

SELECCIÓN DE CEPAS DE ACTINOMICETOS PARA EL CONTROL DE *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN, *SCLEROTIUM ROLFSSII* SACC, *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID Y *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY EN FRIJOL COMÚN (*PHASOLUS VULGARIS* L.)

Alexander Bernal Cabrera¹, Ricardo Medina Marrero², Neisy Bárbara García Álvarez¹, Milagros García Bernal², Marlen Casanova González², René Cupull Santana¹, Micaela Hernández García² y José Raúl Arias Díaz¹

¹ Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Centro de Investigaciones Agropecuarias. alexanderbc@uclv.edu.cu

² Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Centro de Bioactivos Químicos.

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos del suelo, representan en efecto, un grupo de microorganismos que por su hábitat y relaciones ecológicas con otros grupos, requieren métodos muy diferentes tanto para su estudio, como para su control (Herrera, 2004).

Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen en actinomicetos, por su prolífica producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios (Oskay *et al.*, 2004; Prashith *et al.*, 2010)

El uso de estos organismos como agentes de control biológico de enfermedades radiculares es de gran interés en la actualidad, la presencia endofítica de *Streptomyces* sp., puede jugar importantes roles en el desarrollo y salud de plantas, ya que ellos pueden afectar el crecimiento de las mismas por la asimilación de nutrientes o por la producción de metabolitos secundarios (Behal, 2000; Tokala *et al.*, 2002; Sánchez-Yáñez, *et al.*, 2007)

MATERIALES Y MÉTODOS

Actinomicetos: Se utilizaron 69 cepas, de una colección de más de 700 cepas, pertenecientes al Departamento de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos, las cuales fueron seleccionadas al azar a partir de su actividad antagonista contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Hongos fitopatógenos: Los hongos fitopatógenos por su importancia agrícola fueron *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rofsii*, *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotinia sclerotiorum*, pertenecientes a la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Microbiología agrícola del Centro de Investigaciones Agropecuarias.

Actividad antagónica *in vitro* de los actinomicetos contra los hongos fitopatógenos: Se utilizó el método de confrontación en medio de cultivo Agar Caseína Almidón. Para ello, se colocaron discos de actinomicetos de 6 mm de diámetro en cuatro puntos equidistantes de la placa de Petri, luego se colocó un disco de igual diámetro del hongo fitopatógeno en el centro de cada placa (Castillo-Fabela *et al.*, 2001). También se sembraron discos de 6 mm de diámetro en el centro de placas de PDA sin actinomicetos como control de crecimiento de los agentes fitopatógenos. La incubación se realizó a 28±2°C durante siete días y se midió el diámetro del área de inhibición para cada pareja de hongo-actinomiceto (Misk y Franco, 2011, Cuesta *et al.*, 2012). Se seleccionaron las cepas de actinomicetos de mayor espectro de actividad antagonista frente a los hongos fitopatógenos en estudio.

Actividad quitinolítica: Se sembraron las cepas de actinomicetos en placas de Agar Quitina Coloidal a pH 7, luego se incubaron a 28±2°C, por siete días, tiempo en que se midieron los

halos de aclaramiento alrededor de las colonias como indicadores de la presencia de quitinasas (Kawase *et al.*, 2004).

Actividad celulolítica: Se sembraron las cepas de actinomicetos en placas de Agar Extracto de Levadura-Extracto de Malta (ISP2) conteniendo celulosa (1%, p/v) a pH 7,2; luego se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días, se agregó solución de rojo congo (1%) como revelador durante 15 minutos, luego se eliminó la solución de rojo congo y se añadió NaCl (1M) durante 15 minutos. Se determinó la razón entre el diámetro del halo de aclaramiento con el diámetro de la colonia (El-Sersy *et al.*, 2010).

Actividad proteolítica: Para determinar la actividad proteolítica se sembraron las cepas de actinomicetos en agar ISP2 suplementado con leche descremada al 1%, luego se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días. Se midió la actividad proteolítica por la presencia de un halo incoloro alrededor de las cepas de actinomicetos (Das *et al.*, 2010).

