

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Actinomicetos, alternativa biológica contra la marchitez de las posturas por *Rhizoctonia solani* Kühn en frijol común

Actinomycetes, biological alternative on *damping-off* affectations caused by *Rhizoctonia solani* Kühn in common bean

Miriam Díaz-Díaz¹, Danieyis Sánchez Hurtado de Mendoza², René Cupull Santana¹, Alexander Bernal Cabrera³, Ricardo Medina Marrero¹, Miriam Carballo Bargas³, Milagros García Bernal¹ y Mayra Acosta-Suárez⁴

¹ Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

² Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Villa Clara, Carretera a Maleza km 3½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 50100

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

⁴ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830

E-mail: miriamdd@uclv.cu

RESUMEN

Se evaluó el efecto del tratamiento a las semillas con cepas de actinomicetos (EA2, CB14 y su combinación) sobre la incidencia de la marchitez de las posturas causadas por *Rhizoctonia solani* Kühn en *Phaseolus vulgaris* L. cv. Velasco largo en condiciones de casa de cultivo. Se comparó con *Trichoderma harzianum* A-34, Celest®Top 312 FS y dos controles (positivo y negativo). Se empleó suelo Pardo mullido medianamente lavado estéril y no estéril, bajo un diseño completamente aleatorizado. El tratamiento a la semilla fue realizado por recubrimiento, con almidón de yuca 8 % como adherente. La incidencia por *R. solani* se determinó a los 21 días posteriores a la siembra de las semillas. En el suelo no estéril se encontraron las menores incidencias provocadas por *R. solani* con el uso del Celest®Top 312 FS, el cual no difirió de la combinación de actinomicetos CB14+EA2, pero sí respecto al resto de los tratamientos. En el suelo estéril, los menores porcentajes de incidencia se obtuvieron al utilizar la combinación de cepas de actinomicetos (CB14+EA2).

Palabras clave: agentes biológicos, enfermedades fúngicas, *Phaseolus vulgaris*, recubrimiento a la semilla

ABSTRACT

The effect of seed treatment with the actinomycetes strains EA2 and CB14, and their combination, on *damping-off* incidence caused by *Rhizoctonia solani* Kühn in *Phaseolus vulgaris* L. cv. Velasco largo was evaluated under greenhouse conditions. These strains were compared with *Trichoderma harzianum* A-34, Celest®Top 312 FS and two controls (positive and negative). Inceptisol sterile and non-sterile soil was used under a completely randomized design. The coating seeds with strains were made using 8 % cassava starch. The incidence of *R. solani* was determined 21 days after sowing. In non-sterile soil, the lowest incidences caused by *R. solani* were found with Celest®Top 312 FS, which did not significantly differ from

the combination of actinomycete strains CB14 + EA2, but yes with the rest of the treatments. In the sterile soil, the lowest percentages of incidences were obtained with the combination of actinomycete strains (CB14 + EA2).

Keywords: biological agents, fungi disease, *Phaseolus vulgaris*, seed coating

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), ocupa más del 90 % del área cultivada total de especies de *Phaseolus* en todo el mundo (León *et al.*, 2008). En países de Asia, África y América Latina representa una de las principales fuentes calórico-proteicas para cerca de 500 millones de personas (Romero *et al.*, 2013).

Los hongos fitopatógenos del suelo representan un grupo de microorganismos que requieren métodos muy diferentes tanto para su estudio como para su control, debido a su hábitat y relaciones ecológicas con bacterias, virus y otros hongos. Entre las especies más importantes se encuentra *Rhizoctonia solani* Kühn, agente causal de la rizoctoniosis, conocida en muchos lugares como chancro del cuello, tallo hueco, *damping off* o marchitez de las posturas, pudriciones del tallo y órganos subterráneos, en numerosas plantas cultivadas y silvestres. El hongo presenta amplia distribución mundial informado en numerosos países (Herrera, 2004).

Una de las medidas preventivas milenarias utilizadas por el hombre para reducir las afectaciones causadas por agentes fitopatógenos es el tratamiento de semillas. Esta práctica en su sentido más amplio, corresponde a la aplicación de agentes biológicos, físicos y químicos a las semillas para mejorar la germinación y el crecimiento de cultivos (Ojeda, 2014; Rojas, 2016).

Diversas investigaciones han centrado la búsqueda de nuevas alternativas biológicas para el control de enfermedades fúngicas asociadas con la semilla de frijol común, principalmente de origen bacteriano entre las que se destacan los actinomicetos, por su prolífica producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios (Prashith *et al.*, 2010).

