

## EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE ACTINOMICETOS SOBRE EL AGENTE CAUSAL DEL TIZÓN DE HALO EN FRIJOL

### *in vitro* BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF ACTINOMYCETES UPON THE CAUSAL AGENT OF HALO BLIGHT OF COMMON BEAN

Gabriel Rincón-Enríquez<sup>1</sup>, Luis López-Pérez<sup>2</sup> y Evangelina E. Quiñones-Aguilar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Av. Normalistas No. 800, Colinas de la Normal. 44270, Guadalajara, Jalisco. México. Tel. 01 (33) 33455200. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. El Trébol. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México. Tel. 01 (443) 2958323/24.

\*Autor para correspondencia (eqaguilar08@gmail.com)

#### RESUMEN

El desarrollo de inoculantes elaborados con base en microorganismos del suelo para su empleo como agentes de control biológico de fitopatógenos, es una estrategia que podría contribuir a disminuir el uso de agroquímicos, en particular en el control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PspH). En este estudio se evaluó *in vitro* la efectividad inhibitoria de 80 cepas de actinomicetos aisladas de suelos agrícolas sobre el agente causal del tizón de halo en frijol (PspH) y seleccionar las de mayor actividad antibacteriana (AAB). Para estimar el potencial de los aislados como agentes de control biológico de PspH, se evaluó su AAB *in vitro* por medio de ensayos de confrontación directa contra la cepa 1448A de PspH sobre medio de cultivo PDA (pH 7). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, con un total de 81 tratamientos (80 actinomicetos confrontados con PspH y un testigo comprendiendo únicamente a la bacteria fitopatógena), con tres repeticiones. La variable de respuesta evaluada fue el área de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae* (AIPS) determinada mediante una escala ordinal de inhibición. El análisis estadístico mediante Kruskal-Wallis presentó diferencias significativas entre cepas de actinomicetos en cuanto a su actividad antibacteriana, donde cinco cepas inhibieron por completo el crecimiento bacteriano. Estos resultados muestran el potencial de unas cepas de actinomicetos como agentes de control biológico del tizón de halo del frijol provocado por la bacteria fitopatógena PspH.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, antagonismo *in vitro*.

#### SUMMARY

The development of inoculants based on soil microorganisms for use as biological control agents of plant pathogens is a strategy that may reduce the use of agrochemicals, particularly for controlling diseases caused by pathogenic bacteria such as *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PspH). This study evaluated the *in vitro* inhibitory effectiveness of 80 actinomycete strains isolated from agricultural soils against the causal agent of halo blight in bean (PspH) and selected the highest antibacterial activity (ABA). To estimate the effectiveness of isolates as potential agents for the biological control of PspH, *in vitro* antibacterial activity was evaluated by direct confrontation against PspH strain 1448A on PDA culture medium (pH 7). The experiment was established in a completely randomized design, with 81 treatments (80 actinomycetes confronted with PspH and a control comprising only the phytopathogenic bacteria), with three replications. The recorded

response variable was the inhibition growth area of *Pseudomonas syringae* (IAPS) determined by an ordinal inhibition scale. Statistical analysis by Kruskal-Wallis reported significant differences between actinomycetes strains on ABA, and five of them inhibited absolutely bacterial growth. The results suggest the potential of actinomycetes as biocontrol agents for bean halo blight caused by PspH.

**Index words:** *Phaseolus vulgaris*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *in vitro* antagonism.

#### INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa el segundo lugar por superficie cultivada en México. La mayor importancia de este cultivo radica en el papel que desempeña en la economía de los agricultores y como fuente vital de proteínas para la mayoría de la población mexicana. A pesar de ser un producto necesario, la producción de frijol en México es sensible a las condiciones ambientales, a problemas fitosanitarios y al desarrollo y transferencia de tecnología (SDR, 2007). En el caso específico del frijol producido en condiciones de temporal (secano), una enfermedad que se presenta con frecuencia es el tizón de halo (Campos, 1987) provocada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (PspH). Esta enfermedad ocurre con frecuencia en regiones con clima templado y periodos de lluvias definidos y abundantes, por ejemplo en los Estados de Aguascalientes, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, San Luis Potosí, Morelos, Veracruz, Querétaro, Hidalgo y el Estado de México (Navarrete y Acosta-Gallegos, 2000). En Michigan, Estados Unidos, se estimó una pérdida en rendimiento de 23 a 43 % por efecto del tizón de halo (Schwartz, 1989).

