

Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola*

Antagonistic actinomycetes against phytopathogenic fungi of agricultural importance

Miriam Desireé Dávila Medina¹, Gabriel Gallegos Morales¹, Francisco Daniel Hernández Castillo¹, Yisa María Ochoa Fuente¹ y Alberto Flores Olivas¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila. Bosques de Echegaray Núm. 2139, Fracc. El Olmo, Saltillo Coahuila, C. P. 25280 (mdesiree77@hotmail.com.; ggalmor@uaaan.mx.; yisa8a@yahoo.com.; fdanielhc@hotmail.com.; afloli@uaaan). Tel. 8444155875. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. Tel. 8444 11 03 26. Autora para correspondiente: ggalmor@uaaan.mx.

Resumen

El trabajo se realizó durante 2008 en Saltillo, Coahuila con el objetivo de aislar actinomicetos en diferentes medios de cultivo y evaluar su efecto antagonista *in vitro* contra hongos fitopatógenos de importancia económica. Para el aislamiento de los actinomicetos se realizaron muestreos de rizósfera de plantas, suelo, larvas y adultos de hormiga; las muestras se trataron con agua fenolizada y se sembraron por difusión en medios de cultivo artificial: Agar Dextrosa Papa (PDA), Agar Caseína Almidón (ACA), Agar de Actinomicetos (AA) y Agar Czapek Dox (ACD). Los aislamientos obtenidos se evaluaron preliminarmente por confrontación y observación. Se obtuvieron 70 aislamientos de actinomicetos en su mayoría de suelo; 25 presentaron efectos antagonistas, cuatro de ellos APA2, AASH48, AAH53 y APC70 se seleccionaron por su actividad inhibitoria y permanencia a través del tiempo. En los bioensayos de antibiosis *in vitro* contra hongos fitopatógenos como *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp. en los medios PDA y ACD, los efectos antagonistas (%-de inhibición) fueron diferentes estadísticamente ($p= 0.05$). Los mejores resultados de inhibición se obtuvieron con *Streptomyces* spp., APC70 contra *Alternaria* (57.6%); mientras que *Streptomyces* spp.,

Abstract

The work was carried out during 2008 in Saltillo, Coahuila with the aim of isolating actinomycetes in different culture media and assess their *in vitro* antagonistic effect against plant pathogenic fungi of economic importance. For the isolation of actinomycetes we sampled rhizosphere of plants, soil, ant larvae and adults, the samples were treated with water and seeded phenolized diffusion in artificial culture media: Potato Dextrose Agar (PDA), Starch Casein Agar (ACA), Actinomycetes agar (AA) and Czapek Dox Agar (CDA). The isolates obtained were evaluated preliminarily by confrontation and observation. 70 isolates were obtained mainly from actinomycetes in soil; 25 showed antagonistic effects, four of them APA2, AASH48, AAH53 and APC70 were selected for their inhibitory activity and permanence over time. *In vitro* bioassays antibiosis against phytopathogenic fungi such as *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* sp. on PDA and ACD mediums, the antagonistic effects (%-inhibition) were statistically different ($p= 0.05$). The best results were obtained with inhibition of *Streptomyces* spp., APC70 against (57.6%); while *Streptomyces* spp., AAH53 was for *Rhizoctonia*, *Fusarium* and *Colletotrichum* in 53.08%,

* Recibido: diciembre de 2012
Aceptado: mayo de 2013

AAH53 lo fue para *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Colletotrichum* en 53.08%, 49.36% y 61.57%, respectivamente. Los actinomicetos saprofitos mostraron potencial antagónico y actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos.

Palabras clave: antibiosis, antagonismo, confrontación, control biológico.

Introducción

En suelos agrícolas se encuentran hongos fitopatógenos tales como *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Colletotrichum* spp., entre otros que atacan cultivos de importancia económica a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas (Gohelet *et al.*, 2006). Con las nuevas regulaciones y restricciones en el uso de plaguicidas y la demanda de productos orgánicos, crece el interés por el uso de tácticas alternativas a los fungicidas para el manejo de enfermedades, particularmente el uso de microorganismos benéficos, y sus metabolitos primarios y secundarios (Ezziyyani *et al.*, 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).

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas y no ácido alcohol resistente, que se caracterizan por formar filamentos ramificados semejantes a los hongos, son saprofitos y sus células son procarióticas; son quimioautótrofos que realizan respiración aeróbica o en algunos casos fermentativa (Bergey *et al.*, 2000). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos, de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado "geosmina" (Ben-Omar *et al.*, 1997). Los actinomicetos son abundantes y cosmopolitas en el ambiente, lagos, ríos, suelo y estiércol de animales; son aerobios y se ubican en la superficie del suelo, aunque también viven en los horizontes inferiores, en especial en suelos alcalinos (Betina, 1994).