El uso de estos microorganismos como agentes de control biológico de enfermedades radicales es de gran interés en la actualidad, debido a que la presencia en la rizosfera de los mismos puede afectar el crecimiento y proliferación de hongos fitopatógenos del suelo ya sea por la competencia de nutrientes o por la producción de metabolitos secundarios (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007).

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento a la semilla con cepas de actinomicetos (EA2 y CB14, y su combinación) sobre la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* en *P. vulgaris* cv. Velasco largo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, durante el período comprendido entre enero y febrero de 2017.

Se emplearon dos cepas de actinomicetos (EA2 y CB14) y el hongo fitopatógeno *R. solani* (AG 4 HGI) pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del propio Centro.

Para el desarrollo del experimento se utilizó suelo Pardo mullido medianamente lavado según la clasificación de Hernández *et al.* (2015) proveniente de un suelo en barbecho. Se empleó en el experimento suelo estéril y no estéril. Para esterilizar el suelo, este fue sometido durante 1 hora a 121 °C, fueron realizadas tres sesiones de esterilizaciones intercalando 24 horas de reposo, en autoclave Hirayama.

Preparación del inóculo

Los actinomicetos se subcultivaron en erlenmeyer con 100 mL de Caldo Triptona Soya (BioCen) y se colocaron en un agitador orbital Gerhardt, durante cinco días a 120 rpm y temperatura entre 28-30 °C. El inóculo se ajustó a una concentración total de $9,5 \times 10^8$ células mL⁻¹ mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic) y aumento 400X.

Para la multiplicación de la cepa *T. harzianum* A-34 procedente del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV) se utilizaron erlenmeyer estériles de 250 mL en los que se vertieron 100 mL del medio de cultivo líquido Caldo de Papa Dextrosa (BioCen), a un pH de 5,5. En cada frasco se inoculó un disco de micelio de 10 mm de diámetro del cultivo previamente

crecido durante 72 h en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se colocaron en un agitador orbital Gerhardt, durante tres días a 120 rpm y temperatura aproximada de 29 ± 1 °C. El inóculo se ajustó a una concentración de $2,5 \times 10^8$ conidios mL^{-1} mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic) con aumento 400X.

Material vegetal utilizado en el experimento

Se emplearon semillas certificadas de *P. vulgaris* L. cv. Velasco largo (testa roja) registradas en el Listado oficial de variedades comerciales (MINAG, 2016) procedentes de la Unidad Estatal Básica (UEB) Semillas Villa Clara. El poder germinativo de las semillas empleadas fue de 100 %, las que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % y lavadas en agua destilada estéril durante 3 min.

Recubrimiento de las semillas

Las semillas se recubrieron según la metodología de Hamdi (1985) modificada por Cupull *et al.* (2003), la cual emplea zeolita procedente de la cantera de San Juan de los Yeras, Ranchuelo, Villa Clara (0,5 mm de diámetro de partículas) como sustrato y almidón de yuca preparado al 8 % como adherente. A 5 g de zeolita se añadieron 5 mL de suspensión de los agentes biológicos a la concentración antes referida. La proporción de semilla por zeolita utilizada fue de 7:1 (m/m). Se secaron al aire durante 48 h y posteriormente fueron sembradas las mismas.

Multiplicación del hongo fitopatógeno *R. solani*

Para la multiplicación del hongo fitopatógeno *R. solani* se utilizó erlenmeyer estéril con 100 g de arroz con cáscara en 100 mL de agua destilada y se esterilizó a 121 °C en autoclave durante 1h, pasado 24 horas y a temperatura ambiente se inoculó con 4 discos de micelio del hongo de 1 cm de diámetro y se incubaron a 28 ± 2 °C por 10 días.

Inoculación

El hongo fitopatógeno se inoculó al suelo al 2 % en recipiente plásticos (marca Magenta), con capacidad de 450 g, homogenizando suelo-hongo fitopatógeno 48 h antes de la siembra. En cada magenta se sembraron de forma manual tres semillas, las cuales ya estaban recubiertas con los agentes biológicos. La humedad del suelo se mantuvo agregando inicialmente 230 mL de agua

decolorada por magentas y manteniendo el riego periódicamente según las necesidades de las plantas y de forma uniforme. Se utilizaron ocho tratamientos para el suelo estéril e igual cantidad para suelo no estéril (cepas de actinomiceto EA2, CB14 y su combinación, que se compararon con *T. harzianum* A-34, Celest®Top 312 FS (tiametoxan + difenoconazol + fludioxonilo) a dosis de 0,192 L i.a. por kg de semilla) y otros dos controles (positivo y negativo) con cinco réplicas bajo un diseño completamente aleatorizado. El control positivo consistió en no realizar tratamiento de semilla e inocular el hongo patógeno y el control negativo no se hizo tratamiento de la semilla ni se inoculó con el hongo patógeno el suelo.