Este problema del frijol en México conduce a rendimientos bajos e inestables, que podría solucionarse mediante investigación y desarrollo y transferencia de tecnologías. El desarrollo de tecnologías podría incluir el diseño de nuevas estrategias de control biológico de enfermedades que afectan a los cultivos agrícolas y perjudican directamente a los productores, para reducir las pérdidas económicas de estos

y a la vez disminuir el impacto ambiental.

En general, el control biológico de enfermedades en plantas se refiere al uso de organismos o sus productos para el combate de problemas fitosanitarios provocados principalmente por bacterias, hongos y nematodos. Los actinomicetos, por la gran diversidad de antibióticos y otros metabolitos bioactivos que producen, representan un grupo prometedor de microorganismos para utilizarse como agentes de control de fitopatógenos. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la efectividad inhibitoria de 80 cepas de actinomicetos aisladas de suelos agrícolas de los Estados de Michoacán y Aguascalientes sobre el agente causal del tizón de halo en frijol (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) y seleccionar las de mayor actividad antibacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

La bacteria fitopatógena empleada en las pruebas de actividad antibacteriana fue *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* cepa 1448A (Psph) raza 6 (Mansfield *et al.*, 1994).

Aislamiento de actinomicetos del suelo

El aislamiento de actinomicetos nativos se hizo a partir de dos suelos agrícolas del Estado de Michoacán, El Limón (EL) y Cerro del Metate (CM) de rizosfera de agave (*Agave* spp.); y de un suelo del Estado de Aguascalientes Cosío (CS) (Cuadro 1), por medio de la técnica de diluciones decimales seriales y siembra en placa de agar. La primera dilución de cada muestra se realizó con el equivalente a 10 g de suelo seco en 90 mL de agua destilada estéril (dilución 10<sup>-1</sup>), y posteriormente se hicieron diluciones decimales progresivas para obtener las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>. Las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> (100 µL) se sembraron en placas de agar de 90 x 15 mm que contenían Papa Dextrosa Agar (PDA-DIFCO) como medio de cultivo, a un pH de 8.5. La purificación de cepas consistió en hacer al menos tres resiembras de cada actinomiceto aislado.

Confrontación *in vitro* de actinomicetos contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

La actividad inhibitoria de los actinomicetos contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* se determinó *in vitro* por medio de un experimento de confrontación directa. El medio de cultivo empleado fue PDA pH 7, en placas Petri de 90 x 15 mm. La siembra de cada actinomiceto se hizo sobre el medio de cultivo por estría en el centro de la caja (1 cm), y la cepa bacteriana se sembró a un lado de cada actinomiceto sobre una superficie de 2 x 2 cm al dispersar con espátula de Drigalsky 10 µL de un cultivo bacteriano de 16 h de crecimiento, ajustada a una densidad óptica (600 nm) de 2, equivalente a aproximadamente 2 x 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de cultivo (Figura 1). Las pruebas de confrontación entre actinomicetos y Psph se realizaron con 80 aislados (ABV01-ABV80), y el testigo comprendió únicamente a la bacteria fitopatógena. Después de 5 d en incubación a 26 °C, la inhibición de Psph se evaluó cuando las placas correspondientes al testigo presentaban crecimiento total sobre la superficie del medio de cultivo.

Determinación de la actividad antibacteriana de Psph por medio de actinomicetos

Para determinar la actividad antibacteriana, la variable de respuesta evaluada fue el área de inhibición del crecimiento de Psph (AIPS) por efecto de los distintos actinomicetos, de acuerdo con la escala ordinal propuesta en la Figura 2.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los 81 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar que incluyen al tratamiento testigo que contenía únicamente a la bacteria fitopatógena, con tres repeticiones por tratamiento. Con los datos obtenidos del área de inhibición (AIPS) se realizó un análisis estadístico mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis e intervalos de confianza a 95 % de la mediana mediante el programa Statgraphics (2005).

Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo de suelo empleados para el aislamiento de actinomicetos.

Clave de la muestra	Sitio de muestreo	Municipio	Ubicación geográfica	Altitud (m)
CS	Parcela 6	Cosío, Aguascalientes	22° 21' 43.0" N 102° 16' 52.0" O	2000
CM	Cerro del Metate	Tzitzio, Michoacán	19° 34' 22.3" N 100° 56' 27.5" O	1915
LM	El Limón	Morelia-Madero, Michoacán	19° 32' 21.4" N 101° 05' 41.8" O	1886

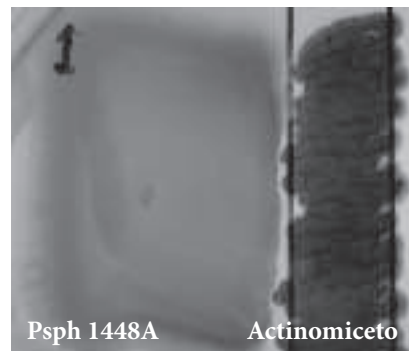


Figura 1. Crecimiento *in vitro* de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) en el área de siembra (4 cm<sup>2</sup>) y del actinomiceto sembrado por estría.

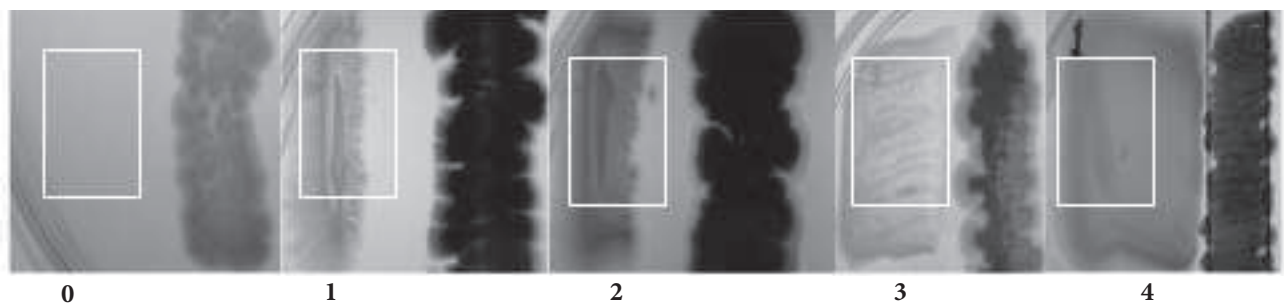


Figura 2. Escala ordinal de inhibición bacteriana por efecto de los actinomicetos. Grado: 0 = (75 a 100 %), 1 = (50 a 75 %), 2 = (25 a 50 %), 3 = (0 a 25 %), y 4 = 0 % de inhibición. En los rectángulos delineados en blanco se muestra el nivel de inhibición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actinomicetos aislados de suelos agrícolas

El crecimiento de actinomicetos se empezó a detectar una semana después de la siembra, y se observó un total de 119 cepas potenciales. Las colonias presentaron la morfología típica de este grupo microbiano: apariencia correosa y pulverulenta, con micelio muy fino aferrado firmemente al medio de cultivo (Figura 3). Luego, durante la etapa de purificación se descartaron 39 aislados por considerarse repetidos o presentar morfología de otro tipo de microorganismo, de modo que para las pruebas de actividad antibacteriana quedaron únicamente 80 aislados, de los cuales 35 provenían de El Limón, 42 de Cerro del Metate y tres de Cosío. La mayor cantidad de actinomicetos se aisló de suelo rizosférico de agave y la menor cantidad se aisló de un suelo agrícola que estuvo cultivado con chile (*Capsicum annuum* L.) en un ciclo anterior.

### Actividad antibacteriana de actinomicetos contra Psph

El análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.01$ )

entre cepas de actinomicetos para la variable AIPS. Estos resultados revelaron que los actinomicetos ABV07, ABV53, ABV55, ABV65 y ABV79 inhibieron completamente el crecimiento de Psph (valor de 0 en la escala ordinal de inhibición (Figura 4), los cuales podrían utilizarse en el desarrollo de productos para el control de la bacteria fitopatógena Psph.

