

# Ensayo bajo condiciones de invernadero de un producto de *Bacillus* sp. en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)

---

**Presentado por:**

Carolina Valencia Arteaga

**Asesora:**

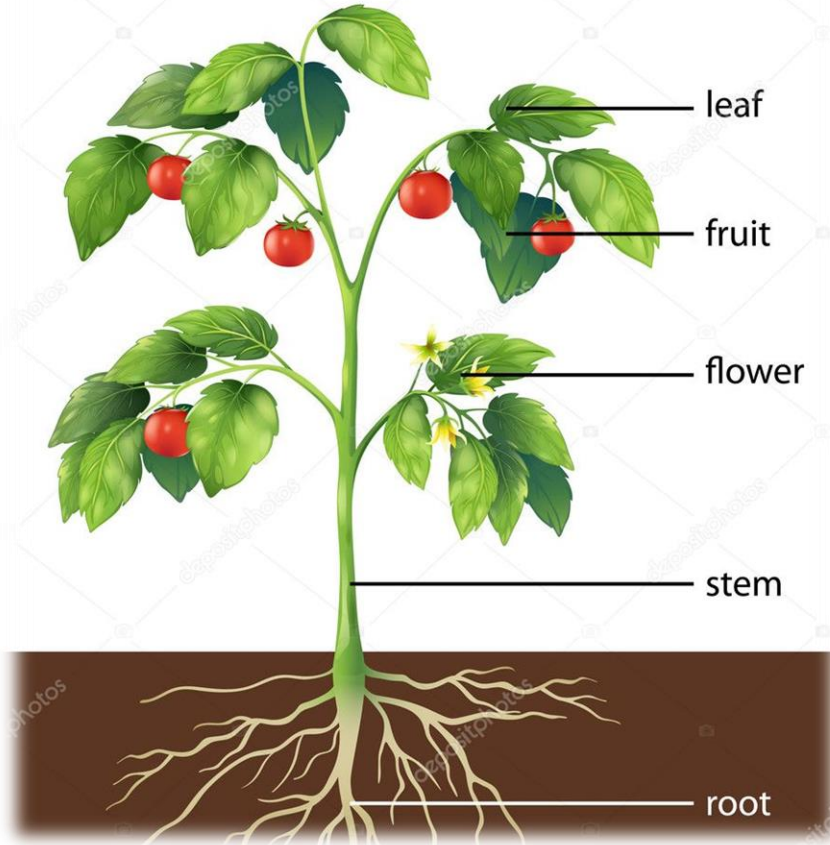
Ligia Consuelo Sánchez, Msc.



# El tomate (*Solanum lycopersicum*)

<b>Dominio</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliosida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceas
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	<i>S. lycopersicum</i>

## Flowering Plant (Angiosperm) Anatomy



Fuente: 123RF.com

- ✓ Planta perenne
- ✓ Forma rastrera semirrecta o erecta
- ✓ Variedades determinadas e indeterminadas
- ✓ Su producción se realiza bajo condiciones de invernadero o al aire libre
- ✓ Alta producción y consumo a nivel mundial
- ✓ **Alta susceptibilidad a enfermedades.**

Cámara de Comercio de Bogotá (2015)

Introducción

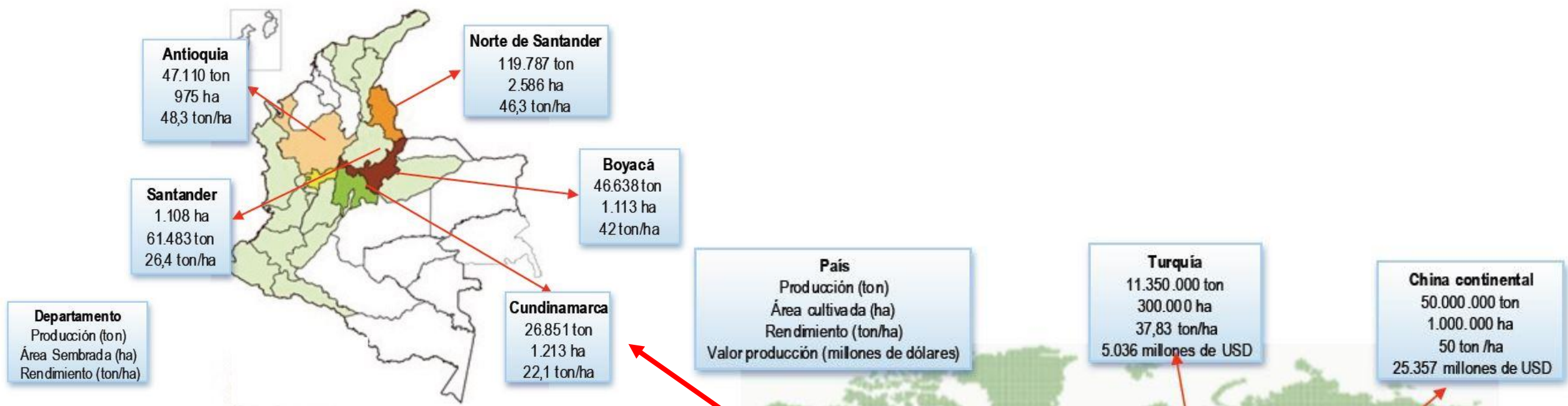
Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones



**Departamento**  
Producción (ton)  
Área Sembrada (ha)  
Rendimiento (ton/ha)

**País**  
Producción (ton)  
Área cultivada (ha)  
Rendimiento (ton/ha)  
Valor producción (millones de dólares)

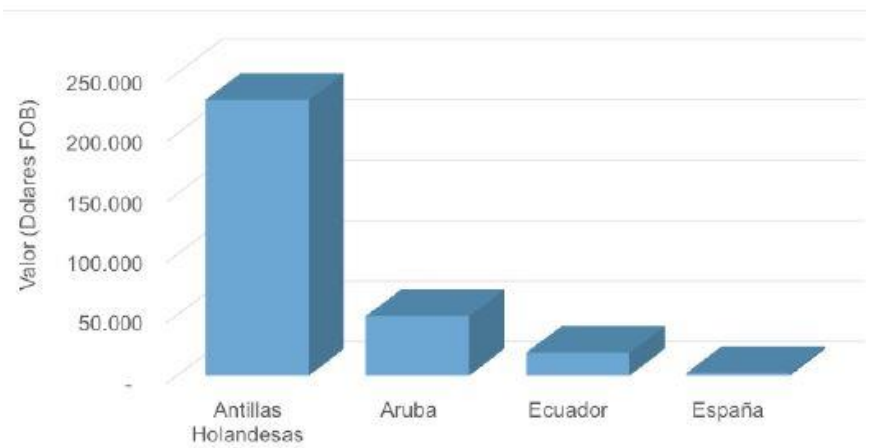
**Turquía**  
11.350.000 ton  
300.000 ha  
37,83 ton/ha  
5.036 millones de USD

**China continental**  
50.000.000 ton  
1.000.000 ha  
50 ton /ha  
25.357 millones de USD

**Estados Unidos**  
13.206.950 ton  
150.140 ha  
87,96 ton /ha  
9.113 millones de USD

**Egipto**  
8.625.219 ton  
216.395 ha  
39,85 ton /ha  
2.385 millones de USD

**India**  
17.500.000 ton  
870.000 ha  
20,11 ton /ha  
4.102 Millones de USD



Países destino de las exportaciones

Autor: Cámara de Comercio de Bogotá. 2015.



