



COMUNICACIÓN BREVE

Actinomicetos antagonistas a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en el cultivo de limón en Villa Clara, Cuba

Actinomycetes antagonists to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. in lemon cultivation in Villa Clara, Cuba

Miriam Díaz Díaz^{1*} , Alexander Bernal Cabrera² , Ricardo Medina Marrero¹ ,
Milagros García Bernal¹ , Divaldo Alfredo Augusto Henriques³ 

¹ Centro de Bioactivos químicos (CBQ), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

² Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani, km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

³ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani, km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 20/10/2020
Aceptado: 08/12/2020

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no existir conflictos de intereses.

CORRESPONDENCIA

Miriam Díaz Díaz
miriamdd@uclv.cu



RESUMEN

El cultivo de limón (*Citrus aurantifolia*) es susceptible al ataque de fitopatógenos, que son controlados con moléculas químicas. Una alternativa para revertir los daños ecológicos causados por estas sustancias químicas es el control biológico. El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas de actinomicetos con actividad antagónica a *Colletotrichum gloeosporioides*. Se determinó la actividad antagónica *in vitro* de 181 cepas de actinomicetos, pertenecientes al cepario del Centro de Bioactivos Químicos, contra *C. gloeosporioides*; así como, la actividad enzimática extracelular de las cepas que exhibieron mejor efecto antagonista. Del total de cepas evaluadas, 62 mostraron capacidad antagónica manifestada contra *C. gloeosporioides*, indica que tienen el potencial para ser evaluadas *in vitro* e *in vivo* contra diferentes fitopatógenos del limón.

Palabras clave: actividad enzimática, antracnosis, Biocontrol, *Citrus aurantifolia*, Inhibición

ABSTRACT

The lemon (*Citrus aurantifolia*) crop is susceptible to attack by phytopathogens, which are controlled with chemical

molecules. An alternative to reverse the ecological damage caused by these chemicals is biological control. The aim of this study was to select strains of actinomycetes with antagonistic activity to *Colletotrichum gloeosporioides*. It was determined the antagonistic activity *in vitro* of 181 strains of actinomycetes, belonging to the Chemical Bioactive Center's strain, against *C. gloeosporioides*; as well as, the extracellular enzymatic activity of the strains that showed better antagonistic effect. From the total of evaluated strains, 62 showed antagonistic capacity manifested against *C. gloeosporioides*, indicating that they have the potential to be evaluated *in vitro* and *in vivo* against different lemon phytopathogens.

Keywords: enzyme activity, anthracnose, Biocontrol, *Citrus aurantifolia*, Inhibition

El limón (*Citrus aurantifolia* L.) es uno de los principales cultivos perennes en la Provincia de Matanzas, la cosecha de limón alcanzó en el 2014 las 1 300 toneladas y llegó a promediar nueve toneladas por hectárea. La producción cítrica en nuestro país está limitada por problemas fitosanitarios, especialmente antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*); la principal enfermedad fungosa a nivel mundial, causando pérdidas económicas en pre y poscosecha, principalmente en regiones con temperatura y humedad relativa elevada (Prusky *et al.* 2000; Rhaiem y Taylor, 2016).

El control biológico de enfermedades ha tomado interés desde hace algunas décadas por detectar microorganismos benéficos con potencial de ser usados como agentes de biocontrol para reducir las poblaciones de fitopatógenos y disminuir las aplicaciones de productos químicos (Ferreira *et al.*, 2020). Los actinomicetos controlan diferentes agentes patógenos a través de la producción de metabolitos secundarios y primarios como antibióticos y enzimas extracelulares (Ding *et al.*, 2019); con capacidad de inhibir el crecimiento micelial, la germinación de esporas de hongos fitopatógenos y sobrevivir en la superficie de las frutas por largos períodos de tiempo (Qi *et al.*, 2019).

Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de actinomicetos como agentes de biocontrol de *C. gloeosporioides*. Para determinar la actividad antagonista *in vitro* se sembraron las 181 cepas de actinomicetos previamente identificadas en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Agar Caseína Almidón (ACA) a pH 7,

para luego incubarse a 28 °C por siete días en una cámara de crecimiento (Memmert), hasta observar crecimiento del actinomiceto. El hongo fitopatógeno se seleccionó debido a su incidencia en la región productora de limón, se sembró en Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubó a 25 °C, tres días en una cámara de crecimiento (Memmert) previo a la realización del ensayo.

Cada antagonista se sembró de acuerdo con Evangelista-Martínez *et al.* (2020), mediante fragmentos de la colonia de 6 mm de diámetro, los cuales se colocaron en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri con PDA, y se incubaron a 28 °C por 3 días. Posteriormente fue colocado un fragmento con micelio de la colonia del hongo fitopatógeno en el centro de cada placa y se incubó de nuevo bajo las mismas condiciones.