De los 80 actinomicetos evaluados, 14 inhibieron en más de 50 % al crecimiento de Psph, de los cuales cinco lo inhibieron en 100 %, cuatro en 75 % y cinco en 50 % (Cuadro 2). El-Abyad *et al.* (1992) también reportaron un efecto positivo de actinomicetos sobre el control de enfermedades causadas por las bacterias *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas solanacearum* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Sin embargo, este tema que ha sido poco explorado en México, donde la mayoría de los estudios con actinomicetos se han enfocado al control de hongos (Dávila-Medina *et al.*, 2013). En la Figura 5 se muestra la cepa ABV65 que inhibió totalmente el crecimiento de Psph, en contraste con la cepa ABV70 que no la inhibió.

La utilización de actinomicetos como agentes de control biológico ha sido efectivo contra varios fitopatógenos, y algunos

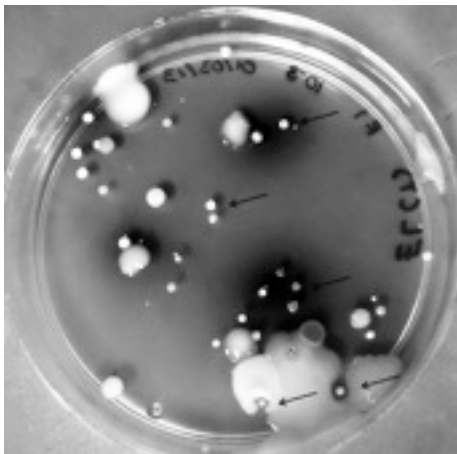


Figura 3. Colonias de actinomicetos (algunas señaladas con flechas) aisladas de El Limón Michoacán.