# Marchitez vascular



Autor: González P. 2006

**Patógeno:** *Fusarium oxysporum*

**Distribución:** Cosmopólita

**Síntomas:**

- Clorosis
- Entorchamiento de las hojas
- Pudrición de la raíz, tallo y hojas
- Necrosis
- Pudrición del fruto
- Enanismo

Introducción

Objetivos

Fase # 1

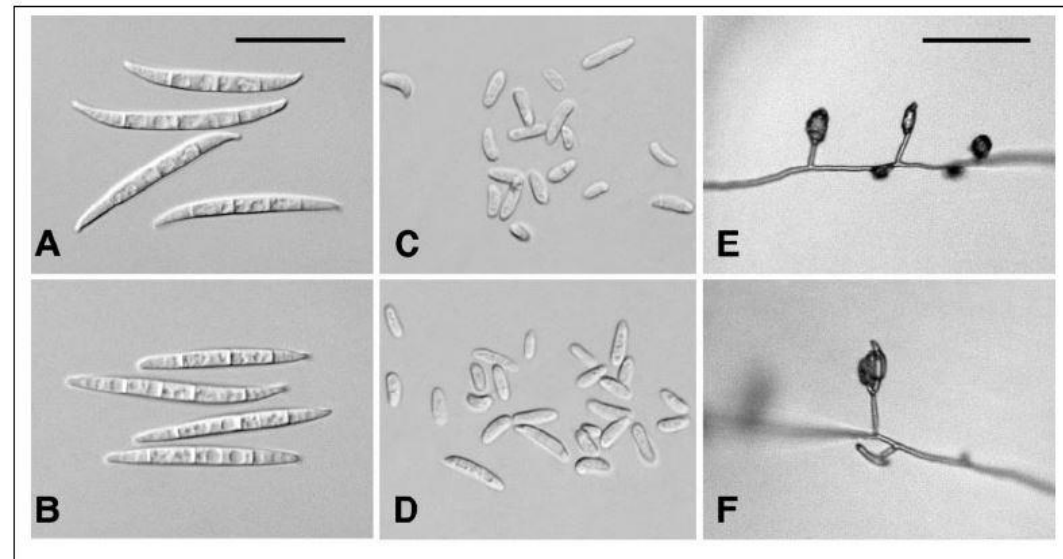
Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# *Fusarium oxysporum*

- Hongo filamentoso
- Saprófito del suelo
- Patógeno de diferentes especies de plantas (Leslie. *et al.* 2006)



Autor: Leslie J. *et al.* 2006.

<b>Dominio</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Nectriaceae
<b>Género</b>	<i>Fusarium</i>
<b>Especie</b>	<i>F. oxysporum</i> (complejo de especies)



Autor: Valencia C. 2018.

Introducción

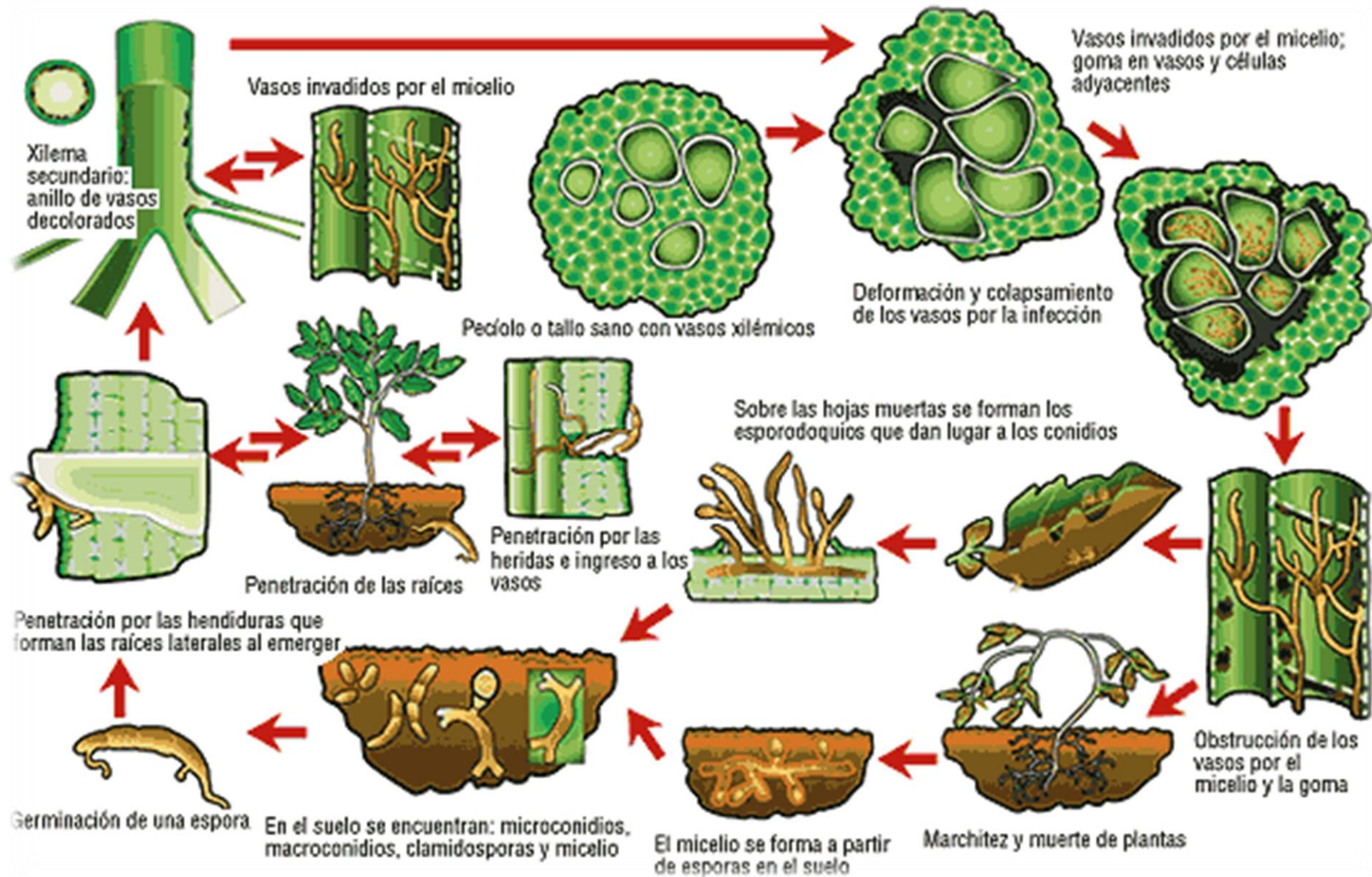
Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones



Autor: Araujo E. 2015

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# Bacillus subtilis



- Bacilos Gram positivos
- Productores de endosporas → resistencia a condiciones desfavorables en el ambiente (Layton C. *et al.* 2011)

- No es patógeno o toxigénico de los humanos, animales, o plantas (Castañeda E. 2015)
- Se conoce que entre un 4 y 5% del genoma, es el responsable de la síntesis de antibióticos con un potencial de cerca de 24 compuestos diferentes (Castañeda E. 2015)

<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Bacili
<b>Clase</b>	Bacillale
<b>Orden</b>	Bacillales
<b>Familia</b>	Bacillaceae
<b>Género</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Especie</b>	<i>B. subtilis</i>

Introducción

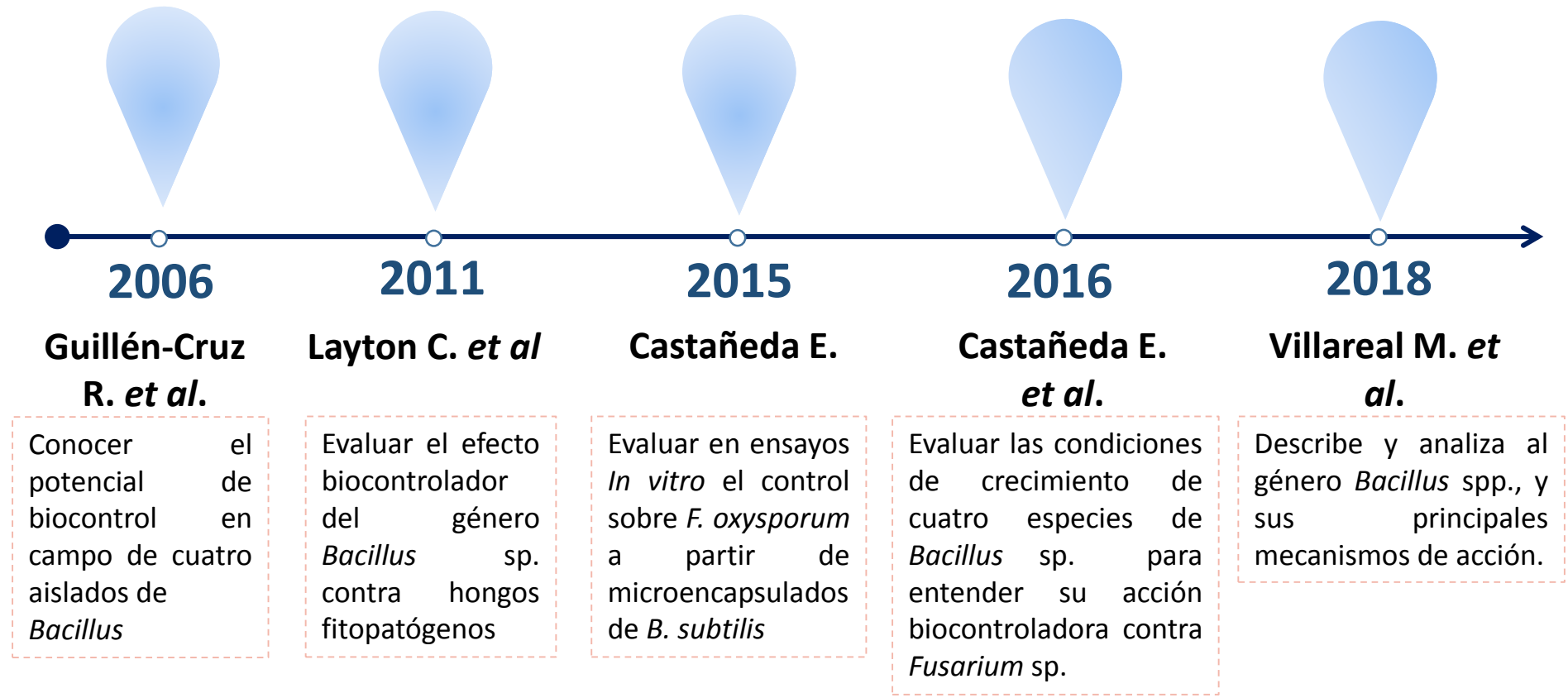
Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones





# Objetivos de investigación

---

Evaluar la actividad antagonista de un producto de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium oxysporum in vivo* bajo condiciones de invernadero.

## Objetivos específicos

- Establecer la viabilidad del producto de *Bacillus subtilis in vitro*.
- Determinar la actividad antagonista del producto de *Bacillus subtilis in vitro*.
- Establecer la viabilidad del producto de *Bacillus subtilis in vivo* en plantas de tomate.

Introducción

**Objetivos**

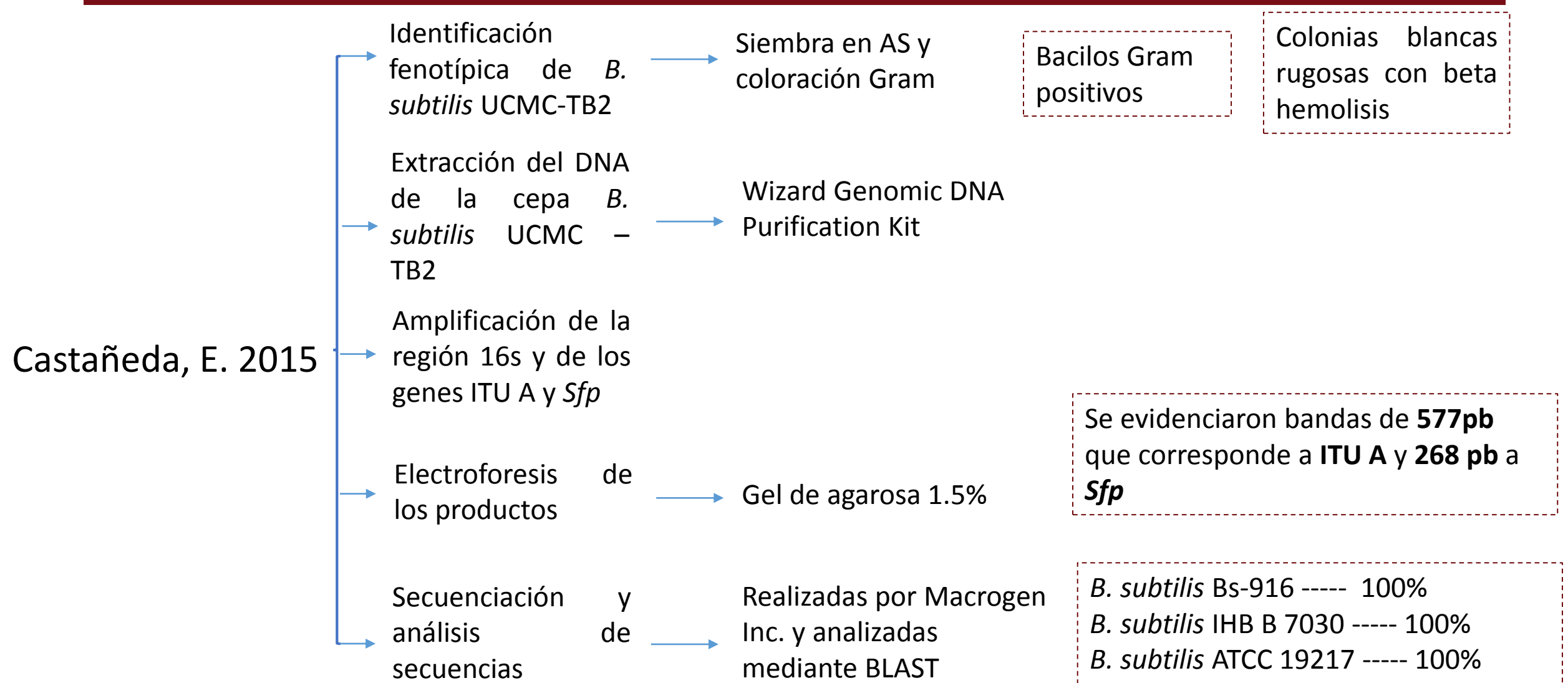
Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# FASE I: Verificación de la viabilidad de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2



Introducción

Objetivos

**Fase # 1**

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# FASE I: Verificación de la viabilidad de *Bacillus subtilis* UCMC – TB2

Sanchez , Corrales, & Lancheros, 2010

Se recuperó la cepa *B. subtilis* UCMC – TB2 de congelación (-80 °C) en caldo BHI

Se incubó a 37 °C en aerobiosis durante 24 horas

Agar Sangre

Se incubó a 37 °C en aerobiosis durante 24 horas

Colonias rugosas con beta hemolisis y sus bordes extendidos sobre el medio (Realpe M. *et al.* 2002)



Bacilos Gram positivos con bordes redondeados (Realpe M. *et al.* 2002)

Castañeda, E. 2015

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

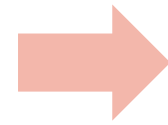
# FASE II: Aislamiento de *Fusarium oxysporum* y pruebas de antagonismo



Autor: Koppert biological system. 2016

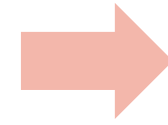
## Centro de Bio-Sistemas de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano

- Plantas de tomate con presencia de síntomas
- 4-5 meses de edad



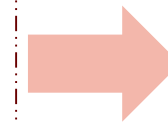
Lavado del material vegetal

Sánchez L. *et al.* 2016



Siembra del material vegetal en medio PDA

Sánchez L. *et al.* 2016



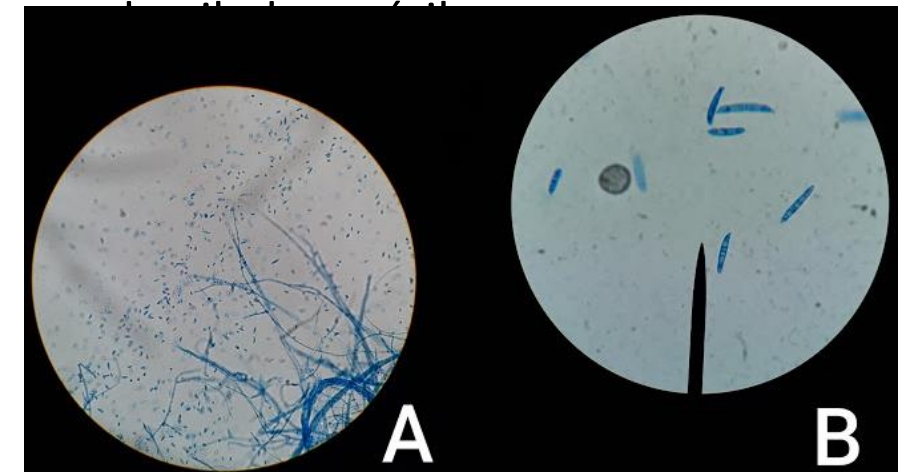
Aislamiento e identificación del patógeno

Sánchez L. *et al.* 2016

Lavado de los vegetales  
chicos

Lavado de los  
hipocotiles  
al 0,1%

Lavado de los  
cambios de  
tierra



A

B

Introducción

Objetivos

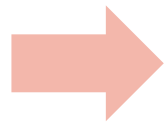
Fase # 1

Fase # 2

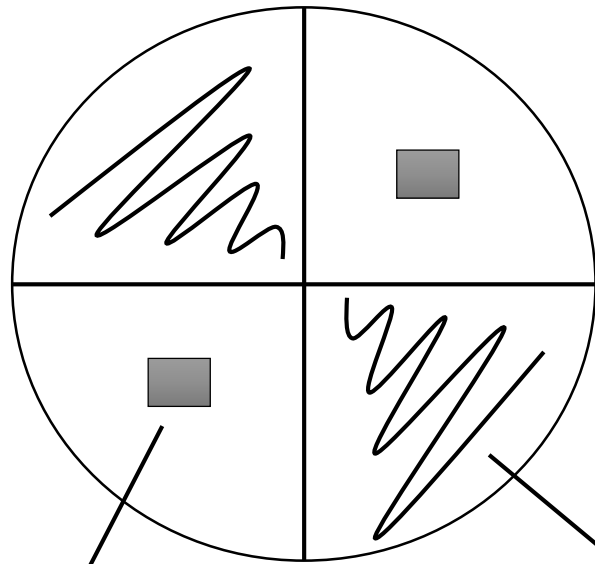
Fase # 3

Conclusiones

# FASE II: Aislamiento de *Fusarium oxysporum* y pruebas de antagonismo



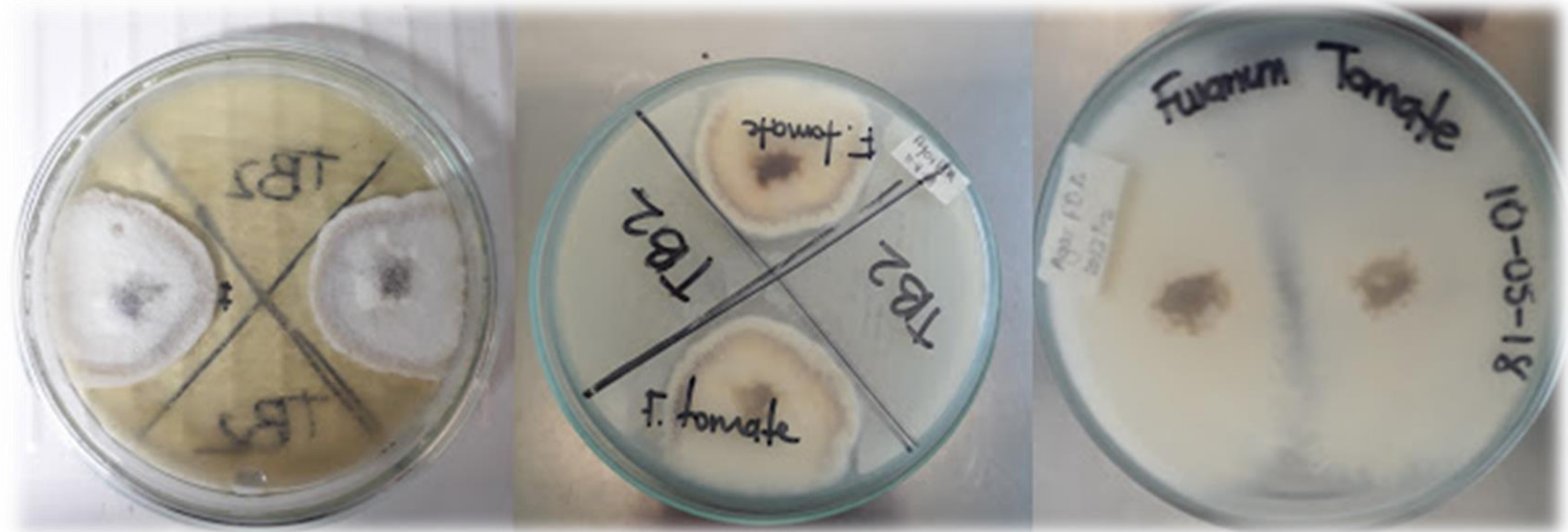
Pruebas de antagonismo



*F. oxysporum*

Cepa de *B. subtilis*  
UCMC-TB2

Se incubaron a 37 °C durante 8 días



Fuente: Autora

La actividad biocontroladora que ejerce *B. subtilis* frente a *F. oxysporum* resulta de la producción de metabolitos secundarios como surfactina e Iturina A (Layton C. *et al.* 2011)

Introducción

Objetivos

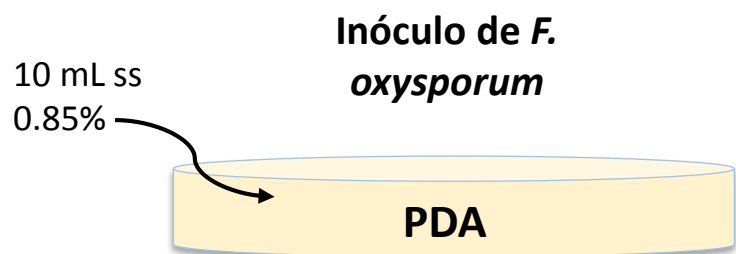
Fase # 1

**Fase # 2**

Fase # 3

Conclusiones

# FASE III: Bioensayos en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero



Se homogenizó y se filtró con gasa estéril

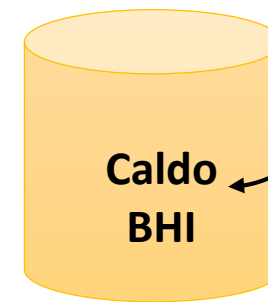
Conteo de conidios en Cámara de Neubauer

Diluciones hasta conseguir la concentración deseada  $1 \times 10^8$  conidios/mL

Sánchez L. *et al.* 2016

Inóculo de *B. subtilis* UCMC – TB2

- Peptona
- Maltosa
- Sales
- L-Asparagina
- L-Ácido Glutámico



Cepa *B. subtilis* UCMC – TB2

Se incubó a **37 °C** durante 24 horas

Recuento en Cámara de Neubauer y ajuste a la concentración deseada  $1 \times 10^8$  UFC/mL

Castañeda E. 2016

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

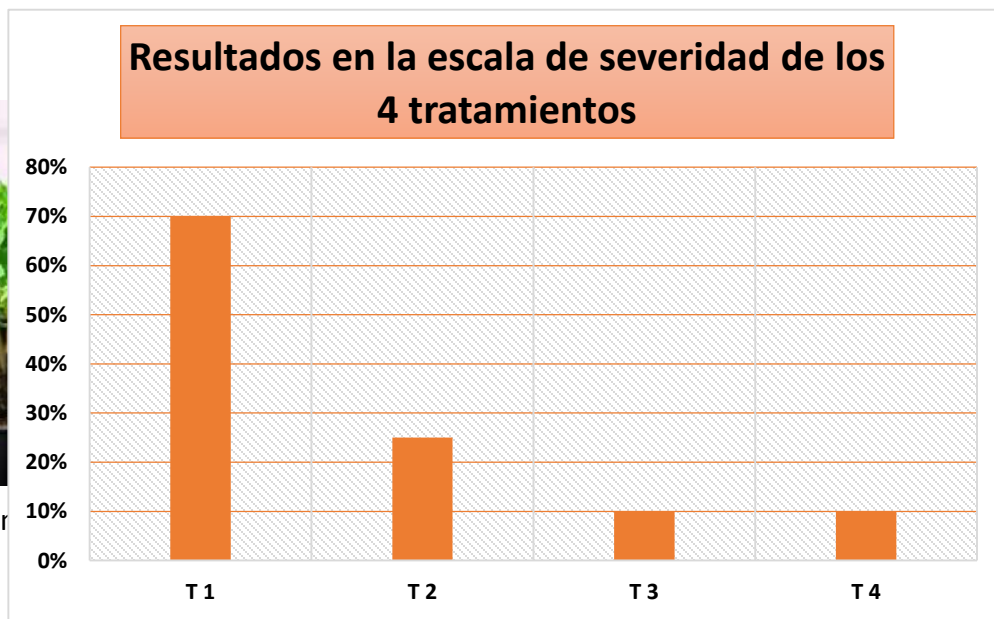
**Fase # 3**

Conclusiones

# FASE III: Bioensayos en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero



Autor: Sar



s de la  
á  
honto  
ento

	Número de plantas utilizadas por cada control y tratamiento	Contenido de cada tratamiento
<b>T 1 – Control positivo</b>	4	Plántula + suspensión de <i>F. oxysporum</i>
<b>T 2 – control negativo</b>	4	Plántula sin inóculo
<b>T 3</b>	4	Plántula + microencapsulados de <i>B. subtilis</i>
<b>T 4</b>	4	Plántula + suspensión de <i>F. oxysporum</i> + microencapsulados de <i>B. subtilis</i>

Escala de severidad propuesta por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

<b>0%</b>	<b>Planta sana</b>
<b>10%</b>	No más del 10% del follaje se encuentra clorótico y/o marchito
<b>25%</b>	Hojas cloróticas y/o marchitas
<b>50-70%</b>	Hojas cloróticas y/o marchitas
<b>100%</b>	Planta muerta o afectada de manera severa. Presenta la mayor parte de su follaje clorótico, marchito y necróticas, además de presentar defoliación prematura

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

**Fase # 3**

Conclusiones

# FASE III: Bioensayos en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero

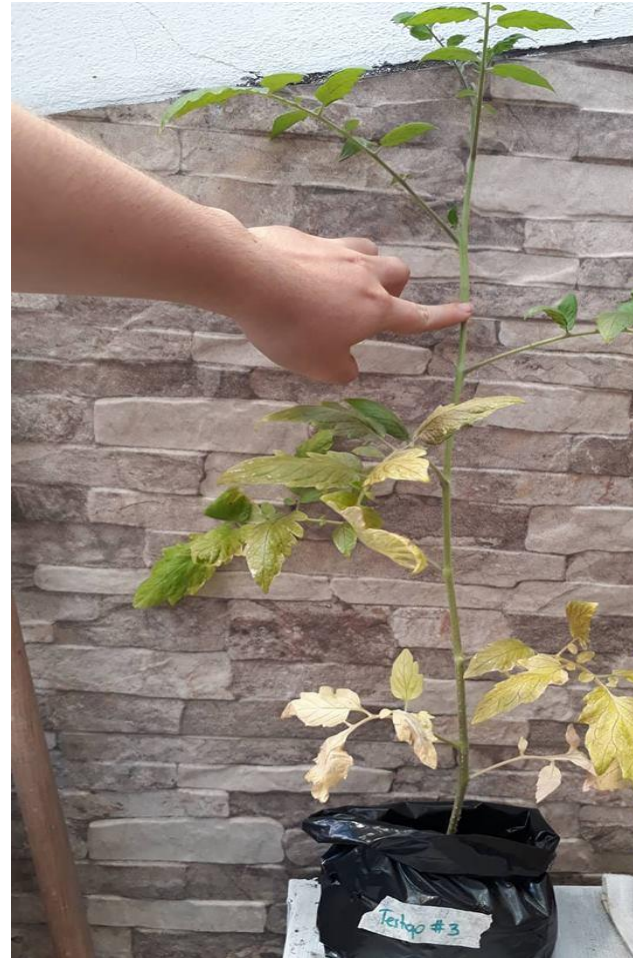


Tratamiento 1 a los 12 días. Fuente: Autor. 2018.

Primeros síntomas:

- Amarillamiento del follaje
- Caída de las hojas

(González I. *et al.* 2012)



Tratamiento 1 a los 45 días. Fuente: Autor. 2018.

- Encrespamiento en las hojas
- Oscurecimiento
- Necrosis

(González I. *et al.* 2012)

- Oscurecimiento vascular en los tallos y los pecíolos infectados de las hojas grandes

(González I. *et al.* 2012)

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

**Fase # 3**

Conclusiones



# FASE III: Bioensayos en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero



Tratamiento 4 a los 45 días. Fuente: Autor. 2018.

## Actividad biocontroladora

*B. subtilis* vs. *F. oxysporum* → producción de metabolitos secundarios (surfactin e Iturina A)

(Layton C. *et al.* 2011)

Síntesis de enzimas líticas → quitinasas y  $\beta$ -glucanasas han mostrado un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico

(Compant *et al.* 2005)

Los lipopéptidos influyen en el establecimiento de *B. subtilis* mediante la regulación de procesos celulares como motilidad y formación de biopelículas

(Choudhary y Jhori, 2009; Xu *et al.* 2013)

Introducción

Objetivos

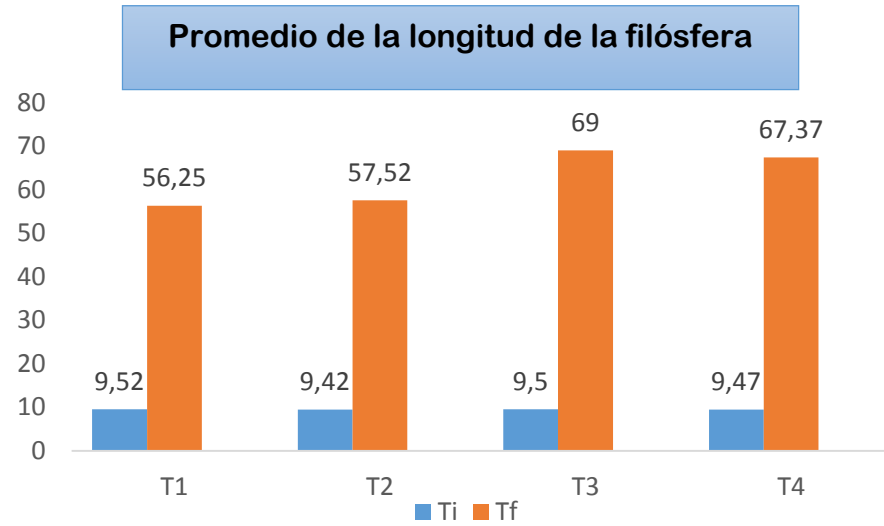
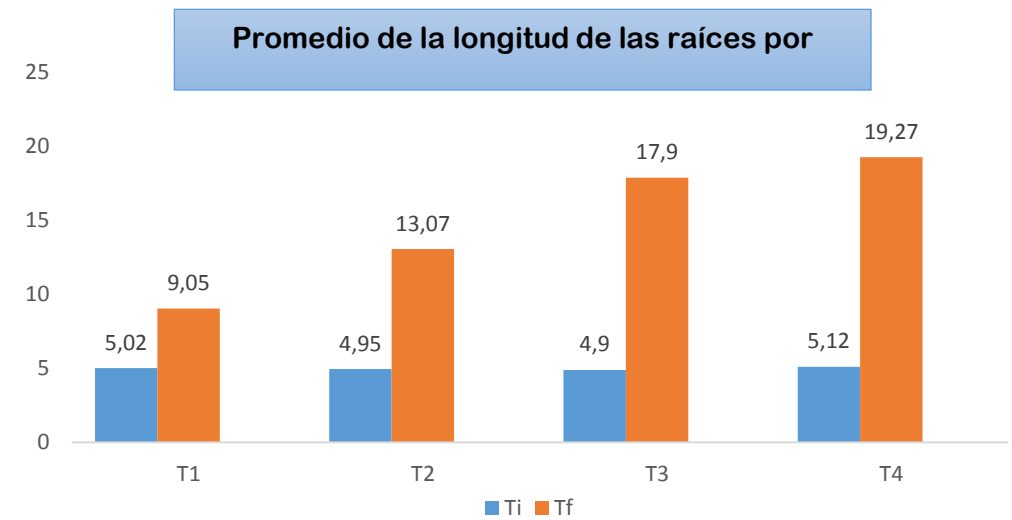
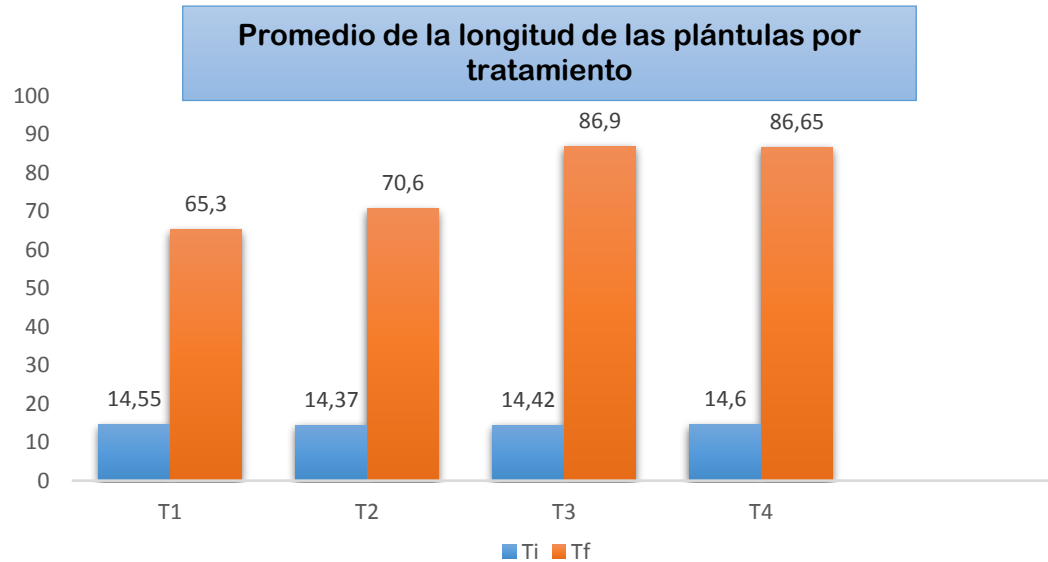
Fase # 1

Fase # 2

**Fase # 3**

Conclusiones

# FASE III: Bioensayos en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero



*B. Subtilis* también promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas así como la disponibilidad de **fosforo** y **nitrógeno** y la **síntesis de reguladores de crecimiento** como **ácido indolacético, giberilinas y citocininas**

(García *et al.* 2001)



# Conclusiones

---

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación en el bioensayo, se pudo concluir que:

- ✓ El producto microencapsulado de la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2 posiblemente presentó una **acción antagónica** frente a *F. oxysporum in vivo*, en plantas de tomate, gracias a la producción de **metabolitos secundarios** con acción antifúngica como la **Iturina A y fengicina**.
- ✓ Se evidenció la viabilidad del producto biológico de la cepa de *B. subtilis* UCMC – TB2. Las plantas del tratamiento **T4** inoculadas con el patógeno y tratadas con las microcápsulas **no manifestaron síntomas** de la enfermedad, lo que indica que el tratamiento fue el adecuado para el control del desarrollo de la enfermedad.

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# Conclusiones

---

- ✓ Se evidenció la capacidad que poseen las bacterias de este género como microorganismos **promotores de crecimiento**, debido a la **acción inductora** del crecimiento en la filósfera y rizósfera de las plantas tratadas con la cepa de ***B. subtilis* UCMC – TB2**.

# Recomendaciones

---

Se recomienda a futuras investigaciones sobre el mismo campo, manejar las variables como temperatura y humedad. Hacer un estudio previo físico-químico y microbiológico del suelo. Además de realizar el estudio en diferentes edades de la planta para observar su respuesta ante el tratamiento y prolongar más el tiempo del ensayo.

Introducción

Objetivos

Fase # 1

Fase # 2

Fase # 3

Conclusiones

# Agradecimientos

---

En el presente trabajo quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos a:

- Estefanía Castañeda, egresada de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Ligia Consuelo Sánchez, Msc
- Comunidad universitaria



# Referencias bibliográficas

---

- ✓ Castañeda E. Microencapsulación del *B. subtilis* por gelificación iónica como alternativa para controlar el *Fusarium sp.* [Master's thesis]. Chía, Cundinamarca; 2015. 87 p.
- ✓ Castañeda E, Sánchez L. Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* Rev NOVA. [Internet]. 2016 [citado 9 oct 2017]; 13 (26): 53 – 65. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- ✓ Ávila E. Manual: Tomate. Rev Cámara de Comercio de Bogotá. [Internet]. 2015. [citado 10 dic 2017]; 1 – 56 Disponible en: <http://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14307/Tomate.pdf?sequence=1>



# Identificación de *F. oxysporum*

---

Existen tres formas básicas:

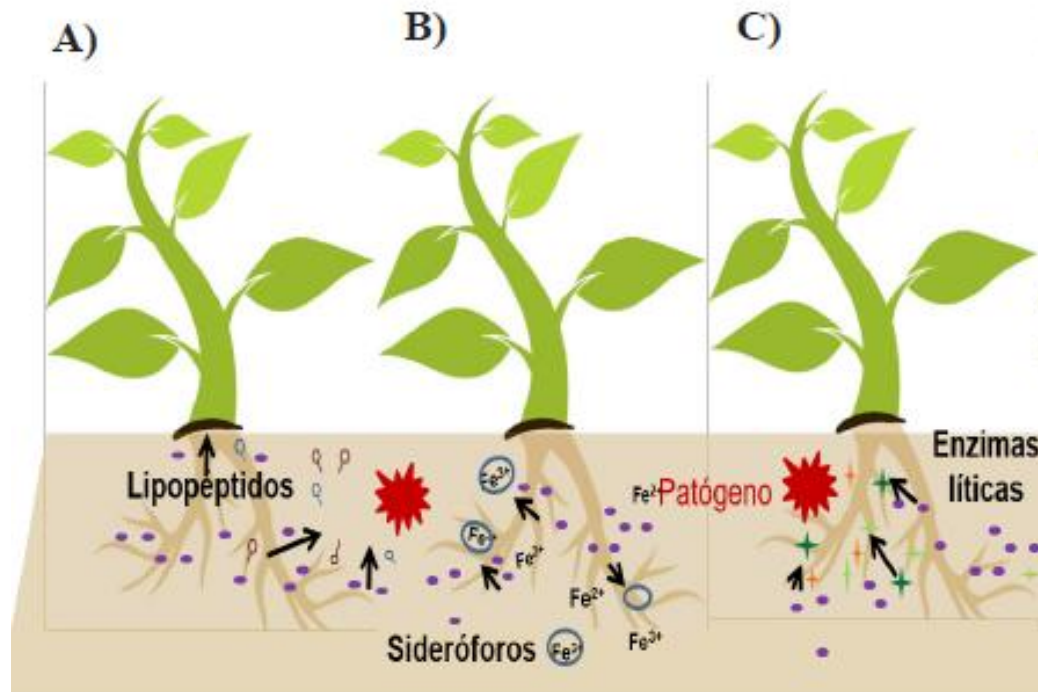
- Forma lisa con apariencia de aguja, si las paredes del conidio son delgadas.
- Las esporas tienen una curvatura dorsoventral a lo largo o en una porción del macroconidio.
- La curvatura es mucho más pronunciada en el lado dorsal que en el lado ventral.
- Células apicales: en forma de punta, de gancho, papilada y estrecha.
- Células basales en forma de pie, pie alargado, mellada y ligeramente mellada.

(Leslie y Summerell, 2006).



# Mecanismos de control biológico

- Producción de lipopéptidos → Iturina A, Surfactina, Fengicina
- Producción de sideróforos → Pnas quelantes de Fe
- Producción de enzimas líticas → Quitinasas, glucanasas



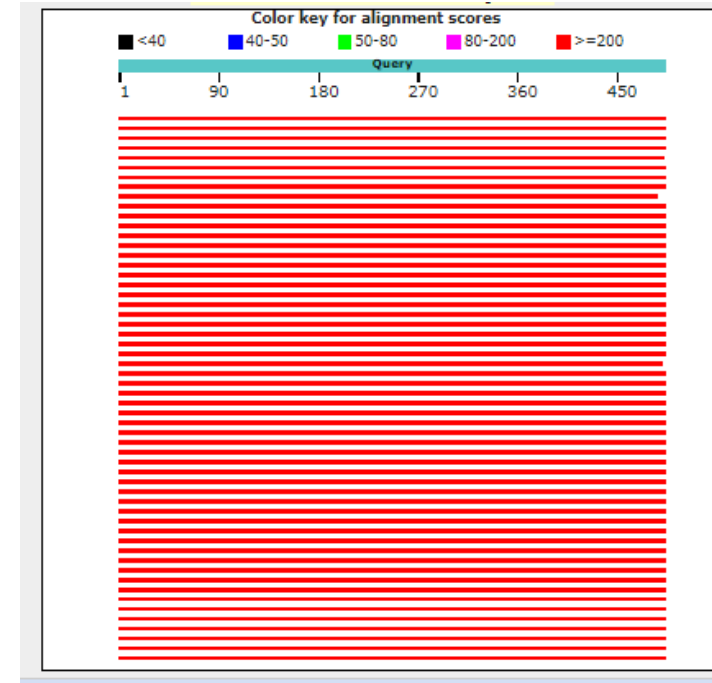
Fuente: Villarreal M. *et al.* 2018.

(Villarreal M. *et al.* 2018).

# BLAST

## Basic Local Assignment Search Tool

- Programa de alineamiento de secuencias de tipo local ya sea DNA, RNA o proteínas.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Uncultured Bacillus sp. clone Y16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	911	911	100%	0.0	100%	<a href="#">JF522314.1</a>
<a href="#">Anaerobacillus alkalilacustris strain KOTS1C PrM 12m 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	883	883	100%	0.0	99%	<a href="#">KY742409.1</a>
<a href="#">Anaerobacillus alkalilacustris strain KOTS1C PrM 0m 04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	883	883	100%	0.0	99%	<a href="#">KY742373.1</a>
<a href="#">Anaerobacillus alkalilacustris strain Z-0521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	883	883	100%	0.0	99%	<a href="#">NR_115854.1</a>
<a href="#">Bacillus krulwichiae strain T-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	874	874	99%	0.0	99%	<a href="#">HQ202852.1</a>
<a href="#">Bacillus krulwichiae strain PB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	872	872	100%	0.0	99%	<a href="#">MF407325.1</a>
<a href="#">Uncultured bacterium clone 76 TC22 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	872	872	100%	0.0	99%	<a href="#">KM251165.1</a>
<a href="#">Uncultured bacterium clone TX2 2K23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	872	872	100%	0.0	99%	<a href="#">JN178021.1</a>
<a href="#">Bacillus sp. (in Bacteria) strain FJAT-45385 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	870	870	98%	0.0	99%	<a href="#">KY612314.1</a>
<a href="#">Uncultured Bacillus sp. clone MLS165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	870	870	100%	0.0	99%	<a href="#">JX240877.1</a>
<a href="#">Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: 0502TCLN292</a>	869	869	100%	0.0	98%	<a href="#">AB696024.1</a>

# PCR

Gen 16S	
Primers	8F y 1492 R
Denaturación inicial por 10 min	94° C
10 ciclos de 45 s	94° C
30s	46° C
1 min	72° C
20 ciclos de 30 s	94° C
30 s	55° C
2 min	72° C
Extensión final por 10 min	72° C

Gen ITU A	
Denaturación inicial por 10 min	94° C
35 ciclos de 45 s	94° C
Anillamiento 45 s	64,3° C
Elongación 30 s	72 ° C
Extensión final por 10 min	72 ° C

Gen Sfp	
Denaturación inicial por 10 min	94° C
35 ciclos de 45 s	94° C
Anillamiento 45 s	58,3° C
Elongación 30 s	72 ° C
Extensión final por 10 min	72 ° C

**Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para evaluar ItuD, ItuA y Sfp**

Gen a evaluar		Secuencias del oligonucleótido	GC+AT Tm
ItuD	F	5' GTAGGGATGGGTAAAAGT '3	52
	R	3' GCTTCTTGCGTAAATGGAC 5'	56
ItuA	F	5' ATGGACCGCCCGCTTTCTG'3	62
	R	3' ACTCCTCGTCCGCCTCATA 5'	60
Sfp	F	5' GCTCGTCCTTGTCTTTTGC'3	58
	R	3' CTCGTTGCTCAGTCATA 5'	54