Los productos de actinomicetos incluyen principalmente: antibióticos, antifúngicos, metabolitos, enzimas extracelulares (quitinasas, peroxidases, glucanasas),

49.36% and 61.57%, respectively. The saprophytic actinomycetes showed antagonistic potential and inhibitory activity against phytopathogenic fungi.

Key words: antibiosis, antagonism, confrontation, biological control.

Introduction

In agricultural soils there are phytopathogenic fungi such as *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. and *Rhizoctonia* spp. among others that attack economically important crops worldwide, causing large economic losses (Gohelet *et al.*, 2006). With new regulations and restrictions on the use of pesticides and the demand for organic products is growing the interest in the use of alternative tactics to fungicides for disease management, particularly the use of beneficial microorganisms, and their primary and secondary metabolites (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Currently, various investigations have focused on the search for new antimicrobial, mainly originated from actinomycetes, for his prolific natural antibiotics and metabolites (Oskay *et al.*, 2004; Prashith *et al.*, 2010).

The actinomycetes are Gram-positive bacteria and not alcohol-acid resistant, characterized by branching filaments similar to fungi, they are saprophytic and their cells are prokaryotic; they are chemoautotrophs performing aerobic respiration or fermentation in some cases (Bergey *et al.* 2000). They are characterized by not producing mucopolysaccharides, hence being observed on agar plates as dry colonies and not creamy. Among its characteristics have a typical smell of moist soil for producing a metabolite called "geosmin" (Ben-Omar *et al.*, 1997). The actinomycetes are abundant and cosmopolitan in the environment, lakes, rivers, soil and animal manure, are aerobic and are located on the surface of the soil, but also live in the lower horizons, especially in alkaline soils (Betina, 1994).

Actinomycetes products mainly include: antibiotics, antifungals, metabolites, extracellular enzymes (chitinases, peroxidases, glucanases), enzyme inhibitors, neurotransmitters, terpenoids, pigments, and pesticides anticancer among others have a high metabolic activity and are capable of degrading the material plant and animal

inhibidores enzimáticos, neurotransmisores, terpenoides, pigmentos, anticancerígenos y pesticidas entre otros; presentan una alta actividad metabólica y son capaces de degradar la materia orgánica vegetal y animal, producen sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, ayudan a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal. El orden de los Actinomycetales constituye 63 géneros, constituyendo aproximadamente de 20-60% de la población microbiana del suelo (Crawford *et al.*, 1993; Tokala *et al.*, 2002; Ezziyyani *et al.*, 2004; Franco-Correa *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-Yañez, *et al.*, 2007).

Los actinomicetos producen diferentes tipos de metabolitos, por lo cual surgen como una prometedora fuente de controladores biológicos; de ahí la importancia de los objetivos de éste trabajo:

- a) aislamiento de actinomicetos de diversas fuentes naturales y en diferentes medios de cultivo artificial.
- b) evaluación del antagonismo de éstos contra los hongos fitopatogenos *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp. El control microbiológico se plantea como una alternativa ecológica sin repercusión tóxica en el ser humano y con grandes perspectivas en el control de éstos patógenos.

Materiales y métodos

Aislamiento de actinomicetos: Se realizó un muestreo de suelo al azar de diferentes hortalizas, frutales y plantas silvestres (Cuadro 1), recolectando 30 g de muestra de la rizósfera, a una profundidad de 10 a 20 cm; también se recolectaron muestras de suelo de hormigueros, así como de adultos y larvas de hormigas, estas últimas como una fuente de actinomicetos antagonicos.

organic producing siderophores, plant growth promoting substances *in vitro*, helping in iron absorption, nitrogen fixation, which indirectly contributes to the promotion of plant growth. The order Actinomycetales constitutes 63 genres, constituting approximately 20-60% of the soil's microbial population (Crawford *et al.* 1993; Tokala *et al.* 2002; Ezziyyani *et al.* 2004; Franco-Correa *et al.* 2010).

The use of these organisms as biological control agents of root diseases is of great interest today, the endophytic *Streptomyces* sp., playing important roles in the development and health of plants, as they can affect the growth of the same for nutrient uptake or production of secondary metabolites (Behal, 2000; Tokala *et al.*, 2002, Sánchez-Yañez *et al.*, 2007).

Actinomycetes produce different metabolites, thus emerging as a promising source of biological controllers, hence the importance of the objectives of this work:

- a) isolating actinomycetes from various natural sources in different artificial culture media.
- b) evaluation of the antagonism of these phytopathogenic fungi *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* sp. microbiological monitoring is seen as an environmentally friendly alternative without toxic effect in humans and great prospects in the control of these pathogens.

Materials and methods

Isolation of actinomycetes: We conducted a randomized soil sampling of different vegetables, fruits and plants (Table 1), collecting 30 g sample of the rhizosphere, at a depth of 10-20 cm; also collecting soil samples as well as adults and larvae of ants, the latter as a source of actinomycetes antagonistic.