Como tratamiento control, se sembró el hongo fitopatógeno en el centro de la caja de Petri con PDA, el crecimiento radial de la colonia de *Colletotrichum gloeosporioides* confrontado ante cada actinomiceto y del control se midió cada 24 h. El día en que el control llenó la caja de Petri, se registró la inhibición de los actinomicetos (Evangelista-Martínez *et al.*, 2020). Para determinar la actividad antifúngica, la variable de respuesta que se evaluó fue el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) por efecto de los distintos actinomicetos, de acuerdo con la escala ordinal propuesta por (Salazar *et al.*, 2012). Posteriormente, se seleccionaron las cepas que presentaron mayor PICR para determinar cualitativamente la actividad enzimática extracelular quitinolítica y celulítica.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22.0.0 para Windows. Se verificaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk. Se realizó una comparación de medias, mediante la prueba de HSD Tukey. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

El ensayo de antagonismo *in vitro* mostró que, de las 181 cepas de actinomicetos evaluadas, 62 cepas mostraron actividad contra *C. gloeosporioides* en placas de ACA tras siete días de incubación. En la Tabla 1 se muestran las cepas de actinomicetos con los mejores resultados de la actividad antagonica frente a *C. gloeosporioides*.

Similares resultados obtuvieron Soares *et al.* (2016) cuando informaron que el aislado de actinomiceto AC 26, por su actividad antagonica en el medio de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, fue el aislado más eficiente para controlar el

crecimiento del micelio de los hongos fitopatógenos *Curvularia eragrostides* y *C. gloeosporioides*.

Igualmente, Gu *et al.* (2020) reportaron que la cepa *Streptomyces deccanensis* QY-3 mostró una buena actividad antagonica contra *C. gloeosporioides* con una tasa de inhibición del 86,6 %.

De las 62 cepas que mostraron actividad contra *C. gloeosporioides*, 31 de ellas fueron seleccionadas según el PICR para determinar la actividad enzimática extracelular quitinolítica y celulolítica; y de ellas, 25 fueron capaces de utilizar la quitina coloidal como única fuente de carbono, las que mostraron crecimiento y presentaron una zona de hidrólisis alrededor de la colonia, indicativa de actividad quitinolítica. De estas 25 cepas seleccionamos, las 6 cepas con mayor actividad se muestran en la Tabla 2.

Similares resultados obtuvieron Das *et al.* (2017) quienes evaluaron, aproximadamente 260 cepas de actinomicetos aislados de diversos

Tabla 1. Actividad antagonica *in vitro* de cepas de actinomicetos frente a *C. gloeosporioides* aislado de limón

No	Cepa	Media Real	Límite de confianza inferior -95,0%	Límite de confianza superior +95,0%
1	Plat-2	22,6	20,5	25,4
2	ESFe-10	22,3	20,2	24,0
3	ESFe-12	21,6	19,5	29,0
4	EC-18	20,6	18,5	28,0
5	ESFe-3	20,0	17,9	22,7

Tabla 2. Actividad Quitinolítica de 6 cepas de actinomicetos en medio agar quitina coloidal

No	Cepa	Media Real	Límite de confianza inferior -95,0%	Límite de confianza superior +95,0%
1	Plat-2	14,0b	12,4	15,5
2	OSS-3	12,0b	10,4	13,5
3	CY-5	11,5ab	9,9	13,0
4	Efe-5	11,0a	9,4	12,5
5	Plat-1	10,0a	8,4	11,5
6	ESFe-7	10,5a	8,9	12,0

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

hábitats ecológicos y los examinaron para la producción de quitinas por el método de ensayo en placa. El diámetro de las zonas de hidrólisis osciló entre 8 y 16 mm.

La actividad celulolítica se evidenció con las zonas de aclaramiento alrededor de las colonias cuando se utilizó como revelador el rojo Congo al 1 % (p/v). Las cepas ESFe-12, ESFe-5, Plat-2, ESFe-13, Plat-3 y Plat-1 (Tabla 3) fueron las cepas que presentaron halos de hidrólisis significativamente más grandes que el resto de las cepas evaluadas; siendo la cepa ESFe-12 la que presentó los valores significativos más altos.

Similares resultados mostraron los estudios realizados por Nauanova *et al.* (2018), donde el 41,7 % de los actinomicetos aislados poseían una alta capacidad celulítica y el 30,6 % de las cepas descomponen débilmente la celulosa nativa.

