

# Actividad Inhibitoria de Actinomicetos aislados de Hormigas Cultivadoras de Hongos (Hymenoptera: Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*

María Del Rosario Sánchez-Ovalle\*, Sergio René Sánchez-Peña, Gabriel Gallegos-Morales, Abiel Sánchez-Arizpe

Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923. Colonia Buenavista, 25315, Saltillo, Coah., México. E-mail: m\_ross31@hotmail.com. (\*Autor responsable).

## Abstract

Twenty nine strains of actinomycetes were isolated from the outer surface of leafcutter ants (fungus cultivators), sampled in the Mexican states of Coahuila, Nuevo Leon and Tamaulipas. Different species of the genera *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocetopus*, and *Trachymyrmex*, were collected. The inhibitory activity of these isolates *in vitro* with *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum lindemuthianum* was evaluated on a Czapek's agar plate. Of these 29 isolates, 13 showed inhibitory activity, 11 inhibited *C. lindemuthianum* and 3 *R. solani*, being different among them the isolates for each tested pathogen, except for strain AC14, which showed inhibition in both species found a 68.18% and 43.06% inhibition of *C. lindemuthianum* and *R. solani* respectively. Actinomycetes present in leafcutter ants can act as biological control agents for *R. solani* and *C. lindemuthianum*.

**Key words:** Antagonism, cutting ants, *Rhizoctonia solani*, *Leucocoprinus*, inhibition

## Resumen

Se aislaron 29 cepas de actinomicetos de la superficie externa de hormigas cortadoras (cultivadoras de hongos), muestreadas en los estados mexicanos de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, recolectándose especies diferentes de los géneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocetopus*, y *Trachymyrmex*. Se evaluó la actividad inhibitoria de estos aislados *in vitro* con *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani* en cajas petri con agar Czapeck. De los 29 aislados 13 presentaron actividad inhibitoria, 11 inhibieron a *C. lindemuthianum* y 3 a *R. solani* siendo entre sí distintos los aislados para cada patógeno evaluado, a excepción de la cepa AC14, la cual presentó inhibición en ambos patógenos encontrándose un 68.18% y 43.06% de inhibición sobre *C. lindemuthianum* y *R. solani* respectivamente. Los actinomicetos presentes en hormigas cultivadoras pueden actuar como agentes de control biológico de *R. solani* y *C. lindemuthianum*.

**Palabras clave:** Antagonismo, hormigas cortadoras, *Rhizoctonia solani*, *Leucocoprinus*, inhibición.

## Introducción

Los microorganismos fitopatógenos han sido, por muchos años, los causantes de daños en cultivos de importancia para la alimentación. El control químico es el que se ha empleado más comúnmente y el que más problemas de contaminación ambiental ha causado, tales como resistencia, persistencia, toxicidad para el hombre y su medio ambiente (Weller, 1988). Es por ello, que se han buscado alternativas para su control, una de ellas es mediante el uso de microorganismos como bacterias y hongos.

Este método de control es persistente en el suelo, e inofensivo para plantas y animales, no causa envenenamiento por residuos y es de bajo costo (Atkinson y Watson, 2000). Aunado a ello se ha demostrado que la efectividad de los fungicidas producidos por microorganismos antagonistas está teniendo mayor interés, como alternativa para el combate de plagas.

La asociación tripartita entre bacterias (actinomicetos) que producen antibióticos, y el hongo *Leucocoprinus* - que crecen asociados a hormigas cultivadoras de hongos- puede proporcionar una nueva vía para la identificación,

producción y aplicación de antibióticos para el tratamiento de algunas enfermedades tanto en seres humanos como en otros organismos (Currie *et al.*, 1999).

Se ha encontrado la presencia de una especie del género *Streptomyces* o *Pseudonocardia* en el cuerpo de las hormigas. Este grupo de bacterias filamentosas, generalmente grampositivas, forma una estructura de filamentos ramificados y se desarrollan en un micelio.