Soil samples were treated with water phenolized for 30 min and then 1 mL spread on Petri dishes with different insulation means as potato dextrose agar (PDA), Starch Casein Agar (ACA), Actinomycetes agar (AA) and Agar Czapek Dox (ACD). In the case of adult and larval ants were placed directly on the culture media. The boxes

Cuadro 1. Relación de lugares de muestreo y tipo de muestras recolectadas.
Table 1. List of sampling locations and type of samples collected.

Localización	Coordenadas	Altitud (msnm)	Muestras
-UAAAN Buenavista, Saltillo, Coah.	25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste	1 742	Hortalizas: papa, zanahoria y tomate Frutales: melón, caña de azúcar y durazno Hormiguero: suelo, larvas y adultos
-Los Lirios Arteaga, Coah.	25°23'30" de latitud norte y 100° 35'16" de longitud oeste.	2 300	Hortalizas: papa y tomate Plantas silvestres: álamo, maguey, palma, pino y nopal Hormiguero: suelo, larvas y adultos
-Navidad Galeana, N.L.	25° 04" de latitud norte y 100° 37" de longitud oeste	1895	Hortalizas: papa y tomate
-San Antonio de las Alazanas Arteaga, Coah.	27° 40' de latitud norte 10° 49' longitud oeste	2180	Plantas silvestres: álamo, maguey, palma, pino y nopal Hormiguero: suelo, larvas y adultos

Las muestras de suelo se trataron con agua fenolizada por 30 min y posteriormente se difundió 1 mL en placas de Petri con diferentes medios de aislamiento como Agar Dextrosa Papa (PDA), Agar Caseína Almidón (ACA), Agar de Actinomicetos (AA) y Agar Czapek Dox (ACD). En el caso de hormigas adultos y larvas se colocaron directamente sobre los medios de cultivo. Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 5 a 7 d. Se aislaron y purificaron actinomicetos en PDA de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas, colonias polvosas, secas que presenten halos de inhibición y en cuya observación microscópica mostraban filamentos característicos (Hayakawa *et al.*, 2004).

Hongos fitopatógenos: los hongos fitopatógenos seleccionados por su importancia agrícola para los diferentes bioensayos de antibiosis fueron *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp., obtenidos de la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Antonio Narro; los cuales fueron sembrados en PDA y conservados a 5 °C.

Pruebas preliminares de antibiosis *in vitro*: se realizaron pruebas preliminares de antibiosis de los actinomicetos contra dos hongos fitopatógenos seleccionados al azar, *Alternaria* sp., y *Colletotrichum* sp., con el fin de elegir aquellos que mostraran actividad antagonista. Para ello, una azada de cada actinomiceto se sembró en los cuatro puntos cardinales de una placa de Petri con PDA, colocando al centro un explante de 4mm de diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 5-10 d. Las pruebas preliminares fueron cualitativas por observación y duplicado, descartando los actinomicetos sin presentar halos de inhibición.

were incubated at 28 ± 2 °C for 5 to 7 d. Actinomycetes were isolated and purified on PDA according to their morphological macroscopic colonies dusty, dry to submit inhibition halos and filaments that microscopic observation showed characteristic (Hayakawa *et al.*, 2004).

Fungal pathogens: pathogenic fungi selected for their importance agricultural antibiosis different bioassays were *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., and *Colletotrichum* sp., obtained from the collection of fungal pathogens of Agricultural Parasitology Laboratory of the Autonomous University Antonio Narro, which were reseeded on PDA and stored at 5 °C.

Preliminary tests of antibiosis *in vitro*: preliminary tests were conducted antibiosis of actinomycetes against two randomly selected fungal pathogens, *Alternaria* sp., and *Colletotrichum* sp., in order to select those that showed antagonistic activity. To do this, a hoe of each actinomycete was grown in the four corners of a Petri dish with PDA, placing an explant center 4mm diameter growth of the pathogen. The plates were incubated at 28 °C for 5-10 d. Preliminary tests were qualitative observational and duplicate, discarding the actinomycetes without presenting inhibition zones.

Bioassays of antibiosis: based on preliminary results presented we selected four actinomycetes antibiotic antagonist activity and permanence over time; APA2 (air insulated), AASH48 (isolated from ant colony), AAH53 (isolated from adult ant) and APC70 (isolated from sugarcane). These isolates were evaluated against *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., and *Colletotrichum* sp. In

Bioensayos de antibiosis: con base en los resultados preliminares se seleccionaron cuatro actinomicetos que presentaron actividad antagonista y permanencia antibiótica a través del tiempo; APA2 (aislado de aire), AASH48 (aislado de suelo de hormiguero), AAH53 (aislado de adulto de hormiga) y APC70 (aislado de caña de azúcar). Éstos aislamientos se evaluaron por confrontación contra *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp. en PDA y ACD. Se sembró una azada de cada actinomiceto en los cuatro puntos cardinales de cada placa con cada medio de cultivo, colocando al centro un explante de 4mm de diámetro del hongo fitopatógeno para su ensayo de inhibición. Las placas se incubaron a 28 °C durante 5-10 d. Cada actinomiceto se tomó como un tratamiento con seis repeticiones (placas de Petri), con un testigo negativo para cada hongo. La antibiosis se cuantificó midiendo el diámetro del crecimiento fúngico con un Vernier digital (Plastic Caliper Modelo 700-130B) en los dos puntos cardinales referentes a la inhibición, reportándose el promedio por placa como una repetición.

