

SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS PAPEROS DE LA PROVINCIA DE LOJA, ANTAGÓNICOS A *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, MEDIANTE ENSAYOS *in vitro* Y PRUEBAS DE INVERNADERO EN *Solanum tuberosum* L.

MEDINA, A.*; KOCH, A.*; ROMERO, P.*

* Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ingeniería en Biotecnología.
Sangolquí, Ecuador

Recibido: 10 de marzo de 2014.

RESUMEN

El cultivo de papa en el Ecuador es afectado por *Phytophthora infestans*, agente causal del Tizón tardío o lancha que en condiciones favorables puede destruir un sembrío de papa en cuatro días, atacando al follaje. En el País no hay reportes sobre la infección de tubérculos por *P. infestans*, por lo que se ha planteado el estudio de la supresividad de los suelos paperos. Existen varios factores físicos-químicos, ambientales y microbiológicos que pueden estar relacionados con la supresión. El objetivo general del estudio fue seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagonistas a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos *in vitro* y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L. Se realizaron pruebas duales en cajas Petri enfrentado los actinomicetos a *P. infestans* y *R. solani*, en ambas pruebas existieron diferencias significativas con un valor $p < 0.0001$ en la capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos. Los actinomicetos seleccionados en laboratorio se utilizaron sobre folíolos de papa para antagonizar a *P. infestans*; se obtuvo 100% de inhibición del patógeno. También se probaron cepas de actinomicetos en invernadero contra *R. solani*; no se observó antagonismo y el patógeno colonizó las plantas. La inhibición se debe a que los actinomicetos secretan antibióticos y enzimas líticas que afectan la pared celular de los patógenos. Los resultados obtenidos aportan información sobre la capacidad de biocontrol de los actinomicetos sobre *P. infestans* y *R. solani*.

Palabras claves: Tizón tardío, rhizoctoniasis, microorganismos antagonistas, control biológico.

INTRODUCCIÓN

En las tierras altas de América del Sur se encuentra la mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.). En Ecuador es cultivada en Carchi, Pichincha, Riobamba y Loja. Constituye la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país.

La papa se puede considerar un producto importante del Ecuador, sobre todo como alimento de su población y apoyo económico a las comunidades que la producen. La papa es sensible a una amplia gama de enfermedades como la lancha y costra negra que afectan la calidad del tubérculo o pueden causar una pérdida total de los sembríos. Para

evitar estas amenazas los productores toman medidas “preventivas” y tratan los suelos con fungicidas así no haya presencia de patógenos que puedan causar daños a la siembra (Andrade et al., 2002).

El uso indiscriminado de fungicidas pueden causar erosión en el suelo dejándolo improductivo y provocar resistencia en los patógenos. Una opción eficiente y amigable con el ambiente es el control biológico de las enfermedades fúngicas en plantas, como una alternativa o complemento de los fungicidas (Vargas, 2006).

Por ello es importante establecer un estudio del antagonismo que presentan cepas de actinomicetos aislados de suelos paperos de la región andina del Ecuador contra *P. infestans* y *R. solani*, con miras a establecer un control biológico del tizón tardío o lancha y rhizoctonias por parte de actinomicetos.

La presente investigación tuvo por objetivo seleccionar actinomicetos aislados de suelos paperos de la provincia de Loja, antagónicos a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary y *Rhizoctonia solani* Kühn, mediante ensayos in vitro y pruebas de invernadero en *Solanum tuberosum* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Activación de actinomicetos

Las 15 cepas de actinomicetos fueron proporcionadas por el cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Las cepas fueron aisladas de la provincia de Loja y liofilizadas por Villamarín (2011).

Para activar las cepas se utilizó la metodología de Franco *et al.*, (2009), el medio de activación fue caldo glicerol extracto de levadura y el de resiembra (YGA) agar glicerol extracto de levadura (Brown, 2001).

