4	0
B. subtilis 3mL/L	43	1	20,00	4	0
Testigo (-)	45	1	80,00	6	0
PROMOBAC 10mL/L	52	0	1,00	1	0
PROMOBAC 5 mL/L	49	3	5,00	3	0
PROMOBAC 2.5 mL/L	54	0	19,00	4	0
B. subtilis 3mL/L	54	0	15,00	4	0
Testigo (-)	51	1	97,00	8	0

De acuerdo con el criterio de Pérez (s.f) y Navarro (2015) utilizado en esta investigación, el valor del umbral para determinar a una parcela como positiva frente a los síntomas de *P. infestans* fue con porcentaje de 0 sin presencia del patógeno y hasta

Nit: 900.207.843-7

100 como límite donde se halla el patógeno. Con base en lo anterior, los tratamientos T₁ y T₂ presentaron los mejores resultados con diferencias significativas (ANOVA, $F_{1, 15} = 289,82$, $p < 0,001$), seguido por T₃ y T₄; el tratamiento T₅ (testigo absoluto) mostró diferencias significativas con probabilidades $p < 0,001$, con porcentajes de infección mayores del 95%.



Análisis de ANOVA, tratamiento versus porcentaje infección de *P. infestans* en cultivo de tomate de mesa, se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos T₁ y T₂ con respecto a los tratamientos T₃ y T₄; el testigo absoluto mostró una incidencia y severidad del 95% de las parcelas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el producto PROMOBAC (*B. subtilis*, *B. pumilus* y *Bacillus* sp.) aplicados foliarmente, en tratamientos pre germinativos, durante toda la germinación y luego durante el ciclo vegetativo hasta llegar a producción, lograron proteger al cultivo de tomate de mesa frente a *P. infestans* (gota), este resultado era una de las hipótesis del trabajo, el cual arroja un resultado positivo para el producto PROMOBAC, en la prevención y control del Oomyceto *P. infestans* en cultivo de tomate de mesa tipo chonto. Respecto al modo de acción a través del cual las especies de *Bacillus* ejercen un efecto antagónico, algunos autores mencionan que la producción de enzimas líticas, antibióticos y/o metabolitos pueden generar cambios en la membrana citoplasmática; otro posible mecanismo es la inhibición de la germinación, por competencia de nutrientes (Droby et al., 1990; Korsten y Jager, 1995; Lagunas et al., 2001). Investigaciones recientes muestran que *B. subtilis*, no solamente inhibe al patógeno, sino que además, promueve el crecimiento de

Nit: 900.207.843-7

la raíz y de la planta, e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas de jitomate (Nemec et al., 1996). Del mismo modo, *B. subtilis* también podría influir en los mecanismos de resistencia, ya que en semillas de chícharo infectadas con *Fusarium udum* Butler y tratadas con la bacteria, se incrementó la cantidad de PAL (fenil alanina amonio liasa) y la actividad de la peroxidasa (Podile y Laxmi, 1998)

CONCLUSIONES

La aplicación de PROMOBAC (*B. subtilis*, *B. pumillus* y *Bacillus* sp) en las tres concentraciones utilizadas, redujeron el grado de la enfermedad que ocasiona *P. infestans* en el tomate de mesa híbrido GEM 16, logrando así llegar con el cultivo a producción con bajo porcentaje de daño. Esto demuestra que el manejo de microorganismos para un control por antibiosis o PGR funciona bien, siempre y cuando se cumpla con las aplicaciones semanales al cultivo.

REFERENCIAS

Droby, S., Wilson, C., and Wisniewski, M. 1990. Nutrient competition as a mode of action of post-harvest biocontrol agents. In: C. Wilson and E. Chalutz, eds. Biological Control of Post-harvest Diseases of Fruits and Vegetables, Workshop Proceedings. Shepherdstown, West Virginia, USA. pp. 142-160.