Capacidad de solubilización de fosfato: Para determinar la capacidad de las cepas de actinomicetos de solubilizar fosfatos, éstas se sembraron en placas de Petri con medio Pikovskaya y se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días. La formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias se tomaron como positivos a la prueba (Franco-Correa *et al.*, 2010, Misk y Franco, 2011). Las mediciones de los halos de aclaramiento se llevaron a cabo al tercer y sexto día del ensayo.

Procesamiento estadístico de los datos: El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 21 para Windows. Se realizó una comparación de medias de tratamientos, mediante la prueba de HSD Tukey. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo de antagonismo *in vitro* (Figura 2) mostró que de 69 cepas de actinomicetos, 21 no mostraron actividad contra ninguno de los hongos fitopatógenos evaluados. El resto mostró actividad contra uno o varios hongos. Así, 26 cepas presentaron antagonismo contra *S. sclerotiorum*, 2 contra *S. rolfsii*, 39 contra *M. phaseolina* y 11 contra *R. solani* en placas de Agar caseína almidón tras siete días de incubación. La mejor actividad contra *S. sclerotiorum* fue exhibida por la cepa Be6 (25 mm), contra *S. rolfsii* por la cepa g55 (25 mm), contra *M. phaseolina* por la cepa C5 (40 mm) y contra *R. solani* por la cepa Be6 (10 mm). Sólo las cepas g55 y L2, con potente actividad contra un hongo específico, tuvieron actividad antifúngica de amplio espectro contra los diferentes hongos fitopatógenos evaluados. El resto de las cepas con actividad antimicrobiana de amplio espectro incluye a las cepas B8, EA2, EBa21, EBe3, ECa22, J4, J11, L2 y g90.

De las 69 cepas evaluadas se eligieron siete cepas con actividad de amplio espectro, las cuales se reevaluaron contra los diferentes hongos fitopatógenos y se les realizó el análisis estadístico que se muestra en la Tabla 2. Dichas cepas fueron escogidas para estudios posteriores de determinación de actividad enzimática.

Tabla 2. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de siete cepas de actinomicetos mediante la determinación del halo de inhibición del crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos de *Phaseolus vulgaris* L.

Cepas	Halo de inhibición vs <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		Halo de inhibición vs <i>Rhizoctonia solani</i>		Halo de inhibición vs <i>Macrophomina phaseolina</i>	
	Medias reales	Rango promedio	Medias reales	Rango promedio	Medias reales	Rango promedio
B8	12.2	18 ^c	6	40.6 ^{bc}	14.3	46.5 ^b
EA2	15.5	45.5 ^{ab}	6	40 ^{bc}	7	15.5 ^c
EBa21	14.3	32.7 ^c	5.5	33.5 ^c	31	65.5 ^a
EBe3	14.7	29.6 ^c	3	15.25 ^d	13	36 ^b
J4	16.5	43.05 ^{ab}	7	53.4 ^{ab}	13.5	39.25 ^b
J11	20	58.75 ^a	6	38.5 ^{bc}	2	5.5 ^d
L2	12.3	20.9 ^c	4.9	27.25 ^{cd}	15.4	40.25 ^b

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis complementada con el test de Mann Whitney para $p < 0,05$.

El mayor halo de inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* se obtuvo con las cepas J11, J4 y EA2 con diferencias significativas en relación con el resto de las cepas. Contra *Rhizoctonia solani* las cepas J4, J11, B8 y EA2 mostraron los mejores valores de actividad; mientras que contra *Macrophomina phaseolina* la cepa EBa21 mostró una actividad antagonista significativamente superior al resto de las cepas.

