

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

## TRABAJO DE DIPLOMA

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

**Departamento:** Agronomía

## **TRABAJO DE DIPLOMA**

Efecto de cepas de actinomicetos sobre *Rhizoctonia solani* Kühn en frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.)

**Autor:** Eliannys Rodríguez Soris

**Tutores:** Dr.C Alexander Bernal Cabrera

Dr.C Ricardo Medina Marrero

**Consultante:** MSc. Miriam Díaz Díaz

Santa Clara, junio de 2018  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

## **Pensamiento**

“Solo tendremos el futuro que nosotros mismos seamos capaces de construir”

Fidel Castro

## **Agradecimientos**

Quiero agradecerle a Dios por darme luz cuando pensaba que todo estaba oscuro.

A mis tutores Dr.C Alexander Bernal Cabrera y Dr.C Ricardo Medina Marrero un enorme agradecimiento por su orientación, paciencia, y disposición; por la confianza que pusieron en mi para el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su apoyo.

A mi consultante MSc. Miriam Díaz Díaz, MSc. René Cupull Santana y Marlen, gracias por la orientación y ayuda brindada; por sus oportunos consejos, por enseñarme lo necesario para realizar este trabajo; además de trasmitirme todos sus conocimientos con buena disposición, por el apoyo sincero e incondicional que siempre tuvieron y por la confianza que depositaron en mí.

Le quiero agradecer a mi abuelo que, aunque ya no se encuentra entre nosotros, siempre está presente en mi corazón y sé que estaría orgulloso de mí, también a mi abuela por nunca dejar de estar pendiente de mí, por sus sabios consejos que siempre me ayudan a darle una solución a mis problemas y por guiarme por el buen camino y nunca darse por vencida conmigo.

A mi tía Neisy por ser mi ejemplo a seguir, mi amiga, mi confidente, por estar siempre cuando la necesito y por ser mi tercera mamá.

A mi mamá y a mi papá por darme la vida, por sus consejos y por creer siempre en mí, a mis hermanos por estar siempre a mi lado en el transcurso de la vida.

A mi novio Jorge, por su ayuda incondicional, por ser mi apoyo, alentarme, darme fuerzas para seguir hacia delante y brindarme todo su amor y cariño sin cansancio.

Al Dr.C Manuel Díaz Castellanos por estar apoyándome durante los cinco años, por enseñarme hacer una mejor persona, por sus buenos consejos sobre la vida, a Dr.Cs. Lidcay Herrera Isla por su ayuda brindada cuando más la necesitaba y por estar pendientes siempre.

A todas mis amistades que desde primer año estuvieron a mi lado día a día: Laura, Dayane, Lisania, Olga, Ofelia, Keni, Melisa, Danelis, Yudith, Arianna, Yandi, George Robert, Ramón, a todos los Carlos, Dainiel, José, Maylin, Leidy, Dayana, Gustavo, Maidiel, Adel en fin a toda el aula gracias por compartir conmigo estos cinco años, que, aunque tuve altas y bajas, lo importante fue que aprendí algo en todo momento y circunstancia. De cada uno me llevo un hermoso recuerdo y la enseñanza de que diferentes formas de ser pueden formar un equipo fuerte y exitoso y por luchar juntos en cada momento de esta maravillosa etapa. Gracias por apoyarme, brindarme ánimo, consejos, una amistad para toda la vida y tantos momentos inolvidables que pasamos juntos.

A los profesores que con su dedicación y comprensión contribuyeron de una forma u otra en mi formación estudiantil.

En fin, le quiero agradecer a todas esas personas que siempre me han brindado su amor, amistad y apoyo incondicional.

## **Dedicatoria**

A mi familia que día a día me han guiado con amor y sacrificio, haciéndome ver la necesidad de ser útil y responsable.

## Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de cuatro cepas de actinomicetos (CB14, EA2, CD24 y B8) sobre *Rhizoctonia solani* en frijol común, se realizó el enfrentamiento *in vitro* de estas cepas contra el hongo fitopatógeno *R. solani* (AG4 HGI) por el método de cultivo dual, así como se evaluó la compatibilidad *in vitro* entre las cepas de actinomicetos. Finalmente, se determinó el efecto del recubrimiento a las semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. Quivicán con cepas de actinomicetos aplicadas de forma individual y combinadas, *T. harzianum* y Celest Top sobre la incidencia y severidad de la enfermedad damping off en condiciones semicontroladas. Los tratamientos se compararon con dos controles (positivo y negativo). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 8 tratamientos y seis réplicas. Los resultados mostraron que las cepas de actinomicetos empleadas ejercieron un efecto antagónico *in vitro* sobre el hongo fitopatógeno *R. solani*, destacándose las cepas EA2 y B8 con porcentajes de inhibición de 82,27 y 79,22 %, respectivamente. De igual forma, se demostró que las combinaciones de las cepas de actinomicetos empleadas no presentaron incompatibilidad alguna entre ellas. En la incidencia del damping-off pre emergente, las cepas de actinomicetos CD 24 y CD24+B8 presentaron los mejores efectos de control; mientras en la post emergencia la combinación de actinomicetos CB14+EA2. El uso potencial de actinomicetos para evitar la incidencia y severidad de *R. solani* en el cultivo del frijol común aporta una alternativa más para la lucha contra este hongo en un programa de manejo integrado.

**Palabras clave:** actinobacterias, antagonismo, damping off, incidencia, severidad, tratamiento de la semilla

# Índice

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | <b>Introducción</b>  | 1  |
| 2.    | <b>Revisión Bibliográfica</b>  | 3  |
| 2.1   | Cultivo del frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)   | 3  |
| 2.1.1 | Generalidades  | 4  |
| 2.1.2 | Principales agentes fitopatógenos que inciden en el cultivo en Cuba  | 4  |
| 2.2   | Hongos fitopatógenos del suelo   | 4  |
| 2.2.1 | Principales hongos fitopatógenos del suelo que afectan el frijol común en Cuba   | 4  |
| 2.2.2 | Características generales de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn  | 4  |
| 2.2.3 | Microorganismos biocontroladores de hongos fitopatógenos del suelo   | 6  |
| 2.3   | Actinomicetos  | 7  |
| 2.3.1 | Características generales y clasificación  | 7  |
| 2.3.2 | Medios de cultivo para el aislamiento y multiplicación   | 10 |
| 2.3.3 | Antagonismo sobre hongos fitopatógenos del suelo   | 10 |
| 3.    | <b>Materiales y Métodos</b>  | 12 |
| 3.1   | Determinación de la actividad antagónica “ <i>in vitro</i> ” de las cepas de actinomicetos contra <i>R. solani</i>   | 12 |
| 3.2   | Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos   | 14 |
| 3.3   | Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a las semillas de frijol común sobre la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por <i>R. solani</i> | 14 |
| 3.3.1 | Incidencia de la marchitez de las posturas   | 16 |
| 3.3.2 | Severidad de la marchitez de las posturas  | 17 |
| 4.    | <b>Resultados y discusión</b>  | 18 |
| 4.1   | Determinación de la actividad antagónica “ <i>in vitro</i> ” de las cepas de actinomicetos contra <i>R. solani</i>   | 18 |
| 4.2   | Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos   | 21 |
| 4.3   | Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a las semillas de frijol común sobre la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por <i>R. solani</i> | 23 |
| 4.3.1 | Incidencia de la marchitez de las posturas   | 23 |

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>4.3.2</b> | Severidad de la marchitez de las posturas | 28 |
| <b>5.</b>    | <b>Conclusiones</b>                       | 31 |
| <b>6.</b>    | <b>Recomendaciones</b>                    | 32 |
| <b>7.</b>    | <b>Bibliografía</b>                       |    |
|              | <b>Anexos</b>                             |    |

# 1. Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), ocupa más del 90 % del área cultivada total de especies de *Phaseolus* en todo el mundo (Argaw y Akuma, 2015). En particular, 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 a las semillas (Syngenta, 2013). En Cuba, hasta la fecha, en el frijol común solo se usa el hongo antagonista *Trichoderma* spp. por sus mecanismos de acción sobre los hongos fitopatógenos del suelo (Stefanova, 2007; Martínez *et al.*, 2013).

A nivel mundial, se desarrollan investigaciones en la búsqueda de nuevas alternativas biológicas 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).

Los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, son microorganismos con propiedades quitinolíticas, alto contenido de guanina y citosina en su DNA, característica que los hace morfológicamente diversos entre sí y ayuda a diferenciarlos de otras bacterias Gram positivas.

El uso de estos microorganismos como agentes de control biológico de enfermedades radicales es de gran interés en la actualidad. La presencia en la rizósfera de *Streptomyces* spp., favorece el crecimiento de la planta y las protege contra los hongos patógenos del suelo, ya sea por la competencia de nutrientes o por la producción de metabolitos secundarios (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007).

Sobre la base de estos antecedentes, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

### **Hipótesis**

Si se encuentran cepas de actinomicetos compatibles y con acción antagonista sobre *Rhizoctonia solani*, entonces se contará con un agente de control biológico, para su empleo en el cultivo de *Phaseolus vulgaris* L.

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de cepas de actinomicetos como agente de control biológico sobre *Rhizoctonia solani* en el frijol común.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas de actinomicetos sobre *Rhizoctonia solani*
2. Evaluar la compatibilidad *in vitro* entre cepas de actinomicetos.
3. Evaluar el efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a la semilla sobre la incidencia y severidad de la enfermedad.

## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1 Cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### 2.1.1 Generalidades

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa comestible más importante en el mundo, cultivada en muchos países, en especial América Latina y África; siendo este una fuente importante de calorías, proteínas, fibras dietéticas, minerales y vitaminas para la alimentación humana (Rejane *et al.*, 2018).

Se cultiva en zonas tropicales y subtropicales. Esta característica permite agruparla en las denominadas especies termófilas, dado que no soporta bajas temperaturas, y presenta una enorme variabilidad genética (Arias *et al.*, 2007). Según Cronquist citado por Franco *et al.* (2004) su ubicación taxonómica es: Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Subclase: *Rosidae*, Orden: *Fabales*, Familia: *Fabaceae*, Género: *Phaseolus*, Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

Socorro *et al.* (1989) describen que el frijol común es una planta dicotiledónea de consistencia herbácea, el ciclo biológico es corto de carácter anual, de tamaño y hábito variables, ya que hay cultivares de crecimiento determinado como indeterminado (arbusto pequeño y trepadoras).

Las flores son vistosas, hermafroditas, por lo general zigomorfas. El fruto generalmente es seco y dehiscente (legumbre). Las semillas presentan un *hilum* especializado y complejo, pueden tener varias formas y ser de un solo color o poseer varios colores. El sistema radical está compuesto por una raíz principal, un gran número de raíces secundarias y raicillas. Al germinar, es de crecimiento rápido (UNEX, 2005).

#### 2.1.2 Principales agentes fitopatógenos que inciden en el cultivo en Cuba

El frijol común es afectado por alrededor de 50 enfermedades virales, entre las que se encuentra el mosaico común del frijol (BCMV), mosaico dorado, amarillo y moteado clorótico (Santalla *et al.*, 1998). También las bacterias juegan un papel

importante, principalmente *Pseudomonas phaseolicola* Van Hall y *Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Downson que produce el tizón bacteriano (Socorro *et al.*, 1989).

El daño ocasionado por enfermedades fúngicas foliares y radicales en el cultivo del frijol común constituye un serio problema, entre las más frecuentes en nuestro país se encuentran: Mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk., en Cuba se conoce la enfermedad como marchitez de las posturas o damping off. El estado anamórfico es: *Rhizoctonia solani* Kühn. También existen otras enfermedades tales como: Mancha angular (*Isariopsis griseola* Sacc.), Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* Corda.), Marchitez por Fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* Schlttdl.), Mildio polvoriento (*Erysiphe polygoni* DC.), Podredumbres de cuello y/o raíces (*Phytophthora* spp. Mont. de Bary., *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Pythium* spp Pringsh., *R. solani* Kühn, y la roya (*Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.) (Gonzalez, 1988).

## **2.2 Hongos fitopatógenos del suelo**

### **2.2.1 Principales hongos fitopatógenos del suelo que afectan al frijol común en Cuba**

Entre los hongos fitopatógenos del suelo que causan enfermedades radicales en el frijol común se destacan las especies *R. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseolina*, los cuales pueden ocasionar en nuestro país pérdidas en el rendimiento agrícola entre un 25 y un 50% (Díaz, 2011).

### **2.2.2 Características generales de *Rhizoctonia solani* Kühn**

*R. solani* es el agente causal de la rizoctoniosis, también conocida en muchos lugares como cáncer del cuello, tallo hueco, damping off o marchitez de las posturas, pudriciones del tallo y órganos subterráneos en un sin número de plantas cultivadas y silvestres (Mayea *et al.*, 1983).

Taxonomía: Familia: *Ceratobasidiaceae*, Orden: *Cantharellales*, Subclase: *Incertae sedis*, Clase: *Agaricomycetes*, División: *Basidiomycota*, Reino: *Fungi*. Este hongo

se clasifica dentro de la Clase: *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Orden: *Mycelia sterilia*. En su estado anamórfico corresponde con *Thanatephorus cucumeris* (Index-Fungorum, 2008).

En las plantas pequeñas aparecen en el tallo e hipocotilo úlceras de color pardo-rojizo, de varios tamaños, delimitadas por un borde oscuro, las que luego se vuelven ásperas, se secan y destruyen la médula (Mayea *et al.*, 1983). El hongo ataca además las raíces, causando pudriciones en la base de la planta (González, 1988). El micelio es ramificado, las dicotomías son en ángulo recto, tabicados a no menos de 10 mm del punto de inserción (Mardec, 2007) y está uniformemente distribuido por la superficie del hospedante, aunque a veces se aglomera y forma cordones visibles macroscópicamente. En los cordones de mayor espesor se forman los esclerocios de color pardo intenso, son de forma aplastada y redondeada, cubierto por un fieltro espeso y aterciopelado (González, 1988).

Las plantas más viejas pueden ser atacadas, pero sobre éstas la invasión del hongo se limita al tejido externo cortical, sobre el cual produce alargadas quemaduras y lesiones rojizas. Una parte de su ciclo lo pasa saprofiticamente sobre las partículas orgánicas del suelo o formando micorrizas, hasta que por determinados factores se vuelve perjudicial para los semilleros provocando pudriciones y otros trastornos (Mayea *et al.*, 1983).

En cuanto a las condiciones óptimas para su reproducción, requiere humedad alta en la superficie del suelo. En los brotes de los cultivos, las condiciones más propicias se presentan en la salida de la segunda brotación, debido a la mayor densidad de follaje. Los suelos arcillosos favorecen la presencia de esta enfermedad (Bayer, 2008). Los aislados de *R. solani* difieren en patogenicidad y morfología, así como en características culturales y fisiológicas. No es una especie única, sino una colección de poblaciones que da origen al concepto de Grupo Anastomosis (AG) en el cual se agrupan organismos de la misma especie que pueden entrecruzar sus hifas. Se han dividido en 14 AG (1 al 13 y el AGBI) (González, 2002), subdividiéndose en grupos según caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares (González, 2008). Los enfoques recientes para caracterizar los distintos aislamientos incorporan caracteres que se obtienen a través de técnicas moleculares como hibridación del ADN, el polimorfismo de la

longitud de los fragmentos de restricción y la secuenciación directa de genes, entre otros.

Nerey (2009) realizó la caracterización morfológica, patogénica y molecular de 60 aislados de *Rhizoctonia* spp. a partir de muestras de frijol común con síntomas típicos de la enfermedad tomadas en diferentes suelos de Cuba. Esta autora obtuvo que la mayoría de los aislados cubanos pertenecen a los grupos de anastomosis AG4 y AG2 de *R. solani* y que fueron capaces de causar lesiones de pudrición del hipocotilo y raíces del cultivo.

### **2.2.3 Microorganismos biocontroladores de hongos fitopatógenos del suelo**

Entre los microorganismos más empleados en el control biológico de hongos fitopatógenos del suelo se destaca el género *Trichoderma* Pers., el cual ha sido investigado por diferentes autores en Cuba (Stefanova, 2007; Pérez *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013). Otros microorganismos que han sido descritos como antagonistas de hongos del suelo, se encuentran *Bacillus subtilis* Ehrenberg. como antagonistas de *S. rolfisii* (Kimm *et al.*, 1997); *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula. como antagonista de *R. solani*, *S. rolfisii* y *M. phaseolina*; *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus cereus*, como antagonistas de *R. solani* (Echávez y Gómez, 1997) y *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* como antagonista de *R. solani* (Mora, 1996).

*Pseudomonas aeruginosa* Migula. tiene la capacidad de ser antagonista de varios patógenos asociados a las raíces de las plantas además de producir sideróforos, antibiosis e inducción de resistencia a la planta (Hernández, 2005).

El GLUTICID (fungicida biológico compuesto por los metabolitos de *P. aeruginosa*) se ha empleado también en el control de enfermedades foliares y del suelo reduciendo las afectaciones por *Alternaria solani* Sor., *U. phaseoli*, *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev. y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Stefanova *et al.*, 2001).

Bocourt *et al.* (2009) en una prospección de hongos fitopatógenos del suelo con potencialidades para el control biológico en agroecosistemas cubanos encontraron

en un suelo Ferralítico rojo con *Nicotiana tabacum* L., *Arachis hypogaea* L. y *Sorghum bicolor* (L.) Moench., nueve especies, entre las que citan a: *Aspergillus candidus* Link. antagonista de *Sclerotium cepivorum* Berk. y *M. phaseolina*; *Clonostachys rosa* (Link) Schoers, Samuel, Seyfery WW. Gams. antagonista de *R. solani* y *Fusarium solani*., y *Paecilomyces lilacinus* (Thorne) Samsan., biocontrolador de *M. phaseolina* y *S. cepivorum*.

### **2.3 Actinomicetos**

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo de microorganismos ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales. En un principio los actinomicetos se incluyeron entre los hongos porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud, dotados de un micelio verdadero; debido a esto se les denominó “hongos radiados”. Sin embargo, hoy en día, dado su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (Franco-Correa, 2009).

Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, tanto o más que las mixobacterias; sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Ezziyyani *et al.*, 2004). Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en el suelo, presentan un importante papel ecológico en el mismo (Franco-Correa, 2009).

#### **2.3.1 Características generales y clasificación**

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los *Actinomycetales* comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004). Los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0.5 a 2.0  $\mu\text{m}$ ),

son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótica (Sylvia, 2005), aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 a 78% de G+C. Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno, amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas. Frecuentemente, alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Leveau y Bouix, 2000).

La taxonomía de los actinomicetos ha avanzado mucho durante los últimos treinta años, al mismo tiempo que el número de géneros de este grupo, cuyo aumento debe atribuirse en gran parte al interés industrial que poseen. En el Anexo 1 se presenta un árbol filogenético con la descripción del número de géneros, órdenes y subórdenes (Prescott, 2002).

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y su crecimiento se registra entre 25-30 °C, en temperaturas inferiores a 5 °C el crecimiento es nulo y a temperaturas superiores a 55 °C solo algunas especies termofílicas de *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.* son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad (Stanley, 1994). De acuerdo a la especie son afectados por la disminución en la concentración de oxígeno, debido a que algunos de ellos son microaerofílicos y toleran bajas presiones parciales de dicho gas en el suelo (Koneman, 2001).

Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, que pueden estar presentes como conidias o como hifas vegetativas (Martín, 1980). Sin embargo, los métodos de aislamiento convencionales muestran que el 95% de los actinomicetos aislados a partir de

suelo pertenecen al género *Streptomyces*. Algunos de estos microorganismos no han sido identificados específicamente, y la posición filogenética de algunos subgrupos muestra que su divergencia corresponde con la de los géneros tradicionales de actinomicetos (Rheims *et al.*, 1999). Algunos géneros han sido informados como fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Frankia* y algunas cepas de las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Franco-Correa, 2008).

Los actinomicetos también han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidases entre otras, involucradas en el papel del micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos (Márquez *et al.*, 2003). El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizosfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal “*in vitro*”, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas, lo cual contribuye indirectamente a la promoción de crecimiento vegetal (ToKala *et al.*, 2002).

El concepto de *mycorrhiza helper bacteria* (MHB) fue introducido en un *Tansley Review: Helper Bacteria: una nueva dimensión de la simbiosis micorrícica* (Garbaye, 1994) que ha conllevado a nuevas investigaciones en el sistema modelo planta-hongo, en cuanto al significado de estas bacterias que promocionan la formación de las micorrizas y ocasionan muchos efectos fisiológicos en la interacción mutualista. El concepto de MHB es genérico, este depende del tipo de simbiosis micorrícica pero no de la posición taxonómica de la bacteria (Artursson *et al.*, 2006). Ciertos actinomicetos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*) han sido identificados como bacterias que se asocian al micelio de hongos ectomicorrícicos (Burke *et al.*, 2006) y solo hay una referencia de *Streptomyces coelicolor* asociado a *Glomus intraradices* en cultivos de sorgo (Abdel-Fatah y Mohamedin, 2000).

### **2.3.2 Medios de cultivos para el aislamiento y multiplicación de los actinomicetos**

La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, agar tripticasa soya, agar sangre o agar infusión cerebro corazón. Sin embargo, para la diferenciación y el desarrollo de esporas y/o pigmentos se necesita de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados polisacáridos como fuente de carbono, extracto de levadura o peptona (Bergey y Holt, 2000).

El crecimiento de las colonias de actinomicetos en medio sólido se puede ver a los 3 ó 4 días de incubación, pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días en desarrollarse y en algunas cepas de crecimiento lento hasta más de un mes de incubación. El crecimiento en medios líquidos estacionarios se restringe a la formación de una película en la superficie o quizás un sedimento algodonoso dejando el medio líquido transparente. Por lo cual para el crecimiento en medios líquidos se recomienda una agitación a velocidades de 200 ó 250 rpm para suministrar la mejor aireación posible. A diferencia de las bacterias no filamentosas, los actinomicetos pueden crecer formando “pellets” o agrupaciones de filamentos en medios líquidos (Prescott, 2002). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos como otras bacterias como las *mixobacterias* (Ben *et al.*, 1997) de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas.

### **2.3.3 Antagonismo sobre hongos fitopatógenos del suelo**

El suelo representa una fuente óptima para el aislamiento de microorganismos con actividad antagónica, los cuales pueden ser empleados como agentes de control. Entre los mecanismos de acción que utilizan los microorganismos antagonistas para el control biológico se encuentran: antibiosis, competencia, parasitismo, lisis celular y resistencia inducida en el hospedante. Diversos investigadores citan a las quitinasas, glucanasas y proteasas como enzimas involucradas en el control biológico de fitopatógenos (Aceves *et al.*, 2005; Yandigeri *et al.*, 2015).

Los actinomicetos se caracterizan por producir enzimas con actividad antimicrobiana, aspecto que ha sido evaluado en relación al biocontrol de fitopatógenos (Park *et al.*, 2002). El parasitismo de los hongos fitopatógenos, facilitado por la producción de enzimas hidrolíticas, está involucrado en el control biológico de enfermedades fúngicas. Entre las enzimas hidrolíticas, las quitinasas son de suma importancia teniendo en cuenta que la quitina es el mayor constituyente de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos. Las quitinasas inhiben la germinación de las esporas fúngicas y la elongación del tubo germinativo y lisan los tipos hifales (Kishore *et al.*, 2005).

Los actinomicetos producen una amplia variedad de hidrolasas extracelulares importantes en la descomposición de la materia orgánica en el suelo; estos parecen tener importancia entre la microbiota (Valois *et al.*, 1996). El antagonismo de los actinomicetos contra hongos ha sido demostrado para una amplia variedad de patógenos de plantas, tales como *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Verticillum*, *Fusarium* y *Macrophomina sp.* Por ejemplo, la cepa 5406 de *Streptomyces sp.* ha sido usada en China por más de 30 años para proteger los cultivos de algodón de hongos fitopatógenos del suelo (Valois *et al.*, 1996). Adicionalmente, Lahdenpera *et al.* (1991) desarrollaron un biofungicida que contiene células de *Streptomyces griseoviridis* para proteger los cultivos contra infecciones de *Fusarium* y *Alternaria*. Por otro lado, *Streptomyces sioyaensis* exhibe antagonismo contra varios hongos fitopatógenos como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *Colletotrichum higginsianum*, *Acremonium lactucum* H.J. Lin, C.Y. Chien & J.W. Huang y *Fusarium oxysporum* Schltdl (Hong *et al.*, 2002).

### 3. 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 octubre de 2017 y mayo de 2018.

#### Cepas de actinomicetos y hongo fitopatógeno

Se emplearon cuatro cepas de actinomicetos pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del propio Centro, seleccionadas a partir de su actividad antagonista “*in vitro*” frente a cuatro hongos fitopatógenos que afectan el frijol común (García, 2014) (Tabla1).

**Tabla 1.** Cepas de actinomicetos utilizadas en los estudios

| Cepas | Origen    | Lugar                               |
|-------|-----------|-------------------------------------|
| CB-14 | Sedimento | Cueva de Bellamar. Matanzas         |
| EA-2  | Endófito  | Arco Iris, Santa Clara. Villa Clara |
| CD-24 | Rizósfera | Cayo Las Dunas. Villa Clara         |
| B-8   | Rizósfera | Jardín Botánico UCLV                |

Se utilizó el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (cepa AG4 HGI) perteneciente a la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

#### 3.1 Determinación de la actividad antagónica “*in vitro*” de las cepas de actinomicetos contra *R. solani*

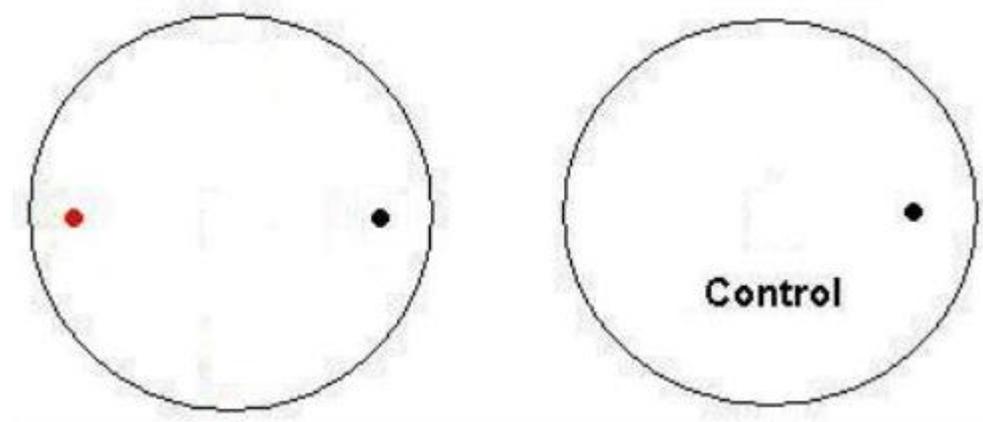
Para determinar la actividad antagónica *in vitro* se sembraron 4 cepas de actinomicetos en placas de Petri con Agar caseína almidón a pH 7, luego se incubaron (Incubadora, Modelo: Memmert) en la oscuridad entre 28-30 °C por siete días para permitir el crecimiento, esporulación y producción de metabolitos

secundarios. El hongo fitopatógono se sembró en Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubaron en la oscuridad a 28 °C, tres días previos a la realización del ensayo de bioactividad. Ambos microorganismos se enfrentaron mediante cultivo dual en placas de Petri de 90,0 mm de diámetro con medio de cultivo PDA (Dávila *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016; Sellem *et al.*, 2017). Se colocaron en un extremo de la placa un disco de 7 mm de diámetro de micelio del hongo fitopatógono (tomado del crecimiento en placa de Petri inoculada con suspensión micelial en medio de cultivo PDA) y en el extremo opuesto otro disco de 7 mm con micelio del actinomiceto y 5 cm de separación entre ellos. También se sembraron discos de 7 mm en el centro de placas de PDA sin actinomicetos como control de crecimiento de *R. solani*. Los cultivos se incubaron a 28±2 °C y oscuridad, y cada 24 horas se medió el crecimiento radial del micelio de los hongos hasta los siete días de incubación.

Se medió el porcentaje de inhibición para cada pareja de hongo-actinomiceto se determinó por la siguiente formula:

$$PICR (\%) = \frac{C. micelial (R. solani) - C. micelial (actinomiceto)}{C. micelial (R. solani)} \times 100$$

(Misk y Franco, 2011, Cuesta *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Montaje del enfrentamiento dual Actinomiceto/hongo. ●

Actinomiceto, ● Hongo Fitopatógono.

El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado con cinco réplicas por tratamiento (cepas de actinomicetos) y control (hongo fitopatógeno).

### **3.2 Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos**

Para determinar la compatibilidad *in vitro* de las cepas de actinomicetos en estudio, se sembraron las mismas por separado en placas de Petri de 90 mm de diámetro con Agar Caseína Almidón a pH 7. Estas se incubaron en la oscuridad entre 28-30 °C por siete días para permitir el crecimiento, esporulación y producción de metabolitos secundarios. Pasado este tiempo de incubación, se extendió con un hisopo estéril las esporas de la cepa a compatibilizar de forma perpendicular a las otras cepas. Luego los cultivos se incubaron en las mismas condiciones antes descritas y se hicieron observaciones diarias hasta los 15 días. El criterio que se utilizó para determinar la compatibilidad entre las cepas de actinomicetos fue la no existencia de zonas de inhibición ni sobrecrecimiento de acuerdo a lo descrito por Zaim (2018).

### **3.3. Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento a las semillas de frijol común sobre la incidencia y severidad de la enfermedad causada por *R. solani***

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento a la semilla con cepas de actinomicetos (CB14, EA2, CD-24 y B8) sobre la incidencia y severidad de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *R. solani*, se realizó un experimento en condiciones de casa de cultivo.

Para ello, se utilizó suelo Pardo mullido medianamente lavado según la clasificación de Hernández *et al.* (2015) proveniente de un suelo anteriormente sembrado con maíz (*Zea mays* L.).

#### **Preparación del inóculo de los actinomicetos**

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 a 28±2 °C. El inóculo se ajustó a una concentración total de

$9,5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic) y aumento 400X.

### **Preparación del inóculo de *Trichoderma harzianum* (cepa A-34)**

Para la multiplicación de *T. harzianum* (cepa A-34) procedente del Instituto de Investigaciones 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 a  $28 \pm 2$  °C. El inóculo se ajustó a una concentración de  $2,5 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> mediante el empleo de la cámara de Neubauer, al microscopio óptico (Motic) con aumento 400X.

### **Material vegetal utilizado en el experimento**

Se emplearon semillas de *P. vulgaris* L. cv. Quivicán (Testa blanca) 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 con 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/zeolita empleada fue de 7g de semillas:1g de zeolita (m/m). Se secaron al aire durante 48 h y se sembraron posteriormente.

## **Multiplicación del hongo fitopatógeno *R. solani***

Para la multiplicación del hongo fitopatógeno *R. solani* se utilizaron 2 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 entre 28-30 °C por 10 días.

## **Inoculación**

El hongo fitopatógeno se inoculó al suelo al 2 % lo que significa que a 441g se le añadieron 9g del inoculó en recipientes 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 150 mL de agua destilada por magenta y manteniendo el riego periódicamente según las necesidades de las plantas y de forma uniforme. Se utilizaron ocho tratamientos (cepas de actinomiceto EA2, CB14, CD-24 y B8) y la combinación de las cepas CB14+EA2 y las cepas CD24+B8, que se compararon con *T. harzianum* (cepa A-34), Celest Top FS 312 (tiametoxan+difenoconazol+fludioxonilo) a dosis de 0,192 L. ia/kg de semilla y otros dos controles (positivo y negativo) con seis réplicas bajo un diseño completamente aleatorizado. El control positivo consistió en no realizar tratamiento de semilla e inocular el hongo fitopatógeno y el control negativo no se hizo tratamiento de la semilla ni se inoculó el suelo con el hongo fitopatógeno.

### **3.3.1 Incidencia de la marchitez de las posturas**

Se evaluó el porcentaje de incidencia de la marchitez de las posturas preemergente a los 7 días posteriores a la siembra de las semillas, y el porcentaje de incidencia postemergente a los 21 días posteriores a la germinación de las semillas, mediante las fórmulas descritas por Nawar (2007).

$$\% \text{ Incidencia pre-emergente} = \frac{\text{Número de semillas no germinadas}}{\text{Número total de semillas sembradas}} \times 100$$

$$\% \text{ de incidencia post-emergente} = \frac{\text{Número de plantas muertas}}{\text{Número de plantas sobrevivientes}} \times 100$$

A las semillas no germinadas o plantas con lesiones en el hipocotilo, raíces y/o tallo se colocaron en cámara húmeda y preparaciones microscópicas para confirmar la identidad del hongo fitopatógeno que se inoculó. Para esto último se empleó los criterios descritos por Watanabe (2002).

### 3.3.2 Severidad de la marchitez de las posturas

Se evaluó el porcentaje de severidad de la enfermedad en raíces y tallos a los 21 días posteriores a la inoculación de *R. solani*, mediante la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943) y el empleo de las escalas propuestas por Keijer *et al.* (1997) y Bradley *et al.* (2001), respectivamente (Anexo 2).

$$S (\%) = \frac{\Sigma(n \times v)}{G \times N} \times 100$$

S = Severidad

n = Número de plantas con grado de la escala

v = Grado de ataque según la escala

G = Número total de grados

N = Número total de plantas observadas

### Procesamiento estadístico de los datos

El procesamiento estadístico de los datos consistió en análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), previa comprobación de la normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron comparaciones de medias mediante las pruebas de Tukey y H de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Se empleó el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) v. 21 sobre Windows.

## 4. Resultados y discusión

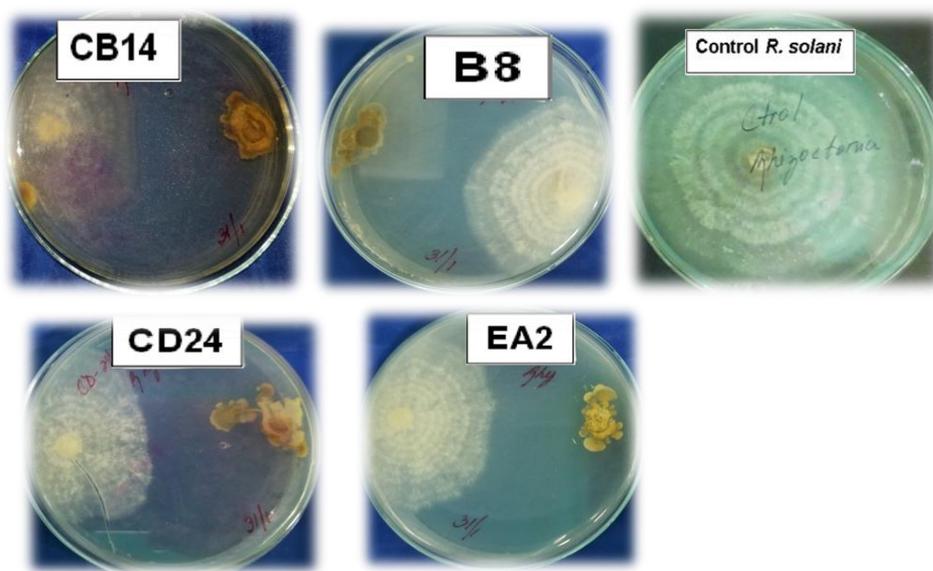
### 4.1 Determinación de actividad antagónica *in vitro* de las cepas de actinomicetos contra *R. solani*

El ensayo de antagonismo *in vitro* mostró que las cuatro cepas de actinomicetos, mostraron actividad antagónica sobre *R. solani* (Tabla 3.). Las cepas que mostraron los mayores porcentajes de inhibición fueron la EA 2 y B8 con valores de 82,27 y 79,22 %, respectivamente (Tabla 3 y Figura 2).

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición de cepas de actinomicetos sobre el crecimiento micelial de *R. solani*

| Cepas   | Porcentaje de inhibición (%) |
|---------|------------------------------|
| B8      | 79,22 a                      |
| CB14    | 72,96 b                      |
| CD24    | 73,69 b                      |
| EA2     | 82,27 a                      |
| E.E (±) | 1,23                         |
| C.V (%) | 5,57                         |

(a, b) Medias con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente por la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=5$



**Figura 2.** Ensayo de antagonismo *in vitro* de cepas de actinomicetos contra *R. solani*

Estos resultados corroboran los obtenidos por Abyad *et al.* (1996) al evaluar cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera contra patógenos del tomate. Estos autores encontraron que las cepas de *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* y *S. citrofluorescens*, fueron las más activas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Verticillium albo-atrum* y *Alternaria solani*. De igual forma, Castillo *et al.* (2001) informaron cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de plántulas de papa con porcentajes de inhibición de hasta 87 % contra *R. solani*.

Otros autores, tales como Molano *et al.* (2000) determinaron la inhibición *in vitro* del crecimiento de *Fusarium oxysporum* a partir de la actinomicina, un antibiótico producido por *Nocardia sp.*, cepa aislada de una muestra de suelo rizosférico de liquen (Mosquera-Colombia). La producción de dicho metabolito secundario resultó ser tóxico para el hongo fitopatógeno. También Gomes *et al.* (2000), en su ensayo de inhibición de crecimiento micelial de agentes fitopatógenos por cepas de actinomicetos, encontraron la inhibición total del crecimiento de *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum* Link ex. Grey. y *Fusarium oxysporum*.

Castillo-Fabelo *et al.* (2001) evaluaron *in vitro* 90 cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *R. solani* y seleccionaron 24 cepas que mostraron

porcentajes de inhibición que oscilaron entre 72,4 a 68,8 %. Estos mismos autores llegaron a la conclusión de que los actinomicetos de rizósfera de papa podrían ser una fuente para el control biológico de *R. solani*.

Según varios autores, la resistencia a sustancias antagónicas, tales como las quitinasas, puede ser una característica importante para los microorganismos que colonizan la rizósfera (Whipps, 2001, Nawani *et al.*, 2002, El-Tarabily *et al.*, 2003).

Ezziyani *et al.* (2004) plantearon que los fenómenos de antagonismo en hongos pueden ser explicados por diversos mecanismos incluyendo antibiosis y parasitismo; la inhibición en el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *R. solani* puede ser atribuido a la presencia de algunas sustancias inhibitorias excretadas por los actinomicetos. El grado de inhibición puede variar por factores como: la temperatura, el pH y el medio de cultivo.

Los actinomicetos del suelo han revelado su amplia actividad antifúngica (Tinatin y Nuzrat, 2006). Se ha demostrado que protegen a varias plantas contra diversos hongos fitopatógenos transmitidos por el suelo. Estos, producen un conjunto de compuestos antifúngicos, entre los que se encuentra un miembro de la clase de antimicina, que actúan inhibiendo el flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial de los hongos fitopatógenos y se han identificado en el género *Streptomyces* (Schoenian *et al.*, 2014).

Franco-Correa (2008) informó que la inhibición del crecimiento micelial se da por productos antifúngicos y no por la producción de la enzima quitinasa, ya que cepas con actividad quitinolítica no produjeron inhibición del crecimiento micelial. Es importante tener en cuenta que no todos los antibióticos que posiblemente producen los actinomicetos que se aislaron pueden inhibir o afectar el desarrollo de los hongos evaluados.

Figen *et al.* (2015) evaluaron *in vitro* 73 cepas de bacterias antagonistas aisladas de la rizósfera de plantas de té en el control de la pudrición de las raíces causadas por *R. solani* en frijol común y papa en Turquía, donde obtuvieron 15 cepas que

fueron efectivas contra este hongo fitopatógeno al formar zonas de inhibición entre 0,20-2,30 cm e inhibir el desarrollo del micelio.

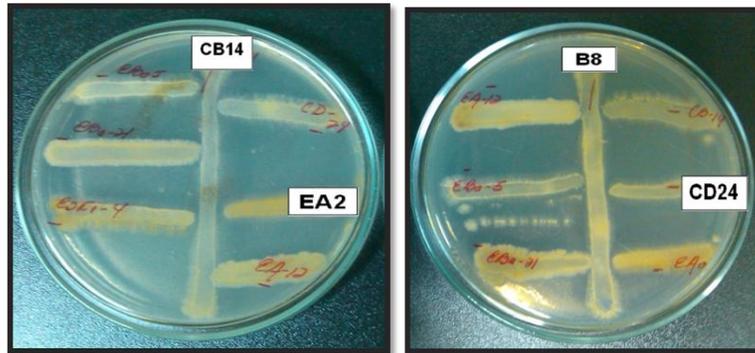
Kamara y Gangwar (2015), aislaron 100 cepas de actinomicetos a partir de 30 muestras de suelo rizosférico de *Catharanthus roseus* y *Withania somnifera* en diferentes lugares en Ludhiana, India con el objetivo de probar su actividad antifúngica contra siete hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfii*. Estos autores, informaron un total de 39 aislamientos con actividad antifúngica, de ellos 9 cepas contra *Alternaria alternata*, 19 contra *Fusarium oxysporum*, 20 contra *Helminthosporium oryzae*, 14 contra *Macrophomina phaseolina*, 10 contra *Penicillium* sp. y 16 contra *Rhizoctonia solani*. También, concluyeron que estos actinomicetos del suelo rizosférico son candidatos prometedores a utilizar como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos.

Otros autores como Singh *et al.* (2015) aislaron 34 cepas de actinomicetos del vermicompost y evaluaron su actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* frente al hongo fitopatógeno *R. solani*. Del total de cepas, sólo 12 revelaron antagonismo a través de su zona de inhibición (> 20mm), así como lograron reducir la enfermedad damping off entre un 47 y 63 % en las plantas de tomate tratadas. Además, encontraron que en estas plantas se indujeron enzimas relacionadas con la defensa tales como peroxidasa, polifenol oxidasas, fenilalanina amonio liasas y acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides.

Singh *et al.* (2016) aislaron un total de 80 cepas de actinomicetos a partir de suelos de diferentes hábitats de la región de Chambal, Madhya Pradesh, para evaluar su capacidad antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos de la soya *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum truncatum* y *Rhizoctonia solani*. De estos, solo un actinomiceto ACITM-1 mostró actividad antifúngica contra *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *C. truncatum*.

#### **4.2 Evaluación de la compatibilidad entre cepas de actinomicetos**

En la Figura 3. Se observa la compatibilidad que exhibieron las cepas de actinomicetos CB14 y EA2, así como las cepas B8 y CD 24. Entre ellas no se observaron halos de inhibición ni sobrecrecimiento de una sobre la otra, quedando así demostrado su compatibilidad.



**Figura 3.** Ensayo de compatibilidad *in vitro* entre cepas de actinomicetos

Estos resultados son de suma importancia antes de evaluar *in vivo* el efecto combinado entre cepas de un mismo microorganismo. Varios estudios han sugerido que las combinaciones de agentes de biocontrol introducidos deben ser compatibles entre sí para una mejor y más consistente supresión de la enfermedad (Yobo 2005; Latha *et al.*, 2011; Mudawi y Idris, 2014).

Investigaciones previas han establecido que las principales interacciones consideradas hasta ahora incluyen un solo agente patógeno y un único agente de control biológico en la rizósfera del garbanzo (Khan *et al.*, 2014; Amini *et al.*, 2016; Mehmood y Khan, 2016).

Por otra parte, Whipps (2001) informó que una forma de mejorar el control biológico en la rizósfera puede ser agregar una mezcla o combinaciones de agentes de control biológico, particularmente si exhiben diferencias o modos de acción o habilidades complementarios para colonizar micrositios de raíz. Tales interacciones múltiples son la situación normal en la rizósfera.

Debe señalarse que el uso de mezclas o combinaciones de diferentes cepas puede practicarse siempre que ningún miembro de la mezcla sea inhibidor para otro o interfiera excesivamente con otros microorganismos existentes en la rizósfera (Whipps, 2001).

Maketon *et al.* (2008) estudiaron la eficacia de la formulación comercial Trisan TM de *T. harzianum* (AP-001) y Larminar TM de *B. subtilis* (AP-01), aplicadas solas o en combinación para suprimir tres enfermedades del tabaco, incluida la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), desprendimiento de la hoja (*Pythium aphanidermatum*) y mancha foliar (*Cercospora nicotiana*). *T. harzianum* AP-001 y *B. subtilis* AP-01 solos poseían eficacias más bajas en el control de *R. solanacearum* en comparación con su combinación donde ocurría algún efecto sinérgico. Su mezcla también fue efectiva en la supresión del desarrollo de la enfermedad de la mancha foliar de la hoja. De acuerdo con estos resultados, Nel *et al.* (2006) informaron que la formulación comercial Patostop (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Gliocladium* spp.) redujo la severidad de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

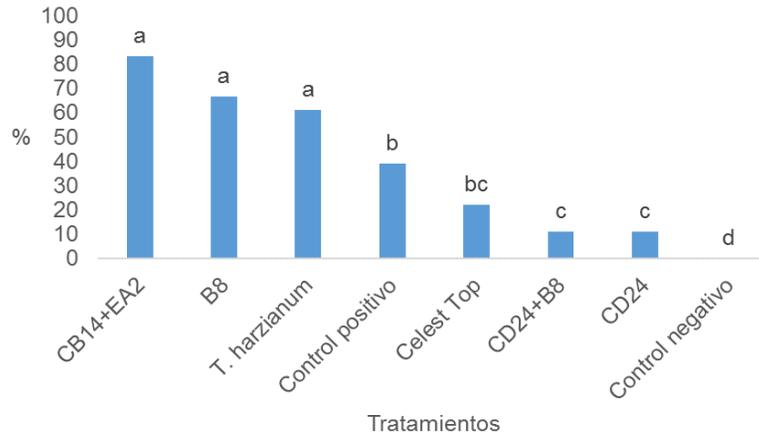
Amule *et al.* (2018) evaluaron el efecto de la inoculación simple y combinada entre actinobacterias, *Rhizobium* y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en soya bajo condiciones de casas de cultivo y campo. Estos autores informaron que el consorcio microbiano mejoró el rendimiento de la soya y salud del suelo al comparar con el control y la aplicación simple de los microorganismos.

Resultados similares obtuvieron Zaim *et al.* (2018) al evaluar el efecto combinado de la bacteria antagonista *B. subtilis* con *T. harzianum* en el tratamiento de la semilla del garbanzo contra *F. oxysporum* f.sp *ciceris* en condiciones semicontroladas. Los mismos informaron una reducción de la severidad de la enfermedad del 93,67 % al aplicar ambos antagonistas, además de sugerir que su eficacia está asociada a sus propiedades antagónicas y competitividad en la zona de la rizósfera.

### 4.3 Evaluación del efecto de cepas de actinomicetos en el tratamiento de las semillas de frijol común sobre la incidencia y severidad de la enfermedad provocada por *R. solani*

#### 4.3.1 Incidencia de la marchitez de las posturas

El análisis del efecto de los actinomicetos sobre el porcentaje de incidencia de damping off pre-emergente en el cultivo mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentaje de incidencia de damping-off pre-emergente en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 7 días posteriores a la inoculación del suelo con *R. solani*.

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$

Los menores porcentajes de incidencia fueron obtenidos en los tratamientos donde se protegieron las semillas con las cepas de actinomicetos CD 24, la combinación CD24+B8 y el tratamiento químico con Celest Top, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos e inferiores al control positivo. Entre el tratamiento con Celest Top y el control positivo no se hallaron diferencias estadísticas. Los tratamientos donde las semillas fueron recubiertas con la combinación de cepas de actinomicetos CB14+EA2, B8 y *T. harzianum* fueron los que tuvieron los mayores porcentajes de incidencia de la enfermedad, sin diferencias estadísticas entre ellos y superiores al control positivo.

Los resultados obtenidos con las cepas de actinomicetos CD24 y la combinación CD24+B8 en la reducción de la incidencia pre-emergente de la enfermedad, indican el control efectivo que ejercieron estas cepas en la inhibición del desarrollo

del hongo fitopatógeno *R. solani*, al permitir la germinación de las semillas a diferencia de los otros tratamientos biológicos (cepas de actinomicetos CB14+EA2, B8 y *T. harzianum*), que no lograron frenar el proceso infectivo de *R. solani*, provocar pudriciones de los cotiledones de las semillas e impedir su germinación (Figura 5).

**Figura 5.** Síntomas de damping off pre-emergente provocados por *R. solani* en los tratamientos con las cepas CB14+EA2 (A), B8 (B) y *T. harzianum* (C)

Las interacciones microorganismo-microorganismo y planta-microorganismo que se establecen en la zona de la rizósfera depende de las funciones de los microorganismos asociados. En muchos microorganismos ha sido demostrada su

eficacia para controlar enfermedades causadas por agentes patógenos fúngicos. Entre los mecanismos que se describen se encuentran la competencia por nutrientes y nichos, producción de metabolitos y supresión de agentes patógenos de plantas (Egamberdieva *et al.*, 2011).

Getha *et al.* (2005) demostraron que los actinomicetos son agentes potenciales de control biológico contra hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp., por ser fuente de metabolitos secundarios, antibióticos y enzimas líticas. Dávila *et al.* (2013) destacaron que, de 70 actinomicetos aislados, 25 fueron antagonistas para *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp.

En Cuba, García (2014) seleccionó siete cepas de actinomicetos eficientes, las que mostraron actividad antagonista *in vitro* frente a *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *M. phaseolina* y *R. solani*.

Arias (2015) en estudios en frijol común encontró actividad antagónica *in vitro* e *in vivo*, en el tratamiento a la semilla con actinomicetos contra *M. phaseolina*.

En la literatura consultada son pocas las referencias relacionadas con el efecto de la combinación de cepas de actinomicetos en el control de la marchitez de las posturas causada por *R. solani* en frijol común, estos fundamentalmente se informan para otros hospedantes del hongo fitopatógeno.

Ashour y Afify (1999, 2000) informaron que la mezcla de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. fueron más efectivas en el control biológico de la marchitez de las posturas en algodón bajo condiciones de campo que cuando se aplicaron de forma individual.

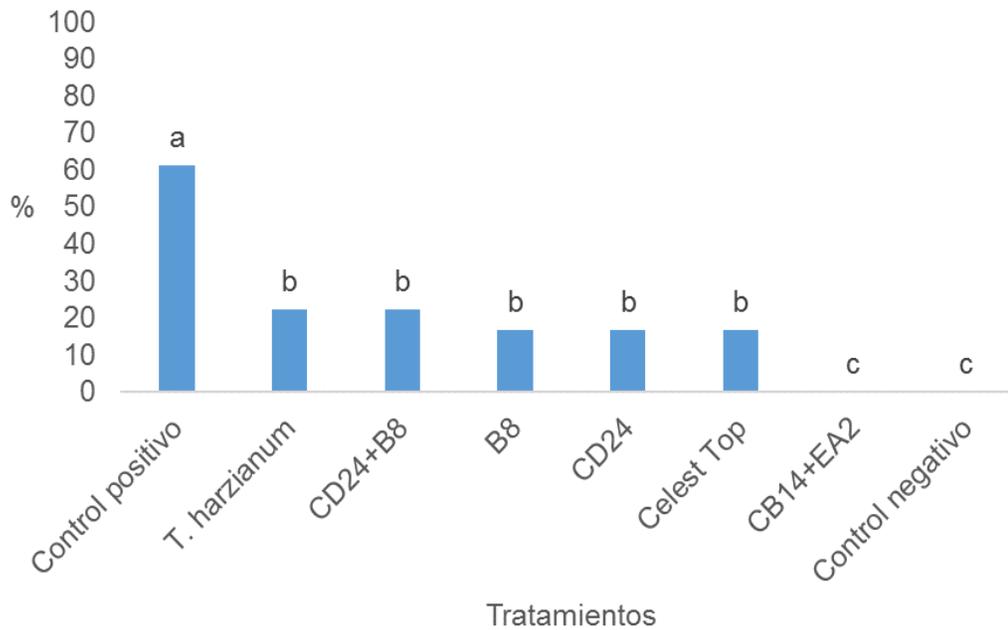
Gupta *et al.* (2002) encontraron que la bacterización de las semillas de maní con *Pseudomonas fluorescens* (cepa GRC2) redujo la enfermedad pudrición carbonosa provocada por *M. phaseolina* en un suelo infectado, al compararla con el control. Landa *et al.* (2004) informaron que el tratamiento de las semillas y el suelo con los agentes de biocontrol *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* y

*Pseudomonas fluorescens* redujeron significativamente la intensidad de la enfermedad marchitez por *Fusarium* en garbanzo.

Omara *et al.* (2017) encontraron que la inoculación combinada de las semillas de soya con *Bradyrhizobium japonicum* (St 110) + *Methylobacterium aminovorans* + *B. megatherium* var. *phosphaticum* (B6) + *T. viride* en el momento de la siembra redujeron el damping-off de las plantas por *R. solani*. Este conocimiento es necesario para el establecimiento de un manejo integrado de los cultivos.

Con respecto al porcentaje de incidencia post-emergente, de forma similar al experimento anterior se hallaron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. La combinación de las cepas de actinomicetos CB14+EA2 fue la que logró la mayor protección biológica al no encontrarse plantas con síntomas de marchitez de las posturas. Los tratamientos a las semillas con el resto de los

agentes biológicos no tuvieron diferencias estadísticas entre ellos, pero sí con respecto al control positivo (Figura 6).



**Figura 6.** Porcentaje de incidencia de damping-off post emergente en semillas tratadas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 21 días posteriores a la inoculación del suelo con *R. solani*

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$

Varios autores han informado la excelente actividad de biocontrol de varias cepas de *Streptomyces* contra algunos hongos fitopatógenos del suelo como *Pythium* spp., *Fusarium* spp. (Reddy y Rao, 1971), *Rhizoctonia solani* (Rothrock y Gottlieb, 1981) y *Phytophthora* spp. (Papavizas y Sutherland, 1991). Su actividad de control biológico a menudo se realiza antes de que los hongos patógenos infecten por completo a sus respectivos hospedantes. Estos microorganismos han sido el centro de atención sobre enfoques hacia el desarrollo de estrategias de control biológico contra agentes patógenos transmitidos por el suelo (Samac *et al.*, 2003).

Conn *et al.* (2008) informaron que el tratamiento de las semillas con *Streptomyces* spp. endófito. y *Micromonospora* spp. antes de la siembra, protegió a *Arabidopsis thaliana* de la infección por *Erwinia carotovora* y *F. oxysporum*. Los estreptomicetos son capaces de inducir los mecanismos de defensa en la planta.

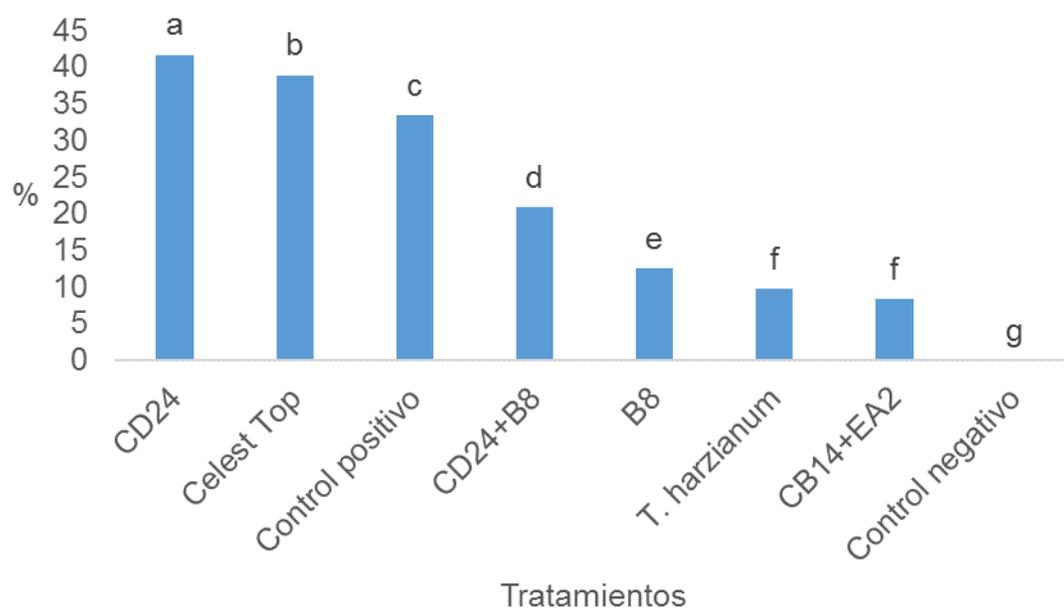
Esta observación implica que los antagonistas microbianos penetraron las semillas durante su germinación y colonizaron las plántulas.

Abou-Elaid *et al.* (2014) evaluaron tres métodos de aplicación de los agentes biológicos *T. harzianum*, *T. viride* and *B. subtilis* para el control de los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *M. phaseolina* y *R. solani*, agentes causales de la pudrición de las raíces en uva bajo condiciones de campo. Estos autores obtuvieron que en las combinaciones de los métodos empleados fueron donde se lograron reducir los porcentajes de incidencia y severidad de la enfermedad, considerando el mismo como una técnica promisorio a utilizar en la uva en condiciones de campo.

Las actinobacterias endofíticas pueden producir enzimas que degradan las paredes de las células fúngicas, especialmente por la producción de quitinasas. Más del 90% de los microorganismos quitinolíticos son actinomicetos (Gupta *et al.*, 1995). La producción de quitinasas por actinomicetos y por estreptomicetos en particular hace que estos microorganismos sean agentes prometedores de control biológico microbiano (Krishna- Prasad *et al.*, 2018).

#### **4.3.2 Severidad de la marchitez de las posturas**

En la Figura 7 se observa los resultados obtenidos al recubrir las semillas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top sobre la severidad de la enfermedad en raíz y tallo de frijol común a los 21 días posteriores a la inoculación con *R. solani*. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 7.** Porcentaje de severidad de la marchitez de las posturas en raíz y tallo provocado por *R. solani* al tratar las semillas con cepas de actinomicetos, *T. harzianum* y Celest Top a los 21 días posteriores a la inoculación

Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$

Los mayores porcentajes de severidad de la enfermedad se alcanzaron en los tratamientos donