

Actinobacterias con potencial antagonico *in vitro* a hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento en plantas de Chile

Bertha María Sánchez-García¹
Juan Gabriel Ramírez-Pimentel¹
Luis Patricio Guevara-Acevedo¹
Juan Carlos Raya-Pérez¹
Jorge Covarrubias-Prieto¹
María Alejandra Mora-Avilés^{2§}

¹Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas km 8, Celaya, Guanajuato. AP. 508. CP. 39110. (bmsgsma@yahoo.com.mx; garamirez@itroque.edu.mx; lpguevara@itroque.edu.mx; juraya@itroque.edu.mx; covarrubiasjrg@hotmail.com). ²Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110.

§Autora para correspondencia: mora.alejandra@inifap.gob.mx.

Resumen

El potencial inhibitorio de tres cepas de actinobacterias (B21, B22 y B37) contra los fitopatógenos: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* fue evaluado *in vitro* mediante la técnica de cultivos aperados, donde a las 72 h después de la confrontación se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por las actinobacterias. Los resultados mostraron un PICR variable entre 67.54 y 93.84% dependiendo del patógeno. La cepa B22 fue la que mostro un PICR promedio de 98.73% para los tres fitopatógenos. En el escrutinio *in vivo*, las plantas de Chile inoculadas con las actinobacterias mostraron mayor altura de la planta y mayor peso seco de los frutos con respecto al testigo, lo que sugiere que las actinobacterias promueven el crecimiento de plantas de Chile.

Palabras clave: *Rhizobacterias*, inhibición de hongos, promoción de crecimiento.

Recibido: julio de 2019

Aceptado: agosto de 2019

En México, las enfermedades de cultivos agrícolas, ocasionadas por hongos y bacterias son principalmente controladas por medio de compuestos químicos. En el año 2015 se emplearon 28 741.46 t de ingrediente activo de fungicidas y bactericidas, todos estos compuestos fueron aplicados sobre una superficie que asciende a más de 22 millones de ha cultivadas en el país (FAO, 2019).

La utilización de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha provocado efectos negativos en la salud humana, contaminación de los mantos freáticos, elevado costo de producción, además de actuar negativamente sobre organismos benéficos, lo anterior bajo un control deficiente derivado aplicaciones incorrectas en concentración y frecuencia, afectando el entorno, ocasionando un desequilibrio en el ecosistema y con ello, pérdida de la biodiversidad (Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013).

El control biológico ha demostrado ser una herramienta eficaz y económicamente viable para el control de plagas y enfermedades, en la que se emplean enemigos naturales, antagonistas o competidores vivos, capaces de mantener la densidad de población de un organismo plaga a un nivel que no cause daños económicamente importantes y mantener la sustentabilidad de los agroecosistemas (Infante *et al.*, 2009; Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2013).

Entre los agentes que realizan procesos de biocontrol, se encuentran las bacterias, hongos, virus, depredadores y parasitoides, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción destacando: la antibiosis, competencia por espacio y nutrientes o nicho ecológico, producción de compuestos inhibidores, la activación de enzimas del agente patógeno, parasitismo y la inducción de resistencia en la planta (Villamil *et al.*, 2015; Reyes, *et al.*, 2015).

Las actinobacterias son conocidas por cumplir diversos papeles en el ecosistema, como descomponedoras de materia orgánica, especialmente biopolímeros como la lignocelulosa, almidón y quitina, mejorar la estructura del suelo y la producción de compuestos bioactivos con actividad antagónica contra microorganismos patógenos; se pueden encontrar en el suelo y raíz de las plantas, así como en sedimentos de agua dulce y salada, poseen la capacidad de biosintetizar una amplia variedad de antibióticos como metabolitos secundarios o productos naturales, y también se han descrito actividades que pueden catalogar a las actinobacterias como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) por sus siglas en inglés (Doubou *et al.*, 2001; Franco-Correa, 2009).

Actualmente en México se está implementado el uso de productos más amigables con el ambiente, por lo que se están explorando diferentes nichos con la finalidad de obtener cepas de microorganismos con potencial para el control de plagas y enfermedades en cultivos económicamente importantes. Uno de estos cultivos es el chile (*Capsicum annuum* L.) el cual ve mermada su producción debido al ataque de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, los cuales ocasionan daño en el sistema radicular y no han podido ser controlados de manera efectiva.

El objetivo de este trabajo se centró en aislar actinobacterias de suelos perturbados y no perturbados y demostrar su potencial en la inhibición de los hongos fitopatógenos de chile *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*, así como evaluar la promoción del crecimiento de plantas de chile.

Para abordar el objetivo se realizaron muestreos de suelo en noviembre y diciembre de 2016 de suelo cultivado y no cultivado (no perturbado) en los municipios de Apaseo el Grande, Celaya, Comonfort, Pénjamo, San Luis de la Paz, San Diego de la Unión y Tarimoro y en enero, febrero y marzo de 2017 en San Miguel de Allende, Villagrán y Xichú, todos del estado de Guanajuato.

Las muestras de suelo colectadas fueron tamizadas para obtener una muestra homogénea. Un gramo de suelo de cada muestra fue colocado en tubos de 15 mL, los cuales contenían 9 mL de H₂O destilada estéril y fueron procesados por dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se tomaron 50 μ L de cada una de las diluciones y fueron colocados en el centro de cajas Petri con PDA (Papa Dextrosa Agar) dispersando la dilución con varilla de vidrio estéril.

El número de cajas Petri inoculadas fue dos cajas Petri para la dilución 10^{-1} , tres cajas Petri; para la dilución 10^{-2} y siete cajas Petri para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , todo bajo condiciones asépticas Rodríguez-Guerra, Com. Pers. (2017).

Las cajas de Petri inoculadas fueron incubadas a 26 °C hasta la observación de crecimiento de microorganismos. Al observar crecimiento de colonias que sugerían ser actinobacterias (fenotipo con textura polvosa, color, forma, superficie y borde de la colonia, así como pigmentación del medio de cultivo y ser Gram positivas), se tomó la colonia completa con ayuda de una aguja de disección previamente esterilizada y fue colocada en cajas Petri con PDA.

Escrutinios *in vitro* fueron realizados con el propósito de observar el potencial antagónico de las actinobacterias. Fragmentos de colonia de actinobacterias fueron frotados en el centro de cajas Petri de 90 x 15 mm con medio de cultivo PDA, cubriendo un radio de 3 cm aproximadamente de la superficie central de la caja Petri. Las cajas Petri inoculadas fueron mantenidas a 26 °C por 9 días, posteriormente se colocaron explantes de 7 mm de diámetro de colonia con 72 h de crecimiento de los hongos fitopatógenos: *R. solani*, *P. capsici* o *Fusarium oxysporum*, a 2 cm aproximadamente del margen de la colonia de las actinobacterias.

Como testigo, se colocaron fragmentos de colonia de mismo diámetro de los fitopatógenos sin actinobacterias en caja Petri con PDA de forma similar que en la confrontación, también se utilizaron como testigo cajas Petri con PDA inoculadas en el centro solamente con actinobacterias, se realizaron 3 réplicas por actinomiceto y fitopatógeno.

La evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 h posteriores a la confrontación, donde se midió el crecimiento radial del micelio de los fitopatógenos confrontados y de los testigos y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004), $PICR = (R1 - R2) / R1 * 100$, donde R1 es el radio del crecimiento de la colonia del patógeno testigo y R2 es el radio de la colonia del patógeno en enfrentamiento.

Con las cepas de actinobacterias que inhibieron el crecimiento de los hongos, se realizó un escrutinio para definir su influencia en el crecimiento en plantas de chile. Cada cepa de actinobacteria fue crecida en medio de cultivo Spezieller Nährstoffmarmmer Agar (SNA) modificado (1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ KNO₃, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 0.5 g L⁻¹ KCl, 0.2 g L⁻¹ sacarosa, 0.2 g L⁻¹ glucosa y 5 g L⁻¹ extracto de levadura) (Nirenberg, 1976). El medio de cultivo fue puesto en agitador orbital a 130 rpm y 28 °C por 13 días. Plantas de chile var. Santa Fe de seis semanas fueron inoculadas con las actinobacterias potenciales.

El diseño del experimento fue completamente al azar con tres repeticiones y 5 plantas por repetición. Al momento del trasplante y diez días después del trasplante se le agregó a cada planta 5 mL de suspensión de esporas de las actinobacterias a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹ y en las plantas testigo solo se agregaron 5 mL de agua estéril a nivel de cuello. Las plantas se evaluaron en la etapa de producción y las variables evaluadas fueron altura de planta, longitud de raíz, longitud de frutos y peso fresco de frutos.