Estas bacterias filamentosas producen antibióticos que actúan específicamente sobre los parásitos que invaden los hongos que sustentan a las hormigas. Estos metabolitos suprimen el crecimiento del hongo *Escovopsis*, un parásito que destruye a los hongos simbióticos con las hormigas. Este tercer integrante simbiótico se transmite verticalmente de las hormigas progenitoras a las colonias nacientes (Abyad, 1996)

Uno de los hongos fitopatógenos importantes es *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal de Antracnosis, es la principal enfermedad en zonas situadas en altitudes mayores a los 1,000 m; la infección y desarrollo de este patógeno son favorecidos por temperaturas frescas (13-25 °C) y alta humedad relativa, en forma de lluvias moderadas y frecuentes. Las fuentes primarias de inóculo provienen de residuos de cosecha, semillas infectadas y plantas enfermas en lotes vecinos. La enfermedad es diseminada por semilla contaminada y por salpicadura de lluvia. La antracnosis puede afectar cualquier órgano aéreo, desde el estado de germinación hasta el llenado de vaina y formación de grano (madurez fisiológica). Externamente aparecen manchas de borde definido oscuro-rojizo (Agrios, 1985). Otro de los hongos fitopatógenos más importantes del suelo es *Rhizoctonia solani* que afecta al cultivo de papa de diferentes maneras. Se encuentra distribuido en suelos de todo el mundo, cultivados, o no cultivados, constituye un patógeno extendido en los sistemas de cultivo de papa y causa necrosis en las partes tiernas de plantas jóvenes, ataca tallos y estolones. Los daños más severos se producen en primavera, poco después de la plantación; el hongo afecta los brotes subterráneos anulando o retardando su emergencia, especialmente en suelos fríos y muy húmedos lo que da como resultado desigualdad en el crecimiento, plantas débiles y fallas de emergencia (Randall, 1993).

Este hongo se puede encontrar en forma de esclerocio en el suelo, y en la superficie de tubérculos y el micelio en restos vegetales. La población de *R. solani* puede incrementarse cuando se cultiva papa en el mismo campo sucesivamente. El usar papa-semilla altamente infestada de esclerocios también favorece el incremento de inóculo en el suelo (Agrios, 1985). Las fallas de emergencia en campo, producto del ataque del hongo en brotes

emergentes, y los canchales en estolones y tallos, reducen el número de plantas por hectárea, lo que da como resultado una disminución en el rendimiento final. Sin embargo, el mayor daño es el incremento de tubérculos pequeños, deformes y agrietados, aumentando de esta forma el desecho, perdiendo capacidad comercializadora. La enfermedad es reconocida como un problema significativo para los productores, por las pérdidas económicas que ocasiona (Carling y Leiner, 1990).

Es por eso que se consideró de importancia llevar a cabo un programa de selección de actinomicetos simbióticos de hormigas, que tuvieran capacidad antagonista (fungistática o fungicida) a través de bioensayos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si los antibióticos que generan tienen actividad inhibitoria antagonista (fungicida o fungistática) sobre *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum lindemuthianum*.

## Materiales y Métodos

### Ubicación del área de trabajo

El trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coah., México durante el periodo de septiembre de 2005 a septiembre de 2006.

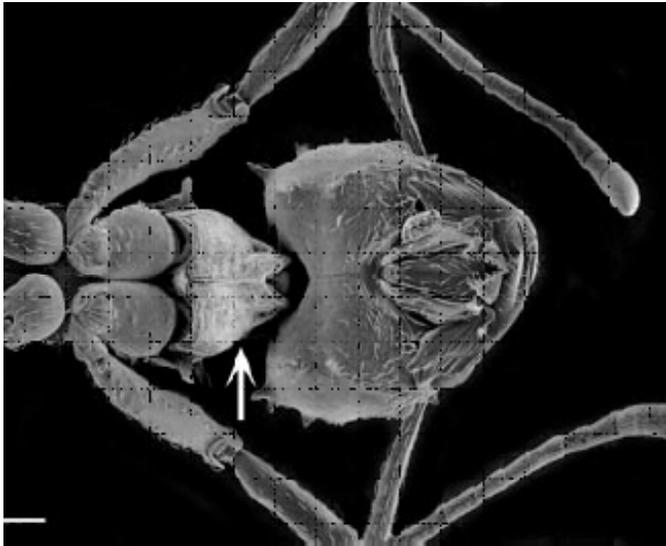
### Muestreo

Se llevo a cabo en zonas desérticas de Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León recolectándose especies diferentes de los géneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, y *Trachymyrmex*. El muestreo se realizó al azar en distintos hormigueros. Las muestras se guardaron en recipientes de polietileno previamente etiquetados, que se trasladaron en hieleras al laboratorio, donde se colocaron a temperaturas de 20 a 25° para su posterior procesamiento, el cual consistió en seleccionar las hormigas que presentaban mayor desarrollo del actinomiceto adherido a su tórax (Figura 1).

### Aislamiento de actinomicetos

Se prepararon cajas petri con medio Agar Caseína Almidón suplementado con glicerol (ACA-G), selectivo para actinomicetos. De cada una de las muestras obtenidas en campo, se colocó a las diversas hormigas en tubos ependorff estériles de 2 mL debidamente etiquetados. Una vez solidificado el medio en las cajas petri se procedió a extraer y purificar el actinomiceto adherido a las distintas muestras de hormigas con asas bacteriológicas estériles, se incubaron a  $30 \pm 25$  °C durante 5 días. El procedimiento anterior se realizó con asepsia en una cámara de flujo laminar. Las colonias con morfología típica polvorosa de actinomicetos, con olor a tierra mojada fueron purificadas

en medio Czapek Dox Agar (CDA) (Difco). La conservación se llevó a cabo por resiembras periódicas en cajas petri con el mismo medio, manteniéndolas en refrigeración a 4 °C para su posterior evaluación.



**Figura 1.** Actinomicetos adheridos al tórax de hormigas cultivadoras de hongos. Justo debajo de la boca es donde se resguardan. Al momento de realizar la siembra de su hongo simbionte, estas hormigas, también inoculan la bacteria que regula al hongo patógeno.

### Aislamiento de Patógenos a evaluar

El aislamiento de los patógenos se realizó a partir de siembras de tejido dañado por el hongo, en papa recolectada con costra negra. Estos se lavaron, luego, con agua corriente, y se extrajeron trozos pequeños que, seguidamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 %, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro y se secaron con papel estéril. Los trozos se colocaron en cajas petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), las cajas se incubaron a una temperatura de 25 °C por 4-5 d, para el desarrollo y su posterior purificación e identificación según Sneh *et al.* (1991). La conservación de cepas de *C. lindemuthianum* y *R. solani* fueron en medio de cultivo PDA.

### Prueba de antibiosis *in vitro*

Para llevar a cabo la selección de los actinomicetos con acción antagonica hacia *C. lindemuthianum* y *R. solani*, las cepas aisladas del tórax de las hormigas fueron sembradas en Czapek Dox Agar, colocando 3 explantes de 4 mm de diámetro en 3 puntos cardinales de la caja petri. Los explantes de actinomicetos sembrados en las cajas petri se incubaron a 25 °C por 72 h. Una vez

transcurrido ese tiempo, se procedió a colocar un disco de micelio del hongo del mismo diámetro que los actinomicetos en el centro de la caja, el testigo consistió en colocar un explante de 4 mm de diámetro de *R. solani* en el centro de dos cajas petri con medio czapek. Las placas se incubaron a 25 °C por 5 días. Para la evaluación posterior al tiempo de incubación, se procedió a medir con un vernier digital el crecimiento diametral de cada fitopatógeno a 5 días contra las cepas de actinomicetos en comparación con el crecimiento del hongo en el testigo (Castillo, 2000). El diseño estadístico que se utilizó fue comparación de medias con bloques completamente al azar con 3 repeticiones, donde los tratamientos se representaron por las cepas de actinomicetos. La unidad experimental consistió en una caja petri, para determinar las mejores cepas, se realizó la prueba de Tukey  $P=0.05$ .

## Resultados y Discusión

### Aislamiento de actinomicetos

El medio utilizado para el aislamiento de actinomicetos, el agar caseína almidón suplementado con glicerol permitió el aislamiento de 29 cepas de actinomicetos con efecto antagonico hacia otras bacterias y hongos presentes en el medio. Descrito anteriormente por Richter *et al.* (1994) quienes aislaron *Streptomyces* de la rizósfera del pino rojo en medio agar caseína almidón con antagonismo o comensalismo hacia los hongos *Laccaria bicolor* y *L. baccata*; y con Nesmith *et al.* (1985) y Liu *et al.* (1994), quienes utilizaron el medio ACA (suplementado con quitina) y lograron aislar una gran cantidad de cepas de *Streptomyces*.

### Prueba de antibiosis *in vitro*

De las 29 cepas de actinomicetos que se aislaron, y se evaluaron se obtuvo como resultado que solo 11 mostraron una inhibición sobre *C. lindemuthianum* con un promedio de 31.2 %; estas cepas fueron seleccionadas para realizar una segunda evaluación. La comparación de medias indica que el mejor tratamiento fue la cepa AC13 con 88.0 % de inhibición, siendo estadísticamente superior al resto de las demás evaluadas. Este tratamiento fue seguido de la cepa AC14 con 68.18 % y posteriormente las cepas AC15, AC17, AC22, AC24, AC5, AC9, AC19, AC6 con porcentajes de 35, 29, 22.7, 22.7, 18.18, 17.1, 13.6, y 12.7 % respectivamente (Cuadro 1). Y para *R. solani* se obtuvo que de las 29 cepas de actinomicetos aislados solo 3 presentaron actividad inhibitoria con un promedio de 42.3 % de inhibición (Cuadro 2). La cepa AC29 fue mejor estadísticamente (Tukey  $P=0.05$ ) con 58.06 % de inhibición, seguida de la cepa AC14 con un 43.06 % y por último la cepa AC20 con un porcentaje de 25.9 %.

**Cuadro 1.** Comparación de medias de medias de porcentajes de inhibición *in vitro* de diferentes cepas de actinomicetos en cultivos duales sobre *Colletotrichum lindemuthianum*.

| Actinomiceto              | Inhibición (%) |
|---------------------------|----------------|
| AC 13                     | 88.0 A         |
| AC 14                     | 68.18 B        |
| AC 18                     | 35.0 C         |
| AC 15                     | 29.0 C         |
| AC 17                     | 22.7 CD        |
| AC 22                     | 22.7 CD        |
| AC 24                     | 18.18 CD       |
| AC 5                      | 17.0 D         |
| AC 9                      | 15.9 DE        |
| AC 19                     | 13.6 E         |
| AC 6                      | 12.7 E         |
| C.V. 6.25. Tukey (P=0.05) |                |

**Cuadro 2.** Comparación de medias de los porcentajes de inhibición *in vitro* de diferentes cepas de actinomicetos en cultivos duales sobre *Rhizoctonia solani*.

| Actinomiceto               | Inhibición (%) |
|----------------------------|----------------|
| AC 29                      | 58.06 A        |
| AC 14                      | 43.06 B        |
| AC 20                      | 25.9 C         |
| C.V. 12.53. Tukey (P=0.05) |                |

**Conclusiones**

El uso del medio de cultivo agar caseína almidón combinado con glicerol (ACA+G) es un medio adecuado para el aislamiento de actinomicetos contenidos en el tórax de las hormigas de los géneros *Acromyrmex*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus*, y *Trachymyrmex*.

En la superficie del tórax de las hormigas de las especies colectadas en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, están presentes actinomicetos con altos porcentajes de inhibición o antagonismo *in vitro* hacia *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*.

La cepa AC13 extraída de hormigas del genero *Cyphomyrmex* del estado de Nuevo León mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum* (88 %) y la mejor cepa AC29 extraída de la hormiga del género *Cyphomyrmex* del estado de Tamaulipas fue la que presentó mayor porcentaje de inhibición (58.06 %) contra *Rhizoctonia solani*.

Para la selección de actinomicetos con potencial activo inhibitorio es útil la evaluación *in vitro* para control de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*.

**Literatura Citada**

Abyad, M.S., M. A. Sayed, A.R. Shanshoury, S.M. Sabbagh. 1996. Antimicrobial activities of *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* and *S. citroflourescens* against fungal and bacterial pathogens of tomato in vitro. *Folia Microbiol.* 41(4): 321-328.

Agrios, N.G. 1985. *Fitopatología*. Ed. Limusa. México, D.F. 756 p.

Atkinson, D., C.A. Watson 2000. The Beneficial Rhizosphere: a dynamic entity. *Appl. Soil Ecol.* 15(2): 99-104.

Carling, D.E., R.H. Leiner. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathol.* 80 (10): 930-933.

Currie, C. R., J.A. Scott, R.C. Summerbell, D. Malloch. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.

Castillo, F.E. 2002. Efectividad *In vitro* de Actinomicetos aislados de Rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22(2): 203-207

Nesmith, W.C.Y., S.F. Jr. Jenkins. 1985. Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soil. *Phytopathol.* 75:1182-1187

Liu, D., B.E. Paulsruud, L.L. Kinkel, N.A. Anderson. 1994. Evaluation of isolation procedures and soil sources in selecting pathogensuppressive *Streptomyces* strains. (Abstract) *Phytopathol.* 84:1204

Randall, C.R. 1993. *Potato health management*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 193 p.

Richter, D.L., T.R. Zuelling, S.T., Bagley, J.N. Bruhn, 1994. Effects of red pine mycorrhizosphere streptomycetes on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi. *Phytopathol.* 84:1760.

Sneh, B., L. Burpee, A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopatological Society, St. Paul, MN, USA. 133 p.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Ann Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.