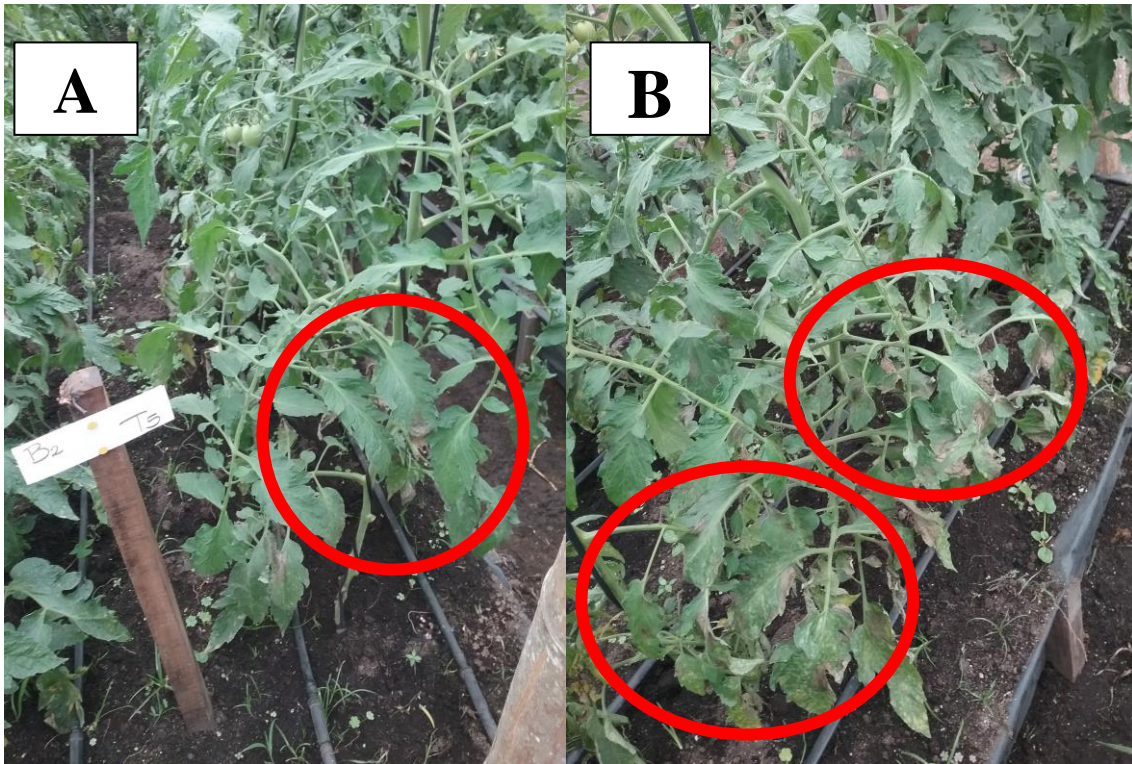
Korsten, L. and Jager, E.E. De. 1995. Mode of action of *Bacillus subtilis* for control of avocado post harvest pathogens. Yeark Book South African Grower's Association 18:124-130

Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., Vaquera, H. 2001. *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 19 (1): 57-65.

Nemec, S., Datnoff, L.E. and Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in plating mixes to colonize plant roots and control root. Crop Protection 15:735-742.

Podile, A.R. and Laxmi, V.D.V. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. Journal of Phytopathology 146:255-259.

ANEXOS



Testigo absoluto (T₅). Imagen A. Planta Con presencia de *P. infestans* en tercio medio. Imagen B. Planta de tomate afectada desde el tercio medio hasta el ápice

Nit: 900.207.843-7



Imagen C. Tratamiento número cuatro (T₄- *B. subtilis*), planta de tomate con presencia de goma en tercio medio de la planta. Imagen D. Esporangios de *P. infestans* obtenidos de tratamiento cinco y tratamiento cuatro.



Imagen E. Tratamiento uno (T₁- Dosis alta) parcela sana, libre de goma en sus 54 v plantas. Imagen F. Inicio del tratamiento uno sin síntomas de *P. infestans*.