Las siete cepas de actinomicetos que se evaluaron fueron capaces de utilizar la quitina coloidal como única fuente de carbono, mostrando crecimiento y presentando una zona de hidrólisis alrededor de la colonia, indicando actividad quitinolítica. La actividad más alta la presentó la cepa EBa21 con valores significativamente superiores al resto de las cepas, seguida por las cepas EA2, EBe3, J4, L2 y B8. La actividad más baja la presentó la cepa J11 (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad quitinolítica de siete cepas de actinomicetos en medio agar quitina coloidal.

Cepas	Halo de hidrólisis de Quitinasas (mm)	
	Rango promedio	Medias reales
B8	26.00 ^b	8.1
EA2	45 ^b	15.5
EBa21	65.50 ^a	26.5
EBe3	38.75 ^b	14
J4	36.25 ^b	13.5
J11	5.50 ^c	2.5
L2	31.50 ^b	11.5

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis complementada con el test de Mann Whitney para $p < 0,05$.

La actividad celulolítica se evidenció revelando las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias utilizando rojo congo al 1% (p/v) (Figura 3). La actividad varió desde 2-44 mm; presentando las cepas L2, EA2 y J4 (Tabla 4) halos de hidrólisis significativamente más elevados que el resto de las cepas evaluadas.

Tabla 4. Actividad celulolítica de las cepas de actinomicetos en medio conteniendo celulosa.

Halo de hidrólisis de celulosa (mm)		
Cepas	Rango promedio	Medias reales
B8	30.50 ^c	10.8888889
EA2	55.75 ^a	37.5
EBa21	33.70 ^{bc}	4
EBe3	10.15 ^e	3
J4	40.35 ^{ab}	27.6
J11	37.70 ^b	18.2
L2	57.65 ^a	43.6

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis complementada con el test de Mann Whitney para $p < 0,05$.

De manera general, se encontró que las cepas de actinomicetos que mostraron mayor actividad antagonista *in vitro* frente a *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *M. phaseolina* y *R. solani* en *Phaseolus vulgaris* fueron Be6, g55, C5, J11, J4, EA2 y EBA21. Además, todas las cepas mostraron actividad enzimática extracelular; siendo la cepa EBA21 la más productora de quitinasas, las cepas EA2, J4 y L2 de celulasas y las cepas EA2 y B8 de proteasas.

REFERENCIAS

- Behal, V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.*47:113-157.
- Castillo-Fabela, E., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Cepeda-Siller, M. and Zamora-Villa, V. M. 2001. Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*, *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(2), p. 204.
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., Torriani-Gorini, A., Yagil, E. and Silver, S. 2012. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents, *Journal of Environmental Management*, 95, pp. S281-S282.
- Das, S., Ward, L. R. and Burke, C. 2010. Screening of marine *Streptomyces spp.* for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 305, pp. 32-41.
- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H. and El-Toukhy, N. M. K. 2010. Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology* 9(38), p. 6355-6364.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X. and Barea, J. M. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45(3), pp. 209-217.
- Herrera L. 2004. Los hongos fitopatógenos el suelo en Cuba. Tesis presentada para la obtención del título científico de Doctor en Ciencias. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. 287 p.
- Kawase, T., Saito, A., Sato, T., Kanai, R., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K. and Watanabe, T. 2004. Distribution and Phylogenetic Analysis of Family 19 Chitinases in Actinobacteria, *Appl Environ Microbiol*, 70(2), pp. 135-1144.
- Misk, A. and Franco, C. 2011. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria, *Biocontrol* 56(5), p. 811-822.
- Oskay, M.; Tamer, A. U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomicetos isolated from farming soils of Turkey. *Afric J. Biotechnol.* 3:441-6.
- Prashith, K.; Shobha, K. S. and Onkarappa, R. 2010. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharmacy Res.*3:250-6.

Sánchez-Yáñez, J. M.; Villegas, M. J. y Márquez, B. L. 2007. El papel de los actinomicetos en la agricultura. Laboratorio de Microbiología ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

Tokala, K.; Strap, C.; Jung, D.; Crawford, L.; Salove, L.; Deobald, F.; Bailey, J. and Morra, J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68:2161-2171.