Caracterización morfológica y bioquímica de actinomicetos: los aislamientos seleccionados se sembraron por triplicado en PDA y se incubaron a 28 °C por 8-15 d. Se identificaron teniendo en cuenta características macroscópicas de la colonia, coloración del micelio aéreo y sustrato, superficie, forma, tamaño, así como la producción de pigmentos. Para la identificación microscópica de género según Franco-Correa *et al.* (2009), se colocaron cubre-objetos estériles con una inclinación de 45 ° con respecto a la superficie del agar. Las placas se incubaron a 28 °C durante 8-15 d, al cabo de los cuales se tomaron las laminillas y se colocaron en un portaobjetos con cristal violeta para la observación al microscopio compuesto. Se tuvieron en cuenta características observadas por tinción de Gram, como micelio aéreo y vegetativo, fragmentación del micelio en diferentes formas, agrupación de esporas, presencia de espirales, esporas terminales, en pares o grupos en el micelio y se compararon con las descritas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Bergey *et al.*, 2000).

Para la caracterización bioquímica del metabolismo de los actinomicetos, se realizaron pruebas de asimilación y utilización de diversos tipos de sustratos (Cuadro 4), con el fin de determinar el género de los actinomicetos utilizando la metodología convencional y comparando con las características descritas para este género (Bergey *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2008).

Análisis de datos: se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con arreglo bifactorial y seis repeticiones, con un nivel de significancia de 95%. La

PDA and ACD. The plates were incubated at 28 °C during 5-10 d. Each actinomycete was taken as a treatment with six replications (Petri dishes) with a negative control for each fungus. The antibiosis was quantified by measuring the diameter of fungal growth with a digital Vernier (Plastic Caliper Model 700-130B) on the two cardinal points concerning inhibition, reporting the average per plate as a repetition.

Morphological and biochemical characterization of actinomyces: the isolates selected were plated in triplicate on PDA and incubated at 28 °C for 8-15 d. Identified considering the macroscopic characteristics of the colony, coloration of the aerial mycelium and substrate surface, shape, size and pigment production. To identify the genus according to Franco-Correa *et al.* (2009), sterile cover slips were placed at an angle of 45° with respect to the agar surface. The plates were incubated at 28 °C for 8-15 d, after of which the slides were taken and placed on a slide with crystal violet to observe the compound microscope. The characteristics considered were observed by Gram stain, as the aerial and vegetative, fragmentation of mycelium in different forms, grouping spores, presence of spirals, terminal spores, in pairs or groups in the mycelium and compared with those described in the Bacteriological Determination Manual of Bergey (Bergey *et al.*, 2000).

For biochemical characterization of the metabolism of actinomyces, tests were performed assimilation and utilization of various types of substrates (Table 4) in order to determine the gender of actinomyces using conventional methodology and comparing with the characteristics described for this genus (Bergey *et al.* 2000; Koneman *et al.*, 2008).

Data analysis: the statistical design was a completely randomized of two-factor under-six repetitions, with a significance level of 95%. The experimental unit consisted of a petri dish and the variable was the diameter of fungal growth, the factor A was the isolation of different actinomycete into the culture medium and, the factor B were phytopathogenic fungi. To stratify the results was performed an analysis of variance (ANOVA) and mean separation test according to Tukey ($p = .05$).

Results and discussion

Isolating actinomyces: 150 isolates were recovered with morphological features similar to actinomyces that exhibited inhibition against fungi. Of these, 70 were

unidad experimental consistió en una placa de Petri y la variable fue el diámetro de crecimiento del hongo, el factor A fue el aislamiento de actinomiceto en diferente medio de cultivo y el factor B fueron los hongos fitopatógenos. Para estratificar los resultados se realizó un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de separación de medias según Tukey ($p=0.05$).

Resultados y discusión

Aislamiento de actinomicetos: se recuperaron 150 aislamientos con características morfológicas semejantes a actinomicetos que presentaron inhibición contra hongos. De éstas 70 se confirmaron como actinomicetos de acuerdo a su morfología microscópica (Figura 1). La mayoría de los actinomicetos fueron obtenidos en su mayoría de suelo de plantas y hormigueros, recuperados en los medios PDA (49%), seguido de ACD (26%), ACA (14%), así como medio comercial para aislamiento de actinomicetos (11%) (Cuadro 2).

