

ACTIVIDAD ANTAGÓNISTA *in vitro* DE AISLADOS DE LA CLASE Bacilli DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN CONTRA CUATRO HONGOS FITOPATÓGENOS

In vitro antagonistic activity of Bacilli class isolates from the Yucatán peninsula against four phytopathogenic fungi

M Sosa-Pech, E Ruiz-Sánchez, M Mejía-Bautista, A Reyes-Ramírez ✉, J Cristóbal-Alejo, A Valencia-Botín, O Gutiérrez-Alonzo

(MSP)(ERS)(MMB)(ARR)(JCA) Instituto Tecnológico de Conkal. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km. 16.3 antigua carretera Mérida-Motul. Conkal 97345 Yucatán, México. areyes.itconkal@gmail.com
(AVB) Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara
(OGA) INIFAP Campo experimental Mocochoá

Nota científica recibido: 21 de junio de 2012, **aceptado:** 6 de diciembre de 2012

RESUMEN. Las cepas de la clase Bacilli se aislaron en suelos de la Península de Yucatán. La actividad antagonista fue evaluada por la confrontación directa contra los hongos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp. y *Alternaria* sp. Los aislados causaron entre 42 y 86 % de inhibición de crecimiento de la colonia de hongos. El aislado CBCK47 produjo una zona de inhibición entre 0.30 y 0.72 cm en tres de los cuatro hongos fitopatógenos.

Palabras clave: Antagonistas, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp., *Alternaria* sp.

ABSTRACT. Bacterial strains of the Bacilli class were isolated from soil of the Yucatán Peninsula. The antagonist activity was evaluated by direct confrontation against the phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp and *Alternaria* sp. The isolates caused a 42 to 86 % inhibition of fungal colony growth. The isolate CBCK47 generated an inhibition zone of 0.30 to 0.72 cm in three of the four phytopathogenic fungi.

Key words: Antagonists, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp., *Alternaria* sp.

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos son los principales causantes de enfermedades en las plantas, con pérdidas a nivel mundial que ascienden a miles de millones de dólares al año (Agrios G 1998 Fitopatología. Editorial Limusa, México). El uso indiscriminado de fungicidas químicos ha traído grandes consecuencias negativas, entre las que destacan el incremento de los costos de producción, contaminación al ambiente, residualidad en productos cosechados y desarrollo de resistencia de las poblaciones de patógenos (Lewis JH, Papavizas GC 1991. Crop Protection 10: 95-105).

La utilización de microorganismos en el con-

trol biológico de fitopatógenos constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas químicos (Killani AS, Abaidoo RC, Akintokun AK, Abiala MA 2011. Research 3(3): 11-18). La utilización de bacterias del género *Bacillus* es una excelente alternativa, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para ejercer actividad antagónica mediante la producción de lipopéptidos (Zhang DJ, Liu RF, Li YG, Tao LM, Tai L 2010. Chem, Pharm. Bull. 2010. 58(12): 1630-7634), producción de enzimas líticas como quitinasas (Rodas-Junco BA, Magaña-Sevilla HF, Tun-Suarez JM, Reyes-Ramírez A 2009. Research Journal of Biological Sciences 4(9):985-

989) y competencia por el espacio y los nutrientes (Rovira AD 1965. Annual Review of Microbiology 19:241-266). El género *Bacillus* es el grupo bacteriano más utilizado para el control de patógenos del suelo y de raíces (Killani AS, Abaidoo RC, Akin-tokun AK, Abiala MA 2011. Research 3(3): 11-18), pero hay pocas investigaciones sobre control de fitopatógenos de follaje. Entre los estudios sobre la actividad de *Bacillus* sobre hongos que afectan follaje se encuentran los de Fravel y Spurr (1977. Phytopathology 67: 930-932), quienes informaron que el uso de *Bacillus cereus* inhibió la germinación y desarrollo del tubo germinativo de *Alternaria alternata*. Carissimi et al. (2009. Biociencias 17(1): 48-58) demostraron que el uso de *Bacillus* spp. produce inhibición eficiente contra *Bipolaris sorokiniana*. Por su parte, Saleem y Ulaganathan (2002. Current Science 82 (12): 55-62) encontraron que la cepa *Bacillus* FC121, aislada de la rizosfera de sorgo, mostró alta actividad antagonista contra *Curvularia lunata*, produciendo una zona de inhibición de 0.5-1 cm.

Algunos de los géneros de patógenos más importantes que afectan follaje en zonas tropicales son *Macrophomina*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium* y *Alternaria*. *Macrophomina* spp. que es un hongo que provoca la pudrición e infecta las raíces y la parte inferior del tallo de más de 500 especies de plantas (Beas-Fernández R, Santiago de Santiago A, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N 2006. Journal of Plant Pathology 88(1): 53-60). La pudrición carbonosa es una enfermedad importante durante el tiempo caluroso y seco, o cuando las condiciones ambientales son desfavorables para la planta, siendo la enfermedad más importante del sorgo en el Norte de Tamaulipas, México (Williams-Alanís H, Pecina-Quintero V, Montes García N, Palacios-Velarde O, Arcos-Cavazos G, Vidal-Martínez A 2009. Revista Mexicana de Fitopatología 27:148-155). El hongo *Colletotrichum* es uno de los patógenos de plantas de mayor distribución mundial y de gran importancia, causa antracnosis en el follaje, el tallo y el fruto en una amplia variedad de plantas como soya, algodón, frijol, tomate, así como cucurbitáceas entre otras. Mientras que *Helminthosporium* causa severas enfermedades en gramíneas y en algunos frutales, y la sintomatología típica son manchas foliares

y pudrición del cuello de la planta y la raíz (Agrios G 1998. Fitopatología, Editorial Limusa, México). El género *Alternaria* afecta principalmente las hojas, los tallos, las flores y frutos de plantas anuales, en particular de hortalizas y plantas de ornato. Afecta también árboles como los de los cítricos y el manzano. El hongo causa manchas y tizones foliares, inclusive ocasiona ahogamiento de plántulas y pudriciones de cuello (Agrios G 1998 Fitopatología, Editorial Limusa, México). Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas nativas de la clase Bacilli con potencial en el control biológico de cuatro hongos fitopatógenos mediante ensayos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos utilizados

Se utilizaron cuatro cepas de hongos fitopatógenos, las cuales fueron: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., donado por el Dr. Ramírez-Lepe del Instituto Tecnológico de Veracruz., México, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. que se obtuvo de frutos de papaya (*Carica papaya* L.), *Helminthosporium* sp. y *Alternaria* sp. que se obtuvieron de palma kerpis (*Adonidia Merrilli* Becc.). Los hongos fueron aislados por medio de siembra de cortes de tejido infectado y sano en medio PDA e incubados a 28 °C (Herrera-Parra et al. 2011. Fitosanidad 15(4): 231-236). Los hongos se sembraron y se mantuvieron en agar papa dextrosa (PDA) en el laboratorio de fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal.

Aislamiento de cepas de la clase Bacilli

Se tomaron muestras de diferentes suelos de los estados de Yucatán y Campeche. Las muestras de suelo se tomaron como lo indica Escobar et al. (Escobar et al. 2004. Revista Colombiana de Biotecnología 6(2): 43-53). Se tomaron las muestras de suelo a una profundidad de 10 cm aproximadamente, cerca de la rizosfera de plantas en diferentes zonas de cultivos y malezas. El procesamiento de las muestras se realizó de la siguiente manera: 1 g de la muestra de suelo se mezcló con 10 ml de agua destilada esterilizada, se agitó con intensidad por

aproximadamente 1 min, después se pasteurizó en baño María a 80 °C por 30 min y se enfrió en hielo por 30 min. Se tomó una alícuota de 20 μ l que se diluyó 1:10 en agua destilada estéril en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. De esta mezcla se tomó una muestra de 50 μ l y se sembró en Agar Nutritivo (AN) (Artiom, 2002. Bioagro 14 (1): 3-10).