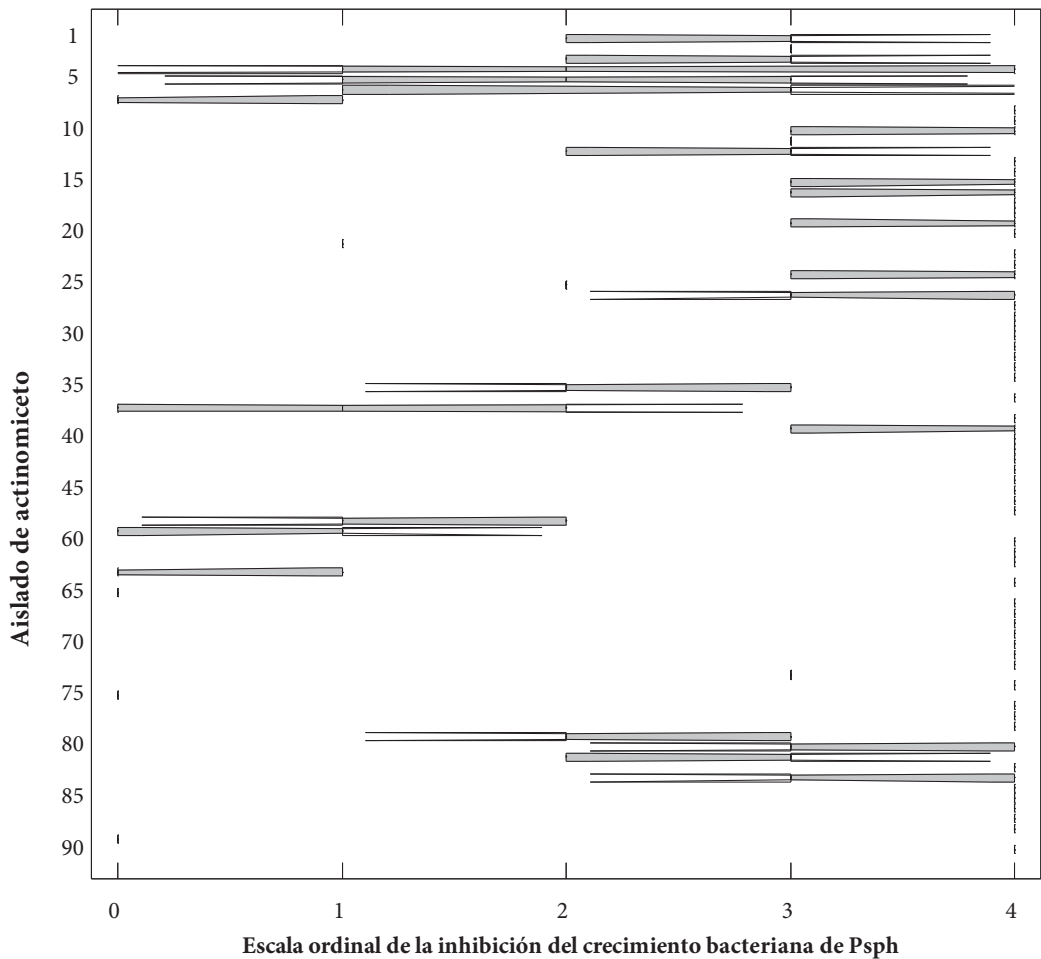


Figura 4. Efecto de 80 cepas de actinomicetos sobre el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* cepa 1448A (Psph), agente causal del tizón de halo de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). La prueba de Kruskal-Wallis produjo un estadístico de 216.3 con un valor de probabilidad de  $P \leq 0.00$ . Las líneas prolongadas de las medianas indican un intervalo de confianza a un nivel de significancia de  $P \leq 0.05$ . Las medianas de inhibición bacteriana se indican con líneas horizontales en cada cepa.

**Cuadro 2. Actinomicetos (ABV) con actividad antibacteriana o inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph), mayor o igual a 50 %.**

Aislado	Origen del actinomiceto	Escala ordinal de inhibición			Porcentaje de inhibición del crecimiento de Psph
		Mediana	Mínimo	Máximo	
ABV04	CM	2	1	4	50
ABV05	CM	2	1	3	50
ABV07	CM	0	0	1	100
ABV21	EL	1	1	1	75
ABV25	EL	2	2	2	50
ABV35	EL	2	2	3	50
ABV37	CM	1	0	2	75
ABV48	CM	1	1	2	75
ABV49	CM	1	0	1	75
ABV53	CM	0	0	1	100
ABV55	EL	0	0	0	100
ABV65	CM	0	0	0	100
ABV69	CS	2	2	3	50
ABV79	CM	0	0	0	100

Sitios de muestreo: CM = Tzitzio; EL = Morelia-Madero, Michoacán; CS = Cosío, Aguascalientes.

productos elaborados con base en esporas de actinomicetos se comercializan como biofungicidas, principalmente del género *Streptomyces*; ejemplos de estos productos son, ACTINOVATE<sup>AG</sup> formulado con base en esporas de la cepa *Streptomyces lydicus*, y Mycostop<sup>®</sup> con base en *Streptomyces griseoviridis*, recomendados para el control de diversos fitopatógenos, principalmente hongos. Productos de este tipo son efectivos contra diversos fitopatógenos causantes de enfermedades en cultivos de importancia comercial, como chile (*Capsicum* spp.), fresa (*Fragaria x ananassa*), uva (*Vitis vinifera* L.), gerbera (*Gerbera* spp.), tomate y algunas especies de la familia *Cucurbitaceae*, entre otros.

Diversos trabajos de investigación han mostrado que los actinomicetos son agentes promisorios para el control biológico de hongos y de bacterias fitopatógenas. Los efectos de antagonismo microbiano por parte de actinomicetos del género *Streptomyces* contra microorganismos fitopatógenos, se han documentado en *S. rochei* contra *Phytophthora* que afecta al cultivo del chile (Ezziyany *et al.*, 2007), y en *S. griseoviridis* contra *Fusarium* que afecta al tomate (Minuto *et al.*, 2006).

Boukaew *et al.* (2011) aislaron y evaluaron la actividad inhibitoria de 265 cepas de *Streptomyces* spp. contra *Sclerotium rolfsii* causante de la pudrición de raíz y tallo en chile, y los 14 mejores aislados fueron también probados contra *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana en chile; los autores encontraron tres cepas efectivas

contra ambos fitopatógenos, una identificada como *S. mycarofaciens* y dos como *S. philanthi*. Los actinomicetos también han sido probados como promotores de crecimiento vegetal, lo que constituye un beneficio adicional en su utilización por los productores agrícolas, además de su uso como biofertilizantes que pueden ser una alternativa viable al empleo de fertilizantes químicos.