Aislamiento de *R. solani*

El aislamiento del hongo se hizo a partir de tubérculos de papa que tenían esclerocios de *R. solani*, las papas se lavaron con agua estéril, se cortaron los esclerocios y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 3%, etanol al 70% y cloranfenicol (Castillo, 2004), los esclerocios se colocaron en medio PDA modificado por Vargas, (2006). El hongo aislado fue analizado según las claves macroscópicas (Ferrera y Alarcón, 1995) y las claves microscópicas (Sneh *et al.*, 1991)

Mantención de cepas de *P. infestans*

La cepa “ESPE1” fue obtenida del cepario de laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y la cepa CIP84 del cepario del Centro Internacional de la papa. Las cepas se mantuvieron en medio YGA a 18°C (Villamarín, 2011)

Pruebas duales en caja Petri actinomicetos vs *P. infestans* y *R. solani*

Las pruebas duales se realizaron según la metodología de Venner y Martín (2009), donde el antagonista se enfrenta al patógeno a una distancia de 3 cm (figura 1), el medio que se utilizó fue YGA (Brown, 2001), se incubaron las cajas por 22 d a 20°C (Villamarín, 2011). Para *R. solani* los actinomicetos se sembraron 76 h antes que el hongo y las cajas se incubaron por 4 días a 20°C (Villamarín, 2011).

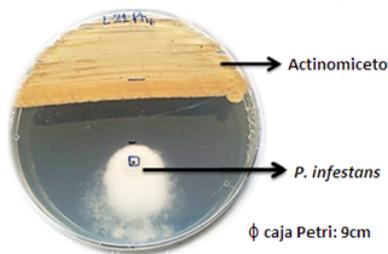


Figura 1: Prueba dual en caja Petri entre la cepa de actinomiceto Loja 21 y cepa *P. infestans* ESPE1, 22 d de incubación.

Se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento radial tanto para *P. infestans* y *R. solani* con la fórmula $PICR = \frac{[(\text{crecimiento libre} - \text{crecimiento influenciado}) / \text{crecimiento libre}] \times 100}{1}$ (Srividya *et al.*, 2012).

Pruebas de antagonismo en folíolos de papa

Los folíolos de papa de la variedad "uvilla" fueron inoculados con 1 mL de solución de actinomicetos con concentración de 2 g de biomasa húmeda por 9 mL de agua y con una gota de 40 μL de *P. infestans* 2×10^4 esporangios/mL (Andrade-Piedra *et al.*, 2005; Lozoya *et al.*, 2006; Maila, 2010).

Pruebas de antagonismo en invernadero

El inóculo de *R. solani* se preparó según la metodología de Paulitz y Schroeder, 2005, donde se colonizaron semillas de avena con el hongo. La solución de actinomicetos consistió en 11 g de biomasa húmeda resuspendida en 40 mL de solución salina, el inóculo se estableció por 24 h en sustrato estéril (El-Tarabily *et al.*, 2008; Jayasinghe & Parkinson, 2008). El sustrato inoculado por los dos microorganismos se colocó en macetas y se sembró un tubérculo de papa de la variedad "superchola" por maceta y estas se cubrieron con una funda plástica por 12 d (Bains y Bisht, 1995).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las pruebas duales se analizaron con la herramienta estadística Kruskal Wallis. Las gráficas descriptivas de datos se efectuaron en Microsoft Office Excel 2010.

RESULTADOS

Activación de actinomicetos

Se activaron 15 cepas de actinomicetos de suelos paperos de la provincia de Loja liofilizados en el 2011 por Villamarín (figura 2).

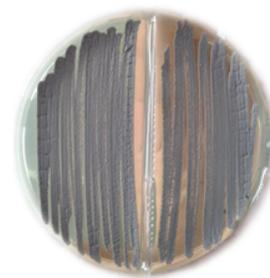


Figura 2: Cepa de actinomiceto de Loja L18 activada en medio YGA, en caja Petri.

Aislamiento de *R. solani*

El aislamiento de *R. solani* a partir de tubérculos infectados se realizó en medio de cultivo PDA en caja Petri (figura 3). Para obtener un cultivo puro sin contaminantes microbianos fue necesario realizar varios repiques sucesivos en medio PDA modificado por Vargas (2006).



Figura 3: Cultivo purificado de *R. solani* en medio PDA en caja Petri.

Pruebas duales en caja Petri actinomicetos vs *P. infestans* y *R. solani*

La figura 4 muestra la interacción entre los actinomicetos y el patógeno donde se puede observar claramente la zona de inhibición.

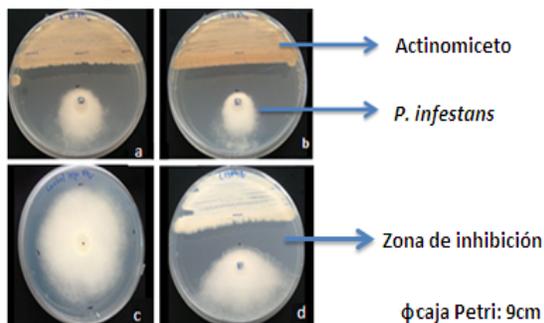


Figura 4: Pruebas duales en caja Petri entre actinomicetos vs *P. infestans*, **a** y **b**. cepas de actinomicetos más antagonicas L48 y L21, **c**. *P. infestans* sin actinomicetos, **d**. zona de inhibición.

Los PICR de las pruebas de inhibición contra *P. infestans* fueron analizados mediante el análisis no paramétrico Kruskal Wallis, para los 15 tratamientos. El resultado que se obtuvo demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la capacidad de los actinomicetos en inhibir el crecimiento del oomicete (tabla 1).

Tabla 1: Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a *P. infestans*.

Trat.	N	Medias	D.E.	H	p	Trat.	Categorías					
L13	6	65.55	3.38	77.64	<0.0001	L18	9	A				
L14	6	16.2	0			L14	9	A				
L18	6	16.2	0			L40	9	A				
L19	6	48.79	6.29			L19	23.83	A B				
L21	6	75.33	4.48			L6	25.25	A B				
L22	6	65.55	6.53			L34	34.7	A B				
L23	6	66.95	2.1			L31	41.33	B C				
L31	6	62.76	4.89			L13	46.75	B C D				
L34	5	59.22	5.79			L22	49.67	B C D				
L37	5	73.18	4.24			L23	50.17	B C D				
L40	5	16.2	0			L9	65.17	C D E				
L41	6	72.07	0			L41	68	C D E				
L48	6	77.65	2.5			L37	69	C D E				
L6	6	49.72	7.9			L21	74.92	D E				
L9	6	71.6	3.71			L48	81	E				

Las cepas seleccionadas con mayor antagonismo a *P. infestans* fueron L48 y L21 con porcentajes de antagonismo de

77.65% y 75.33%, respectivamente. La cepa de actinomiceto con menor antagonismo fue L18 con un porcentaje de 16.2%.

Se efectuó un análisis no paramétrico Kruskal Wallis para los PICR de las pruebas de inhibición contra *R. solani*. El resultado que se obtuvo demostró que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la capacidad de los actinomicetos en inhibir el crecimiento de *R. solana* (tabla 2).

Tabla 2: Prueba no paramétrica Kruskal Wallis de los PICR de 15 cepas de actinomiceto de la provincia de Loja enfrentados a *R. solani*.

Trat.	N	Medias	D.E.	H	p	Trat.	Categorías						
L13	6	64.81	3	82.6	<0.0001	L18	4.5	A					
L14	6	16.79	2.2			L14	8.67	A B					
L18	6	14.41	0			L40	15.83	A B C					
L19	6	43.41	6.1			L9	28.67	A B C D					
L21	6	67.67	6.2			L34	30.33	A B C D					
L22	6	48.17	9.1			L6	35	B C D					
L23	6	45.79	1.8			L19	40.33	C D E					
L31	6	80.03	3.1			L22	44.83	C D E					
L34	6	40.09	4.4			L23	45.17	C D E					
L37	6	100	0			L48	52.5	D E F					
L40	6	24.39	5.3			L13	65.25	E F G					
L41	6	83.83	9			L21	67.25	E F G					
L48	6	52.92	7.2			L31	78.17	F G					
L6	6	42.94	0			L41	79	F G					
L9	6	38.66	5.3			L37	87	G					

Las cepas seleccionadas con mayor antagonismo a *R. solani* fueron L 37 y L41 con porcentajes de antagonismo de 100% y 83.83%, respectivamente. La cepa de actinomiceto con menor antagonismo fue L18 con un porcentaje de 14.41%.

Pruebas de antagonismo en folíolos de papa

Los actinomicetos inhibieron el crecimiento de *P. infestans*, evitando que los folíolos se infecten por el oomicete. La figura 5 muestran la inhibición de *P. infestans* por la cepa de actinomiceto L21.

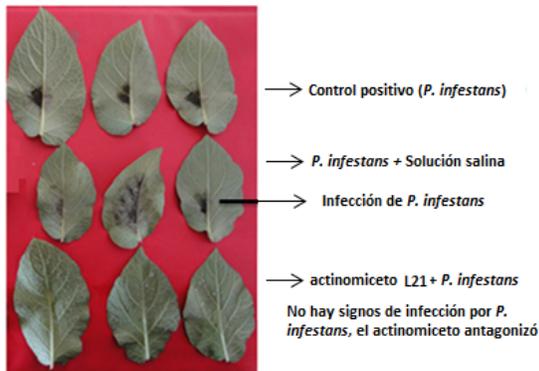


Figura 5: Pruebas de antagonismo en folíolos de papa variedad "uvilla": actinomiceto L21 vs *P. infestans* CIP84.

La figura 6 corresponde a los porcentajes de inhibición a *P. infestans* de las cepas de actinomicetos en folíolos. Se observa que las cepas L48 y L21 seleccionados en las pruebas duales *in vitro* inhibieron en 100% a *P. infestans*. El control negativo del actinomiceto cepa L18 no inhibió al patógeno

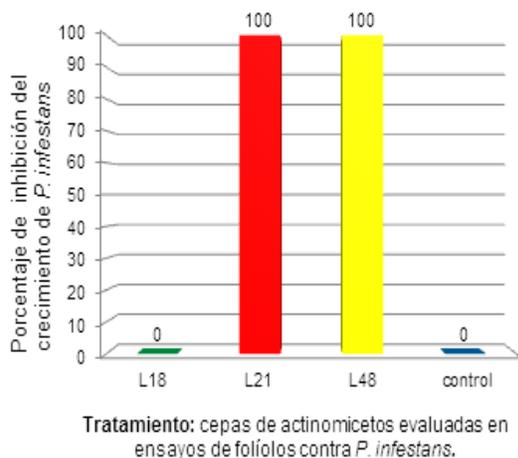


Figura 6: Porcentajes de inhibición de las cepas de actinomicetos de la provincia de Loja L18, L21 y L48 contra *P. infestans* en pruebas antagonicas con folíolos de papa de la variedad "uvilla".

Pruebas de antagonismo en invernadero

Los porcentajes de infección por *R. solani* fue de 100% para todas las cepas de actinomiceto L37, L41 y L18 (figura 7).

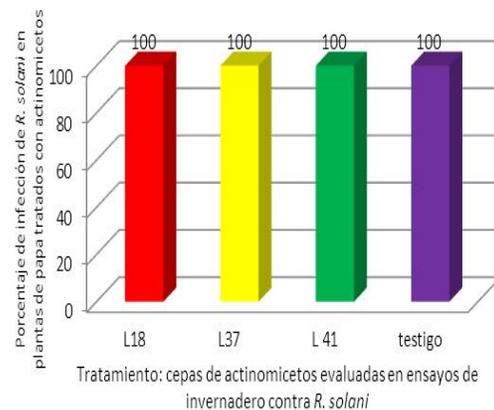


Figura 7: Porcentajes de infección de *R. solani* en plantas de papa variedad "superchola" en pruebas de antagonismo de *R. solani* vs. actinomicetos a nivel de invernadero.

DISCUSIÓN

Los actinomicetos mostraron inhibición tanto *P. infestans* como a *R. solani*, corroborando datos de investigaciones realizadas por Castillo, 2004; Lozoya *et al.*, 2006; Villamarín, 2011 y Dávila *et al.*, 2013, en los que se evaluó la capacidad antagonica de cepas de actinomicetos contra varios patógenos como *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *R. solani* y *P. infestans*. Las cepas presentaron diferentes niveles de inhibición, por ejemplo, la cepa de actinomiceto AAH53 tuvo porcentajes de inhibición de 53.08; 49.36 y 61.57% para *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, respectivamente.

Iznaga *et al.*, (2003), reportó cepas de actinomicetos aisladas de suelo, que producen componentes con actividad antifúngica inhibidoras del crecimiento diametral de patógenos. También se han reportado que actinomicetos endófitos producen metabolitos inhibitorios antifúngicos (Coombs *et al.*, 2004), enzimas degradantes de la pared celular como quitinasas (El-Tarabily, 2003) y glucanasas (Dávila *et al.*, 2013), así como sideróforos (Cao *et al.*, 2005) y la inducción de resistencia sistémica (Conn

et al., 2006) citados por (El-Tarabily et al., 2008).

La presencia de quitinasas y glucanasas esta relacionada directamente con la resistencia a *P. infestans* (Salas y Zamora, 2009), debido a que la pared celular del oomicete está compuesta por celulosa y β -glucano a diferencia de los hongos (Erwin y Ribeiro, 1996). Por lo tanto, se puede presumir que las glucanasas secretadas por los actinomicetos degradan la pared celular produciendo la lisis del patógeno, mientras que las quitinasas degradan la quitina de la pared celular de *R. solani* provocando que no se desarrolle.

Los actinomicetos actuaron de manera similar en los ensayos de antagonismo con folíolos de papa. Franceschi (2005) señala que los actinomicetos, ayudan a incrementar los mecanismos de defensa propios de las plantas, aumentando la secreción de sustancias que limitan el crecimiento de hongos fitopatógenos (Vassilev et al., 2006; Jain y Jain, 2007) o estimulando las defensas naturales de la planta (Prévost et al., 2006; Lehr et al., 2008).

Por lo tanto, se podría decir que las respuestas naturales de defensa de los folíolos contra el patógeno se aumentaron por la secreción de glucanasas por parte de los actinomicetos, inhibiendo el crecimiento de *P. infestans*. Al observar al microscopio los folíolos inoculados con actinomicetos y *P. infestans* no se encontraron esporangios visibles, micelio o alguna otra estructura del oomicete.

Existen estudios donde los actinomicetos antagonistas que mostraron actividad antifúngica *in vitro* fueron inactivos *in vivo*. En la mayoría de los casos donde los actinomicetos no inhibieron *in vitro* tampoco lo hicieron *in vivo* (Broadbent et al. 1971; citado por Jung y Byung, 2002)

Los ensayos *in vivo* se realizaron en un invernadero sin control de temperatura y humedad. Probablemente los actinomicetos no inhibieron a *R. solani* por las altas humedad y temperatura que se mantuvieron en el experimento. Algunos autores recomiendan utilizar los metabolitos de actinomicetos para que no se disminuya o anule su efecto de biocontrol contra hongos fitopatógenos en ensayos *in vivo* (Trejo et al., 1998; Whipps, 2001).

CONCLUSIONES

Los actinomicetos tuvieron actividad inhibitoria contra *P. infestans* en las pruebas duales en caja 'petri y en folíolos de papa.

Los actinomicetos seleccionados a nivel *in vitro* antagonicos a *R. solani* fueron inactivos a nivel *in vivo*

RECOMENDACIONES

Se recomienda caracterizar molecularmente las cepas de actinomicetos que presentaron capacidad antagonica a los patógenos *in vitro* para conocer su especie y analizar los metabolitos secundarios que producen, con el fin de elaborar un bioproducto que controle los patógenos.

AGRADECIMIENTO

El trabajo se llevó a cabo gracias a la dirección de Alma Koch, MC. y codirección del Ing.-Mat. Pedro Romero Sáker. Se agradece también la participación de la Lic. Jéssica Maisincho, laboratorista del Laboratorio de Microbiología (Sangolquí - Ecuador) y al Centro Internacional de la Papa por el apoyo al proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade, H., Bastidas, O., & Sherwood, S. (2002). La papa en el Ecuador. *El cultivo de papa en Ecuador*, 21-28.

- Andrade-Piedra, J., Hijmans, R., & Juárez, H. (2005). Simulation of Potato Late Blight in the Andes. II: Validation of the LATEBLIGHT Model. *Phytopathology*, 1200-1208.
- Bains, P., & Bisht, V. (1995). Anastomosis Group Identity and Virulence of *Rhizoctonia solani* Isolates Collected from Potato Plants in Alberta, Canada. *Plant Dis*, 241-242.
- Brown, A. (2001). *Benson's Microbiological Applications*. Auburn: Mc Graw Hill.
- Castillo, C. (2004). Efectividad de Actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 203-207.
- Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., & Flores, A. (2013). Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatogénos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1187-1196.
- El-Tarabily, K., Nassar, A., Hardy, G., & Sivasithamparam, K. (2008). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 13-26.
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. California: APS Press.
- Jain, P., & Jain, P. (2007). Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian J Exp Biol*, 203-206.
- Jayasinghe, D., & Parkinson, D. (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied soil ecology*, 109-118.
- Jung, L., & Byung, H. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 407-417.
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (1995). *Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. México: Limusa.
- Franco, M., Gómez, D., Castro, N., & Rendón, M. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Rev. Perú.biol*, 115-118.
- Iznaga, Y., Lemus, M., González, L., Garmendia, L., Nadal, L., & Vallin, C. (2003). Antifungal activity of actinomycetes from Cuban soils. *Phytotherapy Res*, 494-496.
- Lehr, N., Schrey, S., Hampp, R., & Tarkka, M. (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol*.
- Lozoya, H., Coyote, M., Ferrera, R., & Lara, E. (2006). Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia*, 31-43.

Maila, G. (2010). Validación del Simulador de Epidemias "LateBlight2004" con clones precoces y resistentes de papa (*Solanum tuberosum*). Cutuglagua-Pichincha. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.

Paulitz, T., & Schroeder, K. (2005). A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. *Plant Disease*, 767-772.

Prévost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., & Beaulieu, C. (2006). Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. *Biocontrol*, 533-546.

Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). A identification of *Rhizoctonia* species. *American Phytopathological Society*, 133.

Srividya, S., Adarshana, T., Deepika, V. B., Kajingailu, G., & Nilanjan, D. (2012). *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 163-173.

Trejo, S., Rivas, I., & Crawford, D. (1998). In vitro and in vivo antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 865-872.

Vargas, F. (2006). Caracterización del Antagonismo a *Rhizoctonia solani* Kuhn en suelos paperos del Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.

Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol*, 137-144.

Venner, R., & Martin, M. (2009). Aislamiento y selección de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

Villamarín, D. (2011). Capacidad de infección de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en suelos paperos, procedentes de las provincias de Carchi, Pichincha, Chimborazo y Loja y su inhibición por actinomicetos nativos. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 487-511.