Del total de cepas evaluadas, Plat-2 y ESFe-12 mostraron resultados más promisorios en cuanto a la actividad antagonista *in vitro* frente a *C. gloeosporioides* y enzimática extracelular quitinolítica y celulolítica. Similares resultados obtuvieron Song *et al.* (2020) cuando determinaron que la cepa JT-2F fue capaz de producir proteasas y celulasas para degradar los componentes proteicos y celulósicos de las paredes celulares de *C. dematium*, respectivamente. Por otra parte, Yang *et al.* (2019) aislaron e identificaron y demostraron que *S. corchorusii*, tenía una actividad antagonista de amplio espectro contra varios

patógenos vegetales fúngicos, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Rhizoctonia solani*, *P. capsica*, *Botryosphaeria dothidea*.

CONTRIBUCIÓN DE CADA AUTOR

Miriam Díaz Díaz: diseñó la investigación, recopiló los datos, escribió el manuscrito, y corrigió los señalamientos realizados al mismo por los árbitros y editores.

Alexander Bernal Cabrera: contribuyó a la organización, análisis, síntesis de los datos obtenidos y procesados en la investigación; así como a la revisión crítica del manuscrito.

Ricardo Medina Marrero: contribuyó a la organización, análisis, síntesis de los datos obtenidos y procesamiento de los mismos en la investigación.

Milagros García Bernal: contribuyó a la organización, análisis y preparación de la investigación.

Divaldo Alfredo Augusto Henriques: contribuyó en la preparación del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

DAS, P., KUMAR, P., KUMAR, M., *et al.* 2017. Purification and molecular characterization of chitinases from soil actinomycetes. *African*

Tabla 3. Actividad celulolítica de 6 cepas de actinomicetos en medio conteniendo celulosa

No	Cepa	Media Real	Límite de confianza inferior -95,0 %	Límite de confianza superior +95,0 %
1	ESFe-12	74,5c	72,2	76,7
2	ESFe-5	73,5c	71,2	75,7
3	Plat-2	70,0bc	67,7	72,2
4	ESFe-13	68,5abc	66,2	70,7
5	Plat-3	68,5abc	66,2	70,7
6	Plat-1	54,5a	52,2	56,7

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

- Journal of Microbiology Research*, 11(27): 1086-1102.
- DING, T., YANG, L. J., ZHANG, W. D. and SHEN, Y. H. 2019. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC advances*, 9(38): 21964-21988.
- EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z., CONTRERAS-LEAL, E. A., CORONA-PEDRAZA, L. F. and GASTÉLUM-MARTÍNEZ, É. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5 CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1): 1-10.
- FERREIRA, F. V., HERRMANN-ANDRADE, A. M., CALABRESE, C. D., *et al.* 2020. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)). *Journal of Applied Microbiology*.
- GU, L., ZHANG, K., ZHANG, N., *et al.* 2020. Control of the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* using culture filtrate extract from *Streptomyces deccanensis* QY-3. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(11), 1573-1585.
- NAUANOVA, A. P., AIDARKULOVA, R. S., ANUARBEKOVA, S. S., *et al.* 2018. Ecology of actinomycetes in different soil ecosystems common in north kazakhstan: Assessment and genotyping. *Ekoloji*, 27(106): 1841-1856.
- PRUSKY, D., FREEMAN, S., DICKMAN, M.B. 2000. *Colletotrichum. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA, 393 p.
- QI, D., ZOU, L., ZHOU, D., CHEN, Y., GAO, Z., FENG, R., *et al.* 2019. Taxonomy and broad-spectrum antifungal activity of *Streptomyces* sp. SCA3-4 isolated from rhizosphere soil of *Opuntia stricta*. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2019.01390.
- RHAIEM, A. and TAYLOR, P. W. 2016. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with anthracnose symptoms on citrus, a new report for Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 146(1): 219-224.
- SOARES, A. C. F., SOUSA, C. D. S., GARRIDO, M. D. S., *et al.* 2016. Soil *Streptomyces* with *in vitro* activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4): 456-461.
- SALAZAR, E., R. HERNÁNDEZ, A. TAPIA, y GÓMEZ-ALPÍZAR, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agron. Costarricense*, 36(1):53-68. doi:10.15517/rac.v36i1.9964.
- SONG, L., JIANG, N., WEI, S., *et al.* 2020. Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against *Colletotrichum dematium* of sarcandra glabra. *Mycobiology*, 48(1), 37-43.
- YANG, Y., ZHANG, S. W., and LI, K. T. 2019. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* stain AUH-1 against phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 145.



Artículo de libre acceso bajo los términos de una *Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional*. Se permite, sin restricciones, el uso, distribución, traducción y reproducción del documento, siempre que la obra sea debidamente citada.