El método utilizado para el pretratamiento de muestras, elimina en gran cantidad bacterias y hongos contaminantes; sin embargo, sobrevivieron especies de *Bacillus* filamentosos semejantes a los actinomicetos resistentes al fenol, tal como lo reportan Hayakawa *et al.* (2004). Se observó que el mejor medio de cultivo para el aislamiento de actinomicetos de suelo fue el PDA seguido del ACD, debido a las diferencias nutricionales entre los medios de cultivo.

Pruebas preliminares de antibiosis *in vitro*: de los 70 actinomicetos aislados, 25 fueron antagonistas para *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp., y sólo los actinomicetos APA2, AASH48, AAH53 y APC70 mantuvieron actividad antagónica hasta por 15 d del ensayo, por observación cualitativa en placa.

Bioensayos de antibiosis: los cuatro actinomicetos seleccionados presentaron altos niveles de inhibición contra los hongos fitopatógenos evaluados (Cuadro 3), siendo los mejores APC70 para *Alternaria* sp., con 57.6% de inhibición en ACD; AAH53 para *Rhizoctonia* sp. con 53.08% en ACD; AAH53 para *Fusarium* sp., con 49.36% en PDA y AAH53 para *Colletotrichum* sp., 61.57% en ACD (Figura 2).

confirmed as actinomycetes according to their microscopic morphology (Figure 1). Most actinomycetes were obtained in most plants and soil mounds, PDA media recovered (49%), followed by ACD (26%), FFA (14%), as well as commercial medium for isolating actinomycetes (11%) (Table 2).

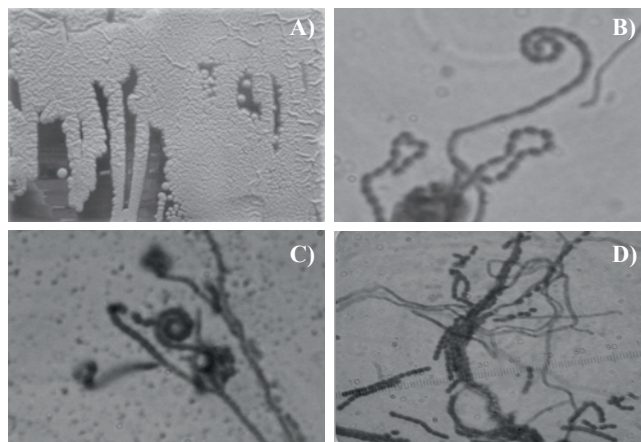


Figura 1. a) morfología macroscópica del aislamiento APA2 mostrando crecimiento seco, polvoso, irregular; b y c) morfología microscópica (campo claro 12000X). Aislamiento AASH48. Micelio vegetativo y aéreo, no fragmentado formando cadenas espirales de esporas (adornos miceliales); y d) morfología microscópica (campo claro 12000X). Aislamiento APC70, micelio vegetativo y aéreo, formando cadenas largas de conidias.

Figure 1. a) macroscopic morphology of the APA2 isolation with dry, dusty, irregular growth; b and c) microscopic morphology (light microscop 12000X). AASH48 isolation. Vegetative and aerial mycelium, not fragmented forming spiral chains of spores (mycelial ornaments); y d) microscopic morphology (light microscop 12000X). APC70 isolation, vegetative and aerial mycelium, forming long chains of conidia.

Cuadro 2. Relación de actinomicetos obtenidos en los diferentes medios de aislamiento.

Table 2. Actinomycetes relation obtained in the different isolation media.

Medios cultivo	Núm. de aislamientos	Suelo	Aire	Hormigas
pda	34	24	8	2
ACD	18	17	0	1
ACA	10	9	1	0
AA	8	4	0	4
Total	70	54	9	7

Cuadro 3. Resultados de bioensayos de antagonismo de los cuatro actinomicetos contra hongos fitopatógenos a los diez días de tratamiento.

Table 3. Bioassay results of antagonism of the four actinomycetes against phytopathogenic fungi after 10 days of treatment.

Medio	Actinomiceto	Porcentaje de inhibición (%)			
		<i>Alternaria</i> * **	<i>Rhizoctonia</i> * **	<i>Fusarium</i> * **	<i>Colletotrichum</i> * **
PDA	APA2	25.54 A b	2.99 B c	1.47 C b	52.12 C a
	AASH48	56.00 A a	42.55 A b	47.82 AB a	56.88 B a
	AAH53	53.6 A a	52.99 A a	49.36 A a	38.81 B b
	APC70	53.18 A a	0.6 C c	1.54 C b	36.22 B b
CZAPEK	APA2	51.43 A a	42.16 B b	20.42 C b	59.95 D a
	AASH48	42.97 A b	38.11 B c	28.56 B a	59.89 C a
	AAH53	51.77 A a	53.08 B a	20.21 B b	61.57 C a
	APC70	57.60 B a	43.77 C b	0.52 D c	61.42 A a

**Letras mayúsculas diferentes en las filas indican diferencia significativa ($p=0.05$); *Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencia significativa ($p=0.05$).