Identificación de cepas de la clase Bacilli

Se realizó descripción morfológica de la colonia de cada uno de los aislados seleccionados en AN con base en la apariencia, forma del borde y color, esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento en AN, incubado a 28 °C. A las 24 h de incubación se realizaron pruebas de catalasa y de tinción de Gram (Koneman 2003. Diagnóstico microbiológico. Editorial médica panamericana. Argentina). A las 72 h de incubación se les determinó la presencia de spora por observación microscópica. Las cepas con características morfológicas similares a la clase Bacilli se conservaron en AN para su uso posterior.

Evaluación de la actividad antagonica

La determinación de la actividad antagonica de las cepas se realizó con el procedimiento de Sosa-López *et al.* (Sosa-López *et al.* 2011. Fitosanidad 15(1): 39-43). Un disco de 4 mm de diámetro de la zona de crecimiento de las colonias de los hongos fitopatogenos se colocaron en el centro de cajas Petri de 100 mm de diámetro con PDA. Los antagonistas se inocularon mediante la adición de 6 μ l de las suspensiones bacterianas (1×10^7 UFC ml⁻¹) de cada aislado, cada uno de los hongos fitopatogenos fue probado con todos los aislados bacterianos en confrontación 1 a 4, distribuidos a 2 cm de distancia del disco con micelio del hongo fitopatogeno, esto se realizo con cinco replicas. Las cajas Petri se sellaron e incubaron a 28 °C. Se estableció un testigo para cada hongo fitopatogeno, el cual consistió en la siembra de la colonia fúngica sin la presencia de los aislados bacterianos. Se realizaron cinco repeticiones por unidad experimental y los datos fueron tomados a los 7 y 10 d de incubación. Se seleccionaron las cepas que mostraron mayor inhibición en el crecimiento micelial en por lo menos dos de los

cuatro hongos fitopatogenos utilizados.

VARIABLES EVALUADAS

Inhibición de crecimiento de los hongos. Se evaluó el crecimiento radial de las colonias fúngicas en presencia y ausencia de los aislados bacterianos. El porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico se evaluó mediante la fórmula descrita por Orberá *et al.* (Orberá *et al.* 2009. Fitosanidad 13(2): 95-100).

$$PICR = (R1 - R2/R1) \times 100$$

Donde: *PICR* es el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, *R1* representa el valor promedio del radio de la colonia control y *R2* es el valor promedio del radio de la colonia inhibida por las bacterias.

Halo de inhibición de crecimiento. Se midió en cm la zona de inhibición de crecimiento (sin crecimiento micelial del hongo) entre el borde de la colonia bacteriana y el borde la colonia fúngica. Para *Macrophomina phaseolina* se tomo el dato del séptimo día, mientras que para *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium sp.* y *Alternaria sp.* se tomaron los datos a los 10 d después de la incubación.

Análisis de datos. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), al porcentaje de inhibición de los crecimientos fúngicos y al halo de inhibición de crecimiento. El análisis se llevó a cabo en el paquete estadístico SAS versión 8.1 para Windows. El agrupamiento de las cepas se realizó mediante un análisis de conglomerado aplicando la distancia Euclidiana utilizando el paquete estadístico MINITAB v 13.20 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas de la clase Bacilli

Se obtuvieron un total de 40 cepas bacterianas de los estados de Yucatán y Campeche, por medio de en ensayos preliminares se pre seleccionaron 13 cepas para el presente trabajo, con base a los aislados que inhibieron el crecimiento de las colonias fúngicas en por lo menos dos de los cuatro hongos fitopatogenos utilizados, con porcentajes de inhibición iguales o mayores al 70 %. De acuerdo a las

características morfológicas de las colonias, forma bacteriana bacilar Gram positiva, prueba de catalasa positiva y producción de esporas, los aislados se identificaron como pertenecientes a la clase Bacilli. Las cepas seleccionadas se codificaron y agruparon de acuerdo con la localidad de donde se tomó la muestra, las cuales son: CBRF6, CBRF8, CBRF12, CBRF15, CBRM9, CBRM14 de Conkal, CBCC2 de Cansahcab y CBSN67 de San Crisanto, municipios de Yucatán; CBCK36, CBCK41, CBCK44, CBCK46 y CBCK47 de Calakmul, Campeche.

Porcentaje de inhibición de crecimiento

Se observó diferencia significativa en la actividad antagónica de las cepas bacterianas en los cuatro hongos fitopatógenos. Para *Macrophomina phaseolina* cinco cepas mostraron mayor inhibición del crecimiento, que se encontró entre 71 y 73 % ($p = 0.0001$) (Tabla 1). En *Colletotrichum gloeosporioides*, todas las cepas indujeron un porcentaje de inhibición entre 70 y 86 %, lo cual indica que este hongo en particular fue el más susceptible al efecto de los antagonistas, por otro lado, en el caso de *Helminthosporium* sp., las cepas antagónicas mostraron un rango de inhibición más amplio, entre 39 y 79 % en donde seis aislados mostraron porcentajes iguales o mayores al 70 % (Tabla 1). Finalmente, en *Alternaria* sp., con excepción de dos aislados, indujeron porcentajes de inhibición entre 71 % y 80 % ($p = 0.0001$) (Tabla 1). Los resultados del presente trabajo son similares a los informados por Benítez et al. (Benítez et al. 2007. NOVA - publicación científica en ciencias biomédicas 5(8): 101-212) quienes encontraron cinco cepas de *Bacillus* sp. que inhibían el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, con porcentajes de inhibición de 83 a 87 %. De la misma manera Orberá et al. (Orberá et al. 2009. Fitosanidad 13(2): 95-100) evaluaron bacterias formadoras de endosporas contra *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* sp., y observaron que las mejores cinco cepas bacterianas produjeron entre 52 y 72 % de inhibición de crecimiento de los hongos.

Halo de inhibición

En su actividad antagónica el 77 % de las ce-

pas formaron una zona de inhibición entre la colonia del antagonista y la de los hongos fitopatógenos en los cuatro hongos utilizados entre 0.02 y 0.76 cm, solo la cepa CBK46 no mostró formación de halo de inhibición en ninguno de los cuatro hongos (Tabla 2). Durante la interacción entre un antagonista y el patógeno en muchas ocasiones se genera una zona clara entre ambos denominada halo de inhibición, la cual se genera por el microorganismo antagonista (Rodgers PB 1989. Pesticide Science 27: 155-164). Los resultados del presente trabajo indican que las cepas CBK36 y CBCK47, forman halos de inhibición de 0.04 a 0.72 cm en los cuatro hongos (Tabla 2), lo cual indica que tienen un amplio espectro de actividad antifúngica, probablemente debido a la presencia de metabolitos extracelulares que afectan el crecimiento micelial de los hongos. En estudios previos de Saleem & Ulaganathan (Saleem & Ulaganathan 2002. Current Science 82 (12): 55-62), informaron que cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera tuvieron alta actividad antagónica frente a *Curvularia lunata*, observándose una zona de inhibición de 0.5 a 1 cm después de 10 d de inoculación. Especies de *Bacillus* producen componentes bioactivos como lipopéptidos cíclicos entre ellos surfactina, iturina y fengicina (Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P 2009. Microbial Cell Factories 8:63) estos compuesto son producidos durante el crecimiento bacteriano de manera extracelular por lo que se mantienen en el medio de cultivo y son responsables de la formación de los halos de inhibición en los bioensayos de confrontación directa entre los fitopatógenos y los antagonistas. Fracciones de Iturina A y fengicina producidas por *Bacillus subtilis* CMB32 producen halos de inhibición en *Colletotrichum gloeosporioides* (Kim et al. 2010. Journal of Microbiology and Biotechnology 20(1):138-145).

Por otro lado, las cepas CBCK41, CBCK44 y CBCK 46 que mostraron porcentajes de inhibición mayores al 70 % de crecimiento micelial no produjeron un halo de inhibición o los valores fueron menores a 0.05 cm entre la colonia del antagonista y los hongos fitopatógenos. Al respecto se sugiere que algunas cepas bacterianas no forman halo de inhibición debido probablemente a que pueden competir

Tabla 1. Porcentajes de inhibición producido por los aislados de la clase Bacilli frente a cuatro hongos fitopatogenos. Se expresa la media de cinco repeticiones \pm error estándar.

Table 1. Inhibition percentages produced by the isolates of the Bacilli class for four phytopathogenic fungi. The mean \pm standard error of five replicates is included.

CEPAS	<i>M. phaseolina</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
CBRF6	54.22 \pm 2.59 de	81.57 \pm 0.0 abc	70.66 \pm 5.90 a	62.85 \pm 1.78 bc
CBRF8	66.22 \pm 0.83 abcd	86.34 \pm 0.59 a	42.74 \pm 2.65 cd	76.15 \pm 1.88 a
CBRF12	61.33 \pm 1.50 abcd	83.41 \pm 0.48 a	39.60 \pm 4.03 d	78.46 \pm 1.96 a
CBRF15	73.77 \pm 1.63 a	82.58 \pm 1.64 ab	65.60 \pm 5.30 ab	79.45 \pm 4.32 a
CBRM9	64.88 \pm 4.62 abcd	84.50 \pm 0.93 a	60.55 \pm 4.92 abc	77.85 \pm 0.71 a
CBRM14	60.44 \pm 3.32 bcde	84.50 \pm 0.93 a	50.00 \pm 3.40 bcd	71.42 \pm 0 ab
CBCK36	71.55 \pm 2.57 ab	81.63 \pm 2.22 abc	77.41 \pm 3.97 a	79.55 \pm 1.08 a
CBCK41	72.44 \pm 2.06 ab	77.04 \pm 1.03 bc	74.58 \pm 4.36 a	78.66 \pm 0.88 a
CBCK44	71.11 \pm 2.43 abc	75.73 \pm 1.67 cd	70.35 \pm 4.50 ab	76.88 \pm 2.17 a
CBCK46	72.44 \pm 2.06 ab	82.29 \pm 1.31 ab	79.76 \pm 2.30 a	80.44 \pm 1.08 a
CBCK47	58.66 \pm 1.13 cde	84.00 \pm 1.08 a	67.77 \pm 3.23 ab	75.33 \pm 1.33 a
CBCC2	56.44 \pm 3.26 de	84.00 \pm 1.08 a	68.88 \pm 2.22 ab	76.66 \pm 0 a
CBSN67	48.00 \pm 2.28 e	70.13 \pm 1.55 d	71.34 \pm 4.07 a	54.78 \pm 2.94 c

Medias con letras repetidas dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).
Means with the same literal in columns do not differ statistically (Tukey's test, 0.05).

Tabla 2. Halos inhibición producido por los aislados de la clase Bacilli frente a cuatro hongos fitopatogenos. Se expresa la media de cinco repeticiones \pm error estándar.

Table 2. Inhibition zones produced by the isolates of the Bacilli class for four phytopathogenic fungi. The mean \pm standard error of five replicates is included.

CEPAS	<i>M. phaseolina</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
CBRF6	0.18 \pm 0.08 abc	0.06 \pm 0.04 def	0.24 \pm 0.11 bc	0.32 \pm 0.05 ab
CBRF8	0.28 \pm 0.02 a	0.14 \pm 0.04 bcdef	0.04 \pm 0.02 c	0.42 \pm 0.03 ab
CBRF12	0.10 \pm 0.03 abc	0.34 \pm 0.05 abc	0.20 \pm 0.08 c	0.56 \pm 0.21 a
CBRF15	0.08 \pm 0.02 abc	0.32 \pm 0.11 abcd	0.26 \pm 0.09 bc	0.34 \pm 0.11 ab
CBRM9	0.10 \pm 0.03 abc	0.06 \pm 0.05 def	0.32 \pm 0.11 abc	0.32 \pm 0.02 ab
CBRM14	0.26 \pm 0.14 ab	0.10 \pm 0.05 cdef	0.12 \pm 0.09 c	0.32 \pm 0.02 ab
CBCK36	0.18 \pm 0.03 abc	0.46 \pm 0.06 a	0.38 \pm 0.18 abc	0.72 \pm 0.19 a
CBCK41	0.00 \pm 0 c	0.02 \pm 0.02 f	0.00 \pm 0 c	0.00 \pm 0 b
CBCK44	0.02 \pm 0.02 bc	0.04 \pm 0.04 ef	0.00 \pm 0 c	0.00 \pm 0 b
CBCK46	0.00 \pm 0 c	0.00 \pm 0 f	0.00 \pm 0 c	0.00 \pm 0 b
CBCK47	0.04 \pm 0.04 abc	0.30 \pm 0.03 abcde	0.72 \pm 0.13 ab	0.50 \pm 0.08 a
CBCC2	0.00 \pm 0 c	0.04 \pm 0.04 ef	0.76 \pm 0.11 a	0.30 \pm 0.08 ab
CBSN67	0.08 \pm 0.02 abc	0.40 \pm 0.04 ab	0.44 \pm 0.11 abc	0.40 \pm 0.04 ab

Medias con letras repetidas dentro de la misma columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).
Means with the same literal in columns do not differ statistically (Tukey's test, 0.05).

directamente con el hongo patógeno por espacio o por nutrientes (Rovira 1965. Annual Review of Microbiology 19:241-266).

Para la selección de las cepas con mayor porcentaje de inhibición se realizó un análisis de conglomerado (Figura 1). Considerando un corte de un valor de 1.0 (Distancia euclidiana) se observó un gru-

po definido que incluye al testigo positivo formado por la cepas CBRF15, CBCK36, CBCK41, CBK44 y CBCK46. Por lo que estas cinco cepas deben de ser consideradas en ensayos *in vivo* a nivel de campo para evaluar su potencial como control de hongos fitopatogenos, así como la necesidad de su identificación a nivel de especie para fines de manejo y uso

en la agricultura.

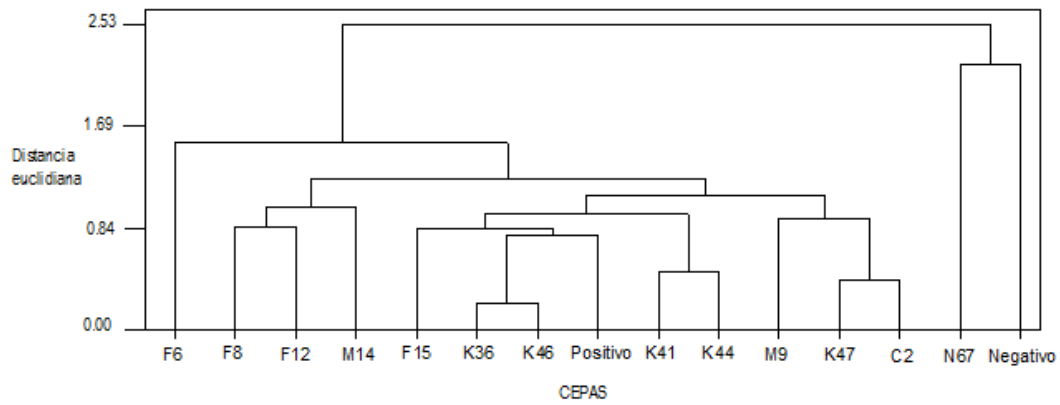


Figura 1. Dendrograma para el agrupamiento de las cepas de acuerdo al porcentaje de inhibición en cuatro hongos fitopatógeno. Los controles positivo y negativo corresponden a los valores más altos y bajos, obtenidos en cada uno de los experimentos.

Figure 1. Dendrogram for the clustering of strains according to the percentage of inhibition for four phytopathogenic fungi. The positive and negative controls correspond to the highest and lowest values, respectively, obtained in each experiment.