

Control *in vitro* de *Dickeya dadantii* cepa 3937 con actinomicetos del suelo

Evangelina Quiñones-Aguilar | Zahaed Evangelista-Martínez | Gabriel Rincón-Enríquez
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño

correo-e: grincon@ciatej.mx

Resumen

La pudrición blanda en plantas es provocada principalmente por bacterias fitopatógenas, entre las que se encuentran *Dickeya* sp. y *Pectobacterium* sp. Esta enfermedad provoca cuantiosas pérdidas económicas en distintos cultivos de importancia alimenticia, industrial y ornamental; por ejemplo, en papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), agave (*Agave* sp.). *Dickeya dadantii* es una enterobacteria Gram negativa asociada a problemas de pudrición blanda en varios cultivos como agave y ornamentales. Las estrategias de control de este fitopatógeno no han mostrado efectividad total, por lo cual se exploran otros métodos de control, de los que destacan los relacionados con control biológico a través de microorganismos, como los actinomicetos. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de diversos actinomicetos aislados de suelos agrícolas contra *D. dadantii* en condiciones *in vitro*. Se realizó un experimento con 81 tratamientos y tres repeticiones en un diseño completamente al azar. Se evaluó la inhibición de *D. dadantii* cepa 3937 empleando una escala ordinal de inhibición, los datos fueron analizados mediante Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). Los resultados mostraron que los actinomicetos ABV55 y ABV79 inhibieron por completo el crecimiento de *D. dadantii*, lo que sugiere su potencial empleo en estrategias de control biológico.

Palabras clave: pudrición blanda, *Erwinia chrysanthemi*, actinobacterias.

Introducción

D. dadantii (anteriormente *Erwinia chrysanthemi*) es uno de los agentes causales de la pudrición blanda en cultivos de importancia agrícola en México como agave, papa, cultivos ornamentales (crisantemo, violeta africana), entre otros. El principal mecanismo que presenta esta bacteria fitopatógena para producir la enfermedad es la producción de enzimas pectolíticas (Barras *et al.*, 1994) que degradan los componentes de la pared vegetal y provocan con ello una maceración del tejido de la planta. En Europa se está proponiendo a *Dickeya solani* como una nueva especie responsable de la pudrición en papa (Toth *et al.*, 2011). Por tanto, el grupo de las especies del género *Dickeya* se halla entre las 10 fitobacterias de importancia agrícola a nivel mundial (Mansfield *et al.*, 2012).

El combate de ese tipo de bacterias se realiza principalmente mediante métodos químicos que involucran estrategias de prácticas culturales para evitar la propagación del inóculo: empleo de material de propagación sano (semilla, propágulos vegetativos); estrategias de generación de variedades resistentes o tolerantes a las enfermedades por métodos de mejoramiento genético tradicional o biotecnológico (transgénesis); métodos químicos que implican el empleo de antibióticos (estreptomicina y sus derivados, oxytetraciclina, kasugamicina o virginiamicina) y compuestos a base de sales como el cobre; finalmente, estrategias donde se involucra el control biológico.

En el trabajo presentado por Czajkowski *et al.* (2011) se mencionan las principales estrategias de control biológico empleadas contra *Dickeya sp.* Destacan el empleo de microorganismos antagónicos que compiten por nutrientes, espacio, antibiosis o por la inducción del sistema de resistencia de la planta, como *Pseudomonas sp.* (con o sin fluorescencia), bacterias ácidos lácticas, *Bacillus subtilis*, *Bdellovibrio bacteriovorus*. Igualmente se comenta el empleo de bacteriófagos (virus patógenos de bacterias)

en el control de las especies de *Dickeya*; no obstante, Czajkowski *et al.* (2011) mencionan que estos virus no han sido exitosos por la falta de movilidad de las partículas virales y porque las bacterias rápidamente crean mecanismos de resistencia.

A pesar de estos esfuerzos en el área del control biológico, el empleo de actinomicetos no ha sido evaluado para combatir este tipo de bacterias fitopatógenas; por ello, el objetivo del estudio consistió en evaluar la actividad inhibitoria de actinomicetos aislados de suelos agrícolas contra el agente causal de la pudrición blanda (*D. dadantii*).

Metodología

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ). La cepa de la bacteria fitopatógena empleada en las pruebas de antagonismo microbiano fue *Dickeya dadantii* (Dd) cepa 3937. La confrontación *in vitro* de actinomicetos contra *Dickeya dadantii* se efectuó entre la colección de actinomicetos ABV (ABV01 a ABV80) con *D. dadantii* y un testigo que comprendía únicamente a la bacteria fitopatógena. Se empleó como medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) a pH de 7.0.

El experimento permaneció durante cinco días en incubación a 26 °C y la inhibición de Dd se evaluó cuando las placas control presentaban un crecimiento total sobre la superficie inicialmente inoculada sobre el medio de cultivo. El experimento se estableció usando un diseño completamente al azar con un total de 81 tratamientos (cada cepa de actinomiceto confrontada con Dd) y un tratamiento testigo (sólo con la bacteria fitopatógena). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

Se evaluó la inhibición del crecimiento de Dd mediante una escala ordinal propuesta por Quiñones-Aguilar *et al.* (2013), que se resume en 0, 1, 2, 3, 4 y 5, números que corresponden a porcentajes del crecimiento bacteriano del 0, ≤25%, ≤50%, ≤100% y

>100%, respectivamente. Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis e intervalos de confianza de la mediana ($P \leq 0.05$) a través del programa estadístico StatGraphics (StatGraphics, 2005).