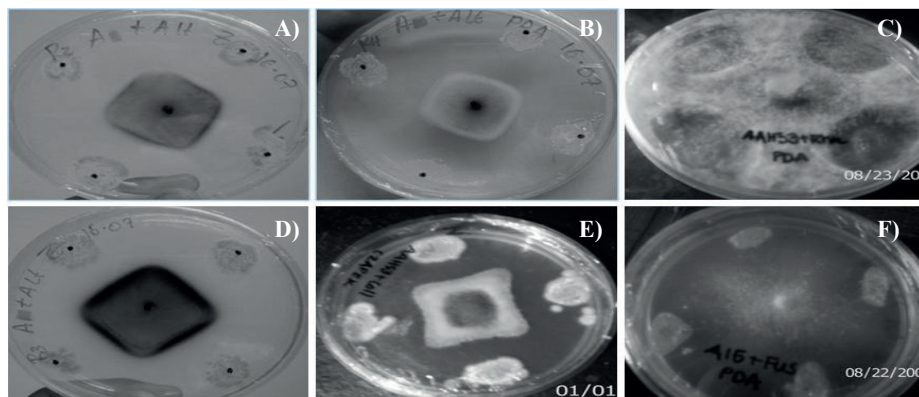


Figura 2. A) antagonismo del aislamiento APA2 contra *Alternaria* sp. en ACD; B) antagonismo del aislamiento AASH48 contra *Alternaria* sp., en PDA; C) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Rhizoctonia* sp., en PDA; D) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Alternaria* sp., en ACD; E) antagonismo del aislamiento AASH48 contra *Colletotrichum* sp. en ACD; y F) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Fusarium* sp., en PDA.

Figure 2. A) insulation antagonism APA2 against *Alternaria* sp. on ACD; B) isolation antagonism AASH48 against *Alternaria* sp. on PDA; C) isolation antagonism AAH53 against *Rhizoctonia* sp. on PDA; D) isolation antagonism AAH53 against *Alternaria* sp. on ACD; E) isolation antagonism AASH48 against *Colletotrichum* sp. on ACD; and F) insulation antagonism AAH53 against *Fusarium* sp., on PDA.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Abyad *et al.* (1996), quienes evaluaron cepas de actinomicetos aislados de suelos cultivados contra patógenos del tomate. Las cepas *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* y *S. citrofluorescens*, fueron las más activas contra *Fusarium oxysporum* f. sp., *licopersici*, *Verticillium albo-atrum* y *Alternaria solani*. De igual forma Castillo *et al.* (2001), reportó cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de plántulas de papa con porcentajes de inhibición de hasta 87% contra *Rhizoctonia solani*.

The method used for pretreatment of samples, eliminates many bacterial and fungal contaminants; however, *Bacillus* species survived, filamentous similar to actinomycetes resistant to phenol, as reported by Hayakawa *et al.* (2004). It was observed that the best medium for isolation of soil actinomycetes was PDA followed by ACD due to the nutritional differences between culture media.

Preliminary tests antibiosis *in vitro*: of the 70 actinomycetes isolated, 25 were antagonists to *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* sp. and only the

Colletotrichum sp., fue el fitopatógeno que presentó los niveles más altos de inhibición, siendo el aislamiento AAH53 el más eficiente para el control de éste hongo; sin embargo, la mayoría de los actinomicetos mostraron niveles de antagonismo para este Deuteromiceto (= 50%). Gomes *et al.* (2000) en estudios previos reafirman que *Streptomyces* sp. presenta actividad antagonista contra *Fusarium* sp., *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Aspergillus parasiticus* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Al respecto Iznaga *et al.* (2003), reportaron cepas de actinomicetos aisladas de suelo, que producen componentes con actividad antifúngica, resultados similares al de este estudio. Whipps (2001) encontró que el medio de crecimiento artificial empleado genera efectos significativos en la morfología y en el desarrollo de los patógenos; asimismo, en la producción de antibióticos volátiles y no volátiles por los agentes antagonistas en respuesta a los agentes patógenos. Ezziyyani *et al.* (2004) demostraron que el grado de inhibición varía por factores como: la temperatura, el pH y el medio de cultivo empleado, demostrando que el medio PDA intensifica la inhibición. Esto puede explicar el motivo por el cual no concuerdan los resultados de antagonismo obtenidos contra *Fusarium* sp., comparado con otros estudios en donde se presentaron altos porcentajes de inhibición contra este hongo. Los fenómenos de antagonismo en hongos pueden ser explicados por diversos mecanismos incluyendo antibiosis y parasitismo, la inhibición en el crecimiento diametral del hongo y puede ser atribuido a la presencia de algunas sustancias inhibitorias excretadas por los actinomicetos.

Identificación morfológica y bioquímica: las colonias de las cepas seleccionadas presentaron bordes irregulares, consistencia dura y compacta, con diferentes pigmentos como gris, café y amarillo principalmente. Se observó una apariencia pulverulenta como consecuencia de la formación de largas cadenas de esporas originada por la subdivisión de la hifa aérea (Sylvia, 2005).

Respecto a la tinción de Gram, se obtuvieron bacterias filamentosas Gram positivas, con micelio vegetativo aéreo, tortuoso no fragmentado formando cadenas de esporas en espiral (adornos miceliales) y cadenas rectas largas de esporas (Figura 1). Las características macroscópicas y microscópicas fueron comparadas con las descritas por Bergey *et al.* (2000), encontrándose que los actinomicetos seleccionados mostraron morfológica y microscópicamente características específicas del género *Streptomyces* sp., así como el metabolismo bioquímico idéntico al género (Cuadro 4) (Koneman *et al.*, 2008). (Bergey *et al.*, 2000; Koneman *et al.*, 2008).

actinomicetes APA2, AASH48, APC70 and AAH53 remained with antagonistic activity for up to 15 d of the test plate by qualitative observation.

Antibiosis bioassays: the four selected actinomicetes showed high levels of inhibition against the fungal pathogens tested (Table 3), being the best APC70 for *Alternaria* sp., with 57.6% inhibition in ACD; AAH53 to *Rhizoctonia* sp. with 53.08% in ACD; AAH53 to *Fusarium* sp., with 49.36% in PDA and AAH53 for *Colletotrichum* sp., 61.57% in ACD (Figure 2).

This agrees with the results obtained by Abyad *et al.* (1996), who evaluated actinomicetes strains isolated from cultivated soils against pathogens of tomato. *Streptomyces pulcher* strains, *S. canescens* and *S. citrofluorescens*, were the most active against *Fusarium oxysporum* f. sp., *licopersici*, *Verticillium albo-atrum* and *Alternaria solani*. Similarly, Castillo *et al.* (2001) reported actinomicete strains isolated from the rhizosphere of potato seedlings with percentages of inhibition of up to 87% against *Rhizoctonia solani*.

Colletotrichum sp. was the phytopathogen that presented the highest levels of inhibition, being the isolation AAH53 the most efficient control for this fungus; however, most of the actinomicetes showed levels of antagonism for this Deuteromiceto (= 50%). Gomes *et al.* (2000) in previous studies reaffirm that *Streptomyces* sp. has antagonistic activity against *Fusarium* sp., *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Aspergillus parasiticus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. In this regard, Iznagas *et al.* (2003) reported actinomicete strains isolated from soil, which produce components with antifungal activity, similar results of this study. Whipps (2001) found that, the artificial growth medium employed generates significant effects on the morphology and in the development of pathogens, also in the production of antibiotics by volatile and nonvolatile antagonistas en agents response to pathogens.

Ezziyyani *et al.* (2004) demonstrated that, the extent of inhibition varied by factors such as temperature, pH and the culture medium used, demonstrating that the inhibition intensifies with PDA medium. This may explain why no match results were obtained in antagonism against *Fusarium* sp. Compared to other studies which showed high percentages of inhibition against this fungus. Antagonistic phenomena in yeast can be explained by various mechanisms including antibiosis and parasitism,

Cuadro 4. Resultados de las pruebas bioquímicas de los aislamientos de actinomicetos.
Table 4. Results of the biochemical tests of isolates of actinomycetes.

Actinomicetos	Gram	Movilidad	Ácido-Alcohol resistencia	Caseína	lizosima	Tirosina	Xantina	Almidón	Hipoxantina	Gelatina
<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. APA2	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. AASH48	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. AAH53	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp. APC70	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+

(Koneman *et al.*, 2008; Bergey *et al.*, 2000).

A) antagonismo del aislamiento APA2 contra *Alternaria* sp. en ACD; B) antagonismo del aislamiento AASH48 contra *Alternaria* sp., en PDA; C) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Rhizoctonia* sp., en PDA; D) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Alternaria* sp., en ACD; E) antagonismo del aislamiento AASH48 contra *Colletotrichum* sp. en ACD; y F) antagonismo del aislamiento AAH53 contra *Fusarium* sp., en PDA.

Conclusiones

Se encontraron altos niveles de antagonismo de actinomicetos contra los hongos fitopatogenos *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp., la actividad varió conforme el aislamiento del streptomiceto y dependiendo del hongo confrontado. El suelo es una fuente abundante de actinomicetos con un alto potencial para ser desarrollados e implementados en los programas de control biológico de patógenos de cultivos de importancia económica y que son factibles de aislarse e incrementarse en el medio de cultivo PDA con alto grado de eficiencia.

Literatura citada

Abyad, M.; Sayed, M.; Shanshoury, A. and Sabbagh, S. 1996. Antimicrobial activities of *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* and *S. citrofluorescens* against fungal and bacterial pathogens of tomato *in vitro*. Folia Microbiol. 41:321-328.

diametral growth inhibition of the fungus, and can be attributed to the presence of inhibitory substances excreted by some actinomycetes.

Morphological and biochemical identification: the colonies of the selected strains showed irregular edges, hard consistency and compact with different pigments such as gray, brown and yellow mostly. Powdery appearance was observed as a result of the formation of long chains of spores originating from subdividing the aerial hyphae (Sylvia, 2005).

Regarding the Gram stain, filamentous bacteria Gram positive was obtained with aerial vegetative mycelium, unfragmented tortuous forming spiral spore chains (mycelial ornaments) and long straight chains of spores (Figure 1). The macroscopic and microscopic characteristics were compared with those described by Bergey *et al.* (2000), finding that the actinomycetes selected microscopically showed morphological and specificities of the genus *Streptomyces* sp. as well as the biochemical metabolism of the genus (Table 4) (Koneman *et al.*, 2008) (Bergey *et al.* 2000; Koneman *et al.*, 2008).

A) Insulation antagonism APA2 against *Alternaria* sp. in ACD; B) the AASH48 isolation antagonism against *Alternaria* sp., PDA; C) AAH53 isolation antagonism against *Rhizoctonia* sp., PDA; D) AAH53 isolation antagonism against *Alternaria* sp., in ACD; E) AASH48 isolation antagonism against *Colletotrichum* sp. in ACD; and F) AAH53 insulation antagonism against *Fusarium* sp. in PDA.

- Behal, V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*. Adv. Appl. Microbiol. 47:113-157.
- Ben-Omar, N.; Merroun, M. L. M.; Arias Penalver, J. M. and González, M. M. T. 1997. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. Chemosphere. 35:2217-2283.
- Bergey, J.; Hendriks, D. and Holt, J. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. Sneathy Stanley, J. T. (Eds.). Ed. The Williams and Wilkins Co. Philadelphia. 787 p.
- Betina, V. 1994. Microbial metabolites affecting plant growth and metabolism. In: Betina, V. (Ed.). Bioactive secondary metabolite of microorganism. 192-208 p.
- Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Albert, H. and Robison, R. 2001. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* RRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiology. 148:2675-2685.
- Crawford, D. L.; Lynch, J. M.; Whipps, J. M. and Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterization of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. USA. Appl. Env. Microbiol. 59:3899-3905.
- Ezziyyani, M.; Pérez, C.; Requena, M.; Rubio, L. and Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*- Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología. 26:69-78.
- Franco-Correa, M.; Quintana, A.; Duque, C.; Suarez, C.; Rodríguez, M. and Barea, J. 2010. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Appl. Soil Ecol. 45:209-217.
- Gohel, V.; Singh, A.; Vimal, M.; Ashwini, P. and Chhatpar, H. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Afric. J. Biotechnol. 5:54-72.
- Gomes, R.; Smedo, L.; Soares, R.; Alviano, C.; Linhares, L. and Coelho, R. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Letters in Appl. Microbiol. 30:46-150.
- Hayakawa, M.; Yoshida, Y. and Imura, Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. J. Appl. Microbiol. 96:973-981.
- Iznaga, Y.; Lemus, M.; González, L.; Garmendia, L.; Nadal, L. and Vallin, C. 2003. Antifungal activity of actinomycetes from Cuban solis. Phytotherapy Res. 18:494-496.

Conclusions

We found high levels of antagonism of actinomycetes against phytopathogenic fungi *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Colletotrichum* sp., the activity varied as the isolation of the fungus and of the streptomyceto and depending of the confronted fungi. The soil is a rich source of actinomycetes with high potential to be developed and implemented in biological control programs of pathogens in crops of economic importance and that are feasible to isolate and increase in PDA culture medium with a high degree of efficiency.

End of the English version



- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C y Winn, W. C. 2008. Diagnóstico microbiológico. 6ª (Ed.). Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. 1696 p.
- Oskay, M.; Tamer, A. U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes 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. <http://www.monografias.com/trabajos47/actinomicetos/actinomicetos.shtml>.
- Sylvia, D. M. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2nd (Ed.). Pearson Prentice Hall. USA. 259-306 p.
- Tokala K.; Strap, C.; Jung, D.; Crawford, L.; Salove, L.; Deobald, F.; Bailey, J. and Morra, J. 2002. Novel plant-microberhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisumsativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68:2161-2171.
- Whipps, J. M. 2001. Microbila interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52:487-511.