## CONCLUSIONES

De las 80 cepas de actinomicetos aisladas de suelos agrícolas de Michoacán y Aguascalientes catorce (17.5 % del total) presentaron actividad antibacteriana contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, con una inhibición del crecimiento *in vitro* de la bacteria igual o superior a 50 %, y de éstas cinco cepas (6 %) causaron inhibición absoluta. Estos resultados muestran el potencial de estos actinomicetos como agentes de control biológico del tizón de halo en frijol, que se lograría por medio de una formulación diseñada especialmente para ser asperjada al follaje, o aplicada al suelo donde está el reservorio de la mayoría de bacterias fitopatógenas.

## AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento recibido mediante el Proyecto AGS-2011-02-181930 del FOMIX-Gobierno del Estado de Aguascalientes-CONACYT. Al Dr. John Mansfield del "Imperial College of London, UK", por haber proporcionado la



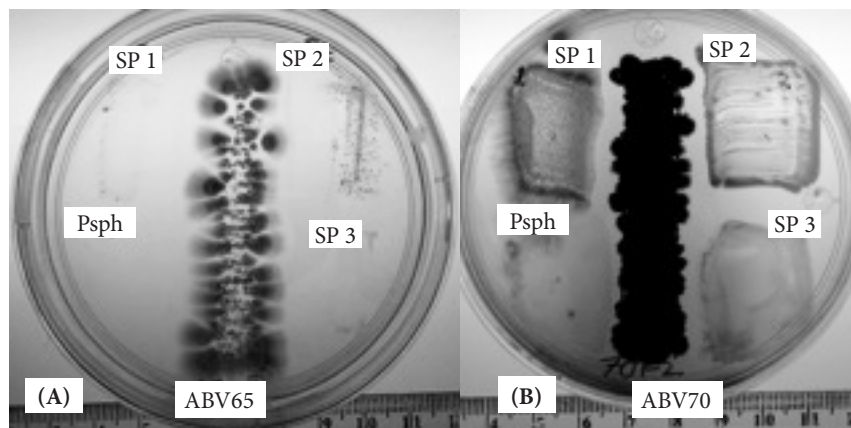


Figura 5. Actividad antibacteriana contrastante de dos actinomicetos contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) en condiciones *in vitro*. (A) Aislado con 100 % de inhibición; (B) Aislado con 0 % de inhibición, en tres especies bacterianas no identificadas (Sp 1, Sp 2 y Sp 3) y en Psph.

cepa bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* cepa 1448A (Psph) raza 6, utilizada en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Boukaew S., S. Chuenchit and V. Petcharat (2011) Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl* 56:365-374.
- Campos A. J. (1987) Enfermedades de Frijol. Ed. Trillas, México. 132 p.
- Dávila-Medina M. D., G. Gallegos M., F. D. Hernández C., Y. M. Ochoa F. y A. Flores O. (2013) Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:1187-1196.
- El-Abyad M. S., M. A. El-Sayerd, A. R. El-Shanshoruy and S. M. El-Sabbagth (1993) Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* 149:185-195.
- Ezziyyani M., M. E. Requena, C. Egea-Gilabert and M. E. Candela (2007) Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology* 155:342-349.
- Mansfield J., C. Jenner, R. Hockenhuill, M. A. Bennett and R. Stewart (1994) Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-bright bacterium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:726-739.
- Minuto A., D. Spadaro, A. Garibaldi and M. L. Gullino (2006) Control of soil borne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection* 25:468-475.
- Navarrete M. R. y J. A. Acosta-Gallegos (2000) Resistencia de frijol al tizón de halo en el valle de México y progreso de la enfermedad. *Revista Fitotecnia Mexicana* 23:17-28.
- Schwartz H. F. (1989) Halo blight. In: Bean Production Problems in the Tropics. H. F. Schwartz and A. Pasto-Corrales (eds.). CIAT, Cali Colombia. pp:285-301.
- SDR (2007) Manual de Producción del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del Estado de Puebla. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. México. 45 p.
- Statgraphics (2005) StatGraphics Centurion: ver. XV (User manual). StatPoint, Inc. USA. 380 p.