Resultados y discusión

El análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas altamente significativas (0.0004) entre la capacidad de inhibición de Dd por parte de los distintos actinomicetos aislados (figura 1). Estos resultados revelan que varios de los actinomicetos evaluados podrían ser empleados en el desarrollo de productos, ya sea directamente como inóculos comerciales a base de estos microorganismos o como productos derivados del metabolismo de los aislamientos seccionados por su capacidad de inhibir a Dd. Los aislamientos ABV55 y ABV79 mostraron un valor de 0 en la escala ordinal de inhibición, lo que muestra una completa inhibición del crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* (figuras 1 y 2) y constituye un ejemplo de inhibición total por parte del actinomiceto.

Otros aislamientos de actinomiceto que inhibieron el crecimiento bacteriano de Dd entre un 1-25% fueron: ABV03, ABV05, ABV48, ABV49, ABV63, ABV69 y ABV78 (figura 1). De manera similar, algunos aislamientos no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de Dd (ABV37, etcétera) e incluso Dd llegó a crecer sobre ellos (ABV40, etcétera) (figura 2).

Estos resultados denotan que el empleo de actinomicetos como agentes de control biológico puede ser efectivo, inclusive existen algunos productos comerciales (como Actinovate) comercializados como biofungicidas y elaborados a base de esporas de actinomicetos (*Streptomyces lydicus*). Este tipo de productos es recomendado contra diversos fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia comercial como chile, fresa o uva.

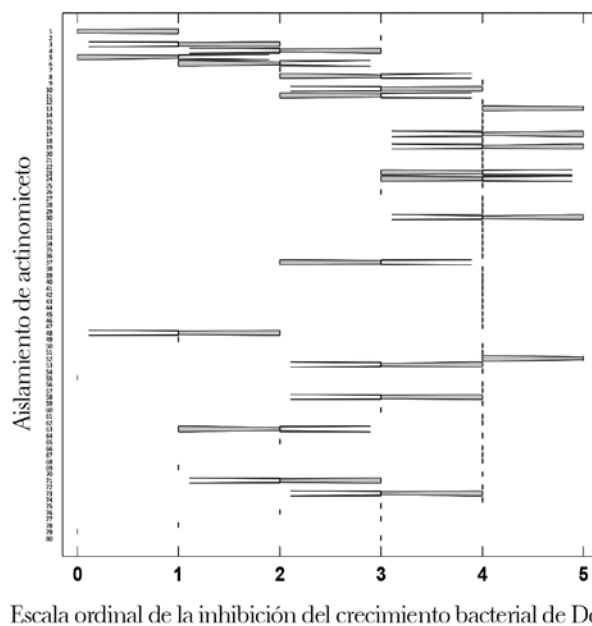


Figura 1. Efecto de 80 actinomicetos aislados del suelo, sobre el crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* cepa 3937 (Dd), agente causal de la pudrición blanda en distintas plantas hospederas. La prueba de Kruskal-Wallis produjo un estadístico de 219.4 con un valor de $P \leq 0.00004$. Las líneas prolongadas de las medianas indican un intervalo de confianza de la mediana de la escala ordinal de severidad a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

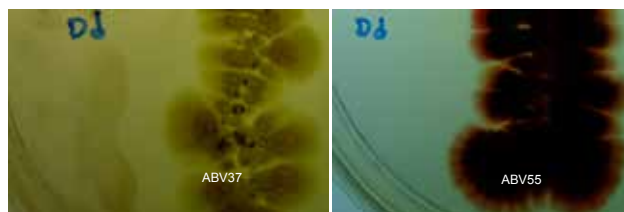


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Dickeya dadantii* cepa 3937 (Dd) sobre medio PDA en presencia de dos cepas de actinomicetos. El aislamiento ABV37 no fue capaz de inhibir a Dd mientras que ABV55 no permite ningún crecimiento de Dd (flechas).

Por otro lado, numerosos trabajos de investigación científica han mostrado que los actinomicetos son promisorios agentes de control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas. Varios estudios han informado acerca de los efectos de antagonismo microbiano por parte de actinomicetos del género *Streptomyces* contra microorganismos fitopatógenos.

Boukaew *et al.* (2011) aislaron y evaluaron la actividad inhibitoria de 265 cepas de *Streptomyces spp.*

contra *Sclerotium rolfsii*, causante de la pudrición de raíz y tallo en Chile; posteriormente los 14 mejores aislamientos probados contra *S. rolfsii* fueron usados contra *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana en Chile, en el que se encontraron tres cepas efectivas contra ambos fitopatógenos, identificados como *S. mycarofaciens* y dos como *S. philanthi*. Los actinomicetos pueden ser una alternativa viable al empleo de agroquímicos.

Conclusiones

Existen aislamientos de actinomicetos capaces de inhibir en distinto grado el crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* cepa 3937. Las cepas que inhibieron por completo el crecimiento de la bacteria fitopatógena fueron ABV55 y ABV79.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto AGS-2011-02-181930 del FOMIX Aguascalientes-Conacyt.

Referencias

- Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32:201-234.
- Boukaew, S., Chuenchit, S., Petcharat, V. (2011). Evaluation of *Streptomyces spp.* for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl*, 56(3):365-374.
- Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veenb, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6):999-1013.
- Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., Qui-Zapata, J.A. (2013). Actividad inhibitoria de actinobacterias del suelo para el biocontrol del agente causal del tizón de halo en frijol. Memoria en extenso del XXXVIII Congreso de la SMCS AC. 24-29 de Noviembre de 2013. *Terra Latinoamericana* 31, Suplemento especial III(1):277-281.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6):614-629.
- Statgraphics centurion (version XV) [software]. User manual. StatPoint, Inc. USA.
- Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Helia, V., Pirhonen, M., Tsror (Lahkim), L., Elphinstone, J.G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3):385-399.