A los 21 días después de la siembra (dds) se evaluó la incidencia de la enfermedad provocadas por *R. solani*, mediante la fórmula propuesta por Ciba-Geigy (1981):

$$I (\%) = \frac{\text{Número de plantas afectadas}}{\text{Número de plantas evaluadas}} \times 100$$

Procesamiento estadístico de los datos

Los valores de incidencia se transformaron a la raíz cuadrada de $x + 0,5$ para satisfacer los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad. Posteriormente, se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante la prueba de HSD Tukey para $p \leq 0,05$. El procesamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) v. 21 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los resultados de las incidencias provocadas por *R. solani* al tratar las semillas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest®Top 312 FS, en un suelo no estéril a los 21 dds.

En el suelo no estéril 21 dds el menor valor de incidencia de la enfermedad se alcanzó cuando se protegió la semilla con el Celest®Top 312 FS el cual difirió significativamente con el control positivo (suelo infectado con el hongo fitopatógeno y sin tratamiento a la semilla), los tratamientos biológicos con las cepas de actinomiceto CB14 y EA2, *T. harzianum* y el control negativo (suelo no infectado con el hongo fitopatógeno y sin tratamiento de semilla), similares resultados obtuvieron Ojeda (2014) y Rojas (2016) al mostrar que Celest®Top 312.5

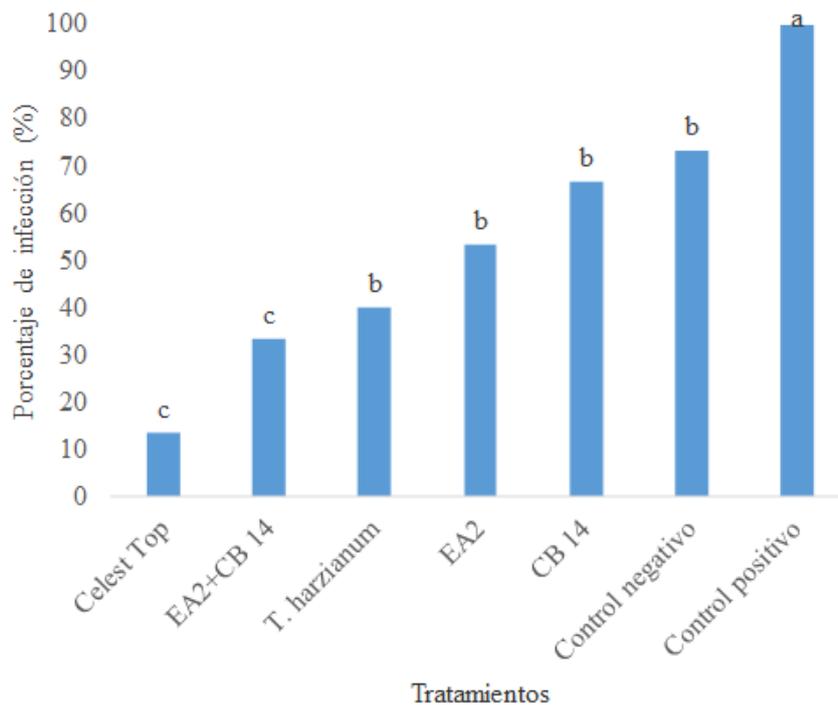


Figura 1. Incidencia de la enfermedad provocada por *R. solani* en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y control químico, en un suelo no estéril 21 dds

*Letras desiguales sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba de HDS Tukey para ($p \leq 0,05$) $n=5$

FS posee un amplio espectro de acción, lo que permite el control de hongos de la semilla y de importantes insectos plagas en el inicio del cultivo. Estos resultados son similares a los señalados por Abawi y Pastor-Corrales (1990), quienes observaron que los fungicidas aplicados a la semilla generalmente protegen a las plantas por dos a tres semanas después de la siembra. Estudios realizados por Rodríguez (2005) mostraron que las plantas de frijol inoculadas con *R. solani* y sin tratamiento a la semilla presentaron mayores afectaciones que las no inoculadas con este hongo fitopatógeno.

El análisis muestra que no existen diferencias estadísticas entre Celest®Top 312 FS y la combinación de actinomicetos EA2+CB14. Según estudios de Franco-Correa (2009) los actinomicetos son colonizadores de la rizosfera, capaces de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos del suelo. Singh *et al.* (2015) sugirieron que los actinomicetos pueden utilizarse para una mejora significativa del crecimiento de las plantas y el aumento de la actividad de sistemas enzimáticos defensivos con el fin de hacer frente al estrés inducido por *R. solani*, lo cual contribuye a una mayor sanidad de los cultivos. La presencia de actinomicetos

disminuye la incidencia de los hongos fitopatógenos (Medina *et al.*, 2013).

La combinación de actinomicetos EA2+CB14 difirieron con el resto de los tratamientos biológicos utilizados, similares resultados revelaron Donmez *et al.* (2015), los que señalan que los agentes de biocontrol podrían desempeñar un papel esencial en el manejo de las enfermedades de la podredumbre de las raíces en papa y frijol común.

Por otro lado, este resultado indica que el uso de microorganismos múltiples compatibles (consorcios microbianos) ya sean dentro de una misma especie o especies diferentes refuerzan las actividades de biocontrol sobre los agentes fitopatógenos. Es probable que los antagonistas individuales sean menos activos en todos los ambientes en los que se aplica a diferencia de los inóculos mixtos que tienen una gama más amplia de adaptaciones ambientales tales como diferentes valores de pH, materia orgánica del suelo, fósforo y contenido de humedad y podrían ejercer una colonización efectiva de las raíces de las plantas.

En la Figura 2 se muestran los resultados de las incidencias provocadas por *R. solani* al tratar las semillas con cepas de actinomicetos,

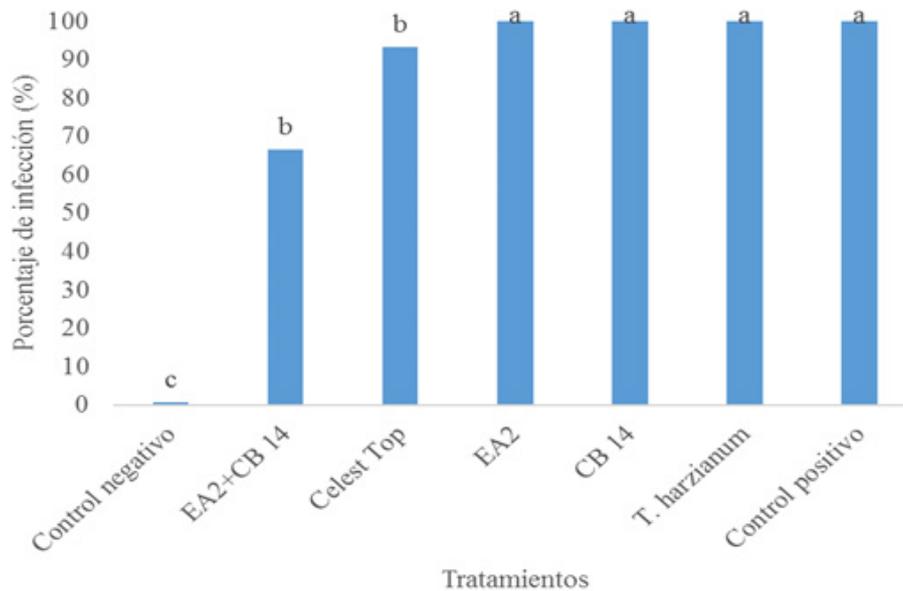


Figura 2. Incidencia de la enfermedad provocada por *R. solani* en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y control químico, en un suelo estéril 21 dds

*Letras sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba de HDS Tukey para ($p \leq 0,05$) $n=5$

T. harzianum y Celest®Top 312 FS, en un suelo estéril a los 21 dds.

Los menores valores de afectación de la enfermedad se obtuvieron en los tratamientos donde se protegieron las semillas con la combinación de cepas de actinomicetos (EA2+CB14) y el Celest Top. Estos tratamientos no difirieron estadísticamente entre ellos, pero sí de los otros (control positivo, *T. harzianum*, CB 14 y EA 2), que mostraron los mayores porcentajes de infección provocados por el hongo patógeno. En el control negativo no hubo infección por *R. solani*, debido a las características del tratamiento.

El efecto obtenido en el tratamiento a las semillas del frijol común con la combinación de cepas de actinomicetos sobre la enfermedad explica la acción efectiva de estas, las cuales son capaces de establecerse rápido en el suelo y colonizar su nicho ecológico a diferencias de cuando se aplican de manera individual o se trata la semilla con un producto químico, este último de acción limitada en el tiempo.