Ochenta y dos cepas de actinobacterias fueron identificadas de las localidades muestreadas, donde la mayor cantidad de cepas se obtuvo del municipio de San Miguel de Allende (suelo no perturbado) con 60 cepas, seguido de Celaya con 10 cepas. De las 82 cepas de actinobacterias confrontadas con los fitopatógenos, tres cepas de ellas mostraron potencial inhibitorio contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*. Las cepas de actinobacterias potenciales fueron: B21 y B22 (Sierra de Xichú, área no perturbada) y B37 (Pénjamo, de un predio cultivado con maíz).

Los resultados de la confrontación mostraron un rango de PICR de 67.54 a 93.84% (Cuadro 1), dependiendo del hongo patógeno. Es de hacer notar que la inhibición de los fitopatógenos por parte de los actinomicetos se dio sin tener algún contacto entre ellos, por lo que se sugiere la presencia de metabolitos secretados y expandidos en el medio de cultivo (Franco-Correa, 2009; Rodríguez-Villarreal *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* por actinobacterias del estado de Guanajuato.

Actinobacterias	Patógenos			Promedio (%) [*]
	<i>R. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	
B21	89.81	44.74	54.1	62.88
B22	96.18	100	100	98.73
B37	95.54	57.89	97.54	83.66
Promedio (%)	93.84	67.54	83.88	81.76

^{*} = porcentaje promedio obtenido con la fórmula de Ezziyani *et al.* (2004).

Es de hacer notar que la cepa B22 presentó consistencia en el porcentaje de inhibición a los tres patógenos de Chile, mientras que B21, mostró una capacidad reducida de inhibición para los tres patógenos. El patógeno que presentó el PICR mayor por las tres cepas de actinobacterias fue *R. solani* con un valor promedio de 93.84%, mientras que *P. capsici* presentó menor PICR por todas las cepas de actinobacterias con 67.54% (Cuadro 1).

De acuerdo con Medina *et al.* (2014) el PICR promedio que se obtuvo para *P. infestans* fue de 77.65 y 75.33% con las dos mejores cepas de actinomicetos de 14 cepas evaluadas; mientras que para *R. solani* el PICR promedio que obtuvieron fue de 100 y 83.83%, respectivamente, resultados similares a los obtenidos en este ensayo (PICR 93.84%).

Por otro lado, si bien las cepas B21 y B22 pertenecen al mismo municipio, también difieren en el potencial antagonico, para el control de *P. capsici* y *F. oxysporum* (Cuadro 1), de acuerdo con Anwar *et al.* (2016), las actinobacterias poseen diferentes mecanismos de acción en la inhibición de agentes fitopatógenos, ya que producen sideróforos y sustancias antibióticas y fungicidas diferencialmente, aun cuando las cepas pertenezcan a la misma especie y al nicho ecológico.

Los resultados obtenidos de la inoculación de las actinobacterias en plantas de chile mostraron que la altura de planta y el peso fresco de frutos fueron las variables que incrementaron sus valores con las tres cepas con respecto a los valores de las plantas testigo (Figura 1). La longitud de raíz y longitud de frutos no mostraron efectos estadísticamente significativos con respecto al testigo para ninguna de las cepas de actinobacterias (Figura 1).

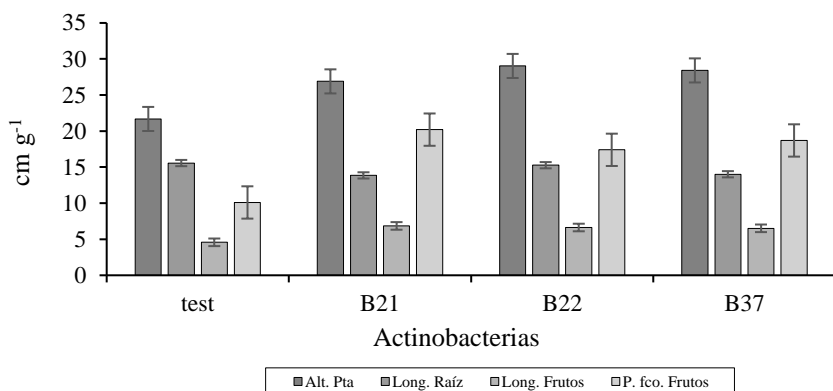


Figura 1. Efecto de la aplicación de actinobacterias en las variables. Alt. pta= altura de planta; long. raíz= longitud de raíz; long. frutos= longitud de frutos y p. fco. frutos= peso fresco de frutos en plantas de chile.

Cuantitativamente hablando la cepa B22 mostró mayor efecto en las cuatro variables evaluadas en las plantas que las otras dos cepas, estableciendo una correlación con el efecto de mayor PICR para los tres patógenos evaluados; sin embargo, aún está por definirse el tipo de metabolitos que promueven el crecimiento de las plantas como la inhibición de patógenos.

Los resultados obtenidos en las variables evaluadas de las plantas de chile se atribuyen a que las actinobacterias fungieron como promotores de crecimiento, induciendo el incremento de la producción de ácido indol acético (AIA), auxina que naturalmente produce la planta, mostrando un efecto en el crecimiento del grosor y longitud de tallo, así como en los frutos, además de giberelinas y sustancias similares a las citoquininas, favoreciendo el desarrollo de las plantas y la estimulación del desarrollo de raíces laterales y pelos radicales (Palaniyandi *et al.*, 2013).

Conclusiones

Las tres cepas de actinobacterias mostraron un alto potencial inhibitorio contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* a nivel *in vitro* lo que sugiere realizar escrutinios a nivel planta y evaluar si se mantiene el efecto de biocontrol. A nivel planta se observó que la aplicación de actinobacterias promueve el crecimiento de la planta con respecto al testigo. Es deseable establecer el diferencial de metabolitos que actúan y el modo de acción en ambos análisis para definir la mejor combinación en ensayos de manejo de enfermedades.

Agradecimientos

Los autores(as) desean agradecer al CONACYT por la beca de doctorado otorgada a Bertha María Sánchez García; así como, al ITNM-Tecnológico de Roque por facilitar sus instalaciones para realizar esta investigación.

Literatura citada

- Anwar, S.; Ali, B. and Sajid, I. 2016. Screening of rhizospheric actinomycetes for various *in-vitro* and *in-vivo* plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front. Microbiol.* 7(1):1334-1344. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01334.
- Dávila, M. D.; Gallegos, M. G.; Hernández, C. F. D.; Ochoa, F. Y. M. y Flores, O. A. 2013. Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 4(8):1187-1196.
- Doumbou, C. L.; Hamby-S, M. K.; Crawford, D. L. and Beaulieu, C. 2001. Actinimycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection.* 82(3):85-102.
- Ezziyyani, M.; Pérez, S. C.; Requena, M. E.; Rubio, L.; Ahmed, S. A. and Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología.* 26(1):69-78.
- FAO. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOESTAT: the pesticides use. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>.
- Franco-Correa, M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. Perú. Biol.* 16(2):239-242.
- Gutiérrez-Ramírez, A.; Robles-Bermúdez, A.; Santillán-Ortega, C.; Ortiz-Catón, M. y Cambero-Campos, O. J. 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y enfermedades y su uso en el estado de Nayarit. *Rev. Bio. Cienc.* 2(3):102-112.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protec. Veg.* 24(1):14-21.
- Medina, A.; Koch, A. y Romero, P. 2014. Selección de actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagonicos a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Sangolqui, Ecuador. Ingeniería en Biotecnología. 1-8 pp.
- Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungenuber die morphologische and biologische differenzierungin der *Fusarium*-sektion Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstw. Berlin-Dahlem.* 169(1):1-117.
- Palaniyandi, A. S.; Yang, H. S.; Zhang, L. and Joo-Won, S. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotech.* Doi:10.1007/s00253-013-5206-1.
- Reyes, T. A.; Rincón, E. G.; López, P. L.; Martínez, E. Z. y Quiñones, A. E. 2015. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Rev. Digital Universitaria UNAM.* 16(11):1-15.
- Rodríguez-Guerra, R. 2017. Comunicación personal.
- Rodríguez-Villarreal, R. A.; Peña-Carrillo, K. I.; Fernández-Cruz, E.; Almeyda-León, I. H.; Hernández-Torres, I.; Acosta-Díaz, E. y Rodríguez-Guerra, R. 2014. Antagonismo e identificación genética de un actinomiceto con potencial para el control de *Phytophthora capsici* Leonian (Peronosporales: Pythiaceae). *Vedalia.* 15(1):5-15.
- Villamil, C.; Viteri, R. S. E. y Villegas, O. W. L. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin.* 68(1):7441-7450.