El menor valor de incidencia de la enfermedad lo alcanzó el control negativo que mostró diferencias estadísticas significativas cuando se protegió la semilla con la combinación de cepas de actinomicetos (EA2+CB14) y con el resto de los tratamientos.

Además, hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se protegió la semilla con la combinación de cepas de actinomicetos

(EA2+CB14) con el resto de los tratamientos (Celest®Top, las cepas de actinomiceto CB14, EA2 y *T. harzianum*). Numerosos estudios muestran que los actinomicetos surgen como una prometedora fuente de controladores biológicos (Goudjala *et al.*, 2014). Resultados recientes de Singh *et al.* (2015) observaron una reducción significativa de la enfermedad del 47-63% frente a *R. solani* en plantas de tomate pre tratadas con actinomicetos. Estudios realizados por Goudjal *et al.* (2014) expusieron que seis cepas de actinomicetos mostraron su potencial de biocontrol “*in vivo*” sobre *R. solani* en suelos estéril y no estéril.

CONCLUSIONES

La utilización de actinomicetos en el tratamiento a la semilla constituye una alternativa para reducir las afectaciones por *R. solani* en el frijol común.

El tratamiento a la semilla con la combinación de cepas de actinomicetos CB14+EA2 constituye una alternativa para reducir las afectaciones por *R. solani* en el frijol común, de manera similar al Celest®Top 312 FS.

BIBLIOGRAFIA

ABAWI, G. S., PASTOR, M. A.C. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa:

- Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 114 p.
- CIBA-GEIGY. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Werner Püntener. División Agricultura. CIBA-GEIGY S.A. Basilea. Suiza, 205 p.
- CUPULL, R., ANDREU, C., PÉREZ, C., DELGADO, I. y CUPULL, M. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Centro Agrícola*, 30 (1): 21-25.
- DONMEZ, M. F., UYSAL, B., DEMIRCI, E., ERCISLI, S. y CAKMAKCI, R. 2015. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn on potato and bean using antagonist bacteria. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 14 (5): 29-40.
- FRANCO-CORREA, M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. Perú Biol.*, 16 (2): 239-242.
- GOUDJAL, Y., TOUMATIA, O., YEKKOUR, A., SABAOU, N., MATHIEU, F. and ZITOUNI, A. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169 (1): 59-65.
- HAMDI, Y. A. 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO. 49, ONUFAO, 188 p.
- HERNÁNDEZ, A., PÉREZ, J. M., BOSCH, D., RIVERO, N. 2015. Clasificación de los Suelos de Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba, 93 p.
- HERRERA, L. 2004. Los hongos fitopatógenos de los suelos tropicales y subtropicales. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, 100 p.
- LEÓN, I., FAURE, B., RODRÍGUEZ, O., BENÍTEZ, R., SUÁREZ, Y. y RODRÍGUEZ, R. 2008. Selección de nuevas variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) frente a las principales enfermedades del cultivo en Cuba. *Fitosanidad*, 12 (1): 27-31.
- MEDINA, D., CASTILLO, H., FUENTE, O. y OLIVAS, F. 2013. Actinomicetos antagonistas contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.*, 4 (8): 1187-1196.
- MINAG. 2016. Listado oficial de variedades comerciales. Subdirección de certificación de semilla. CENSA, Mayabeque, Cuba., 41 p.
- PRASHITH, K., SHOBHA, K. S. and ONKARAPPA, R. 2010. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharmacy Res.*, 3: 250-256.
- OJEDA, T. A. 2014. Efecto del tratamiento a la semilla con Celest®Top sobre las plagas y el rendimiento agrícola en maní. Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba, 32 p.
- RODRÍGUEZ, W. M. 2005. Desarrollo de una metodología para demostrar los efectos benéficos de las Micorrizas Vesículo Arbusculares en la reducción de daños causados por *Rhizoctonia solani* en plantas cultivadas. Tesis para optar por el título de ingeniero agrónomo, Escuela agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 22 p.
- ROJAS, L. B. 2016. Efecto del tratamiento a las semillas con Celest®Top en indicadores de crecimiento, plagas y rendimientos agrícolas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba, 44 p.

ROMERO, A., DOVAL, M., STURLA, A. y JUDIS, A. 2013. Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 11 p.

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. Monografía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México, 2 p.

SINGH, S.P., GUPTA, R., GAUR, R. and SRIVASTAVA, A. 2015. Antagonistic actinomycetes mediated resistance in *Solanum lycopersicum* L. against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proc. National. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, 87 (3): 789-798.

Recibido el 3 de noviembre de 2017 y aceptado el 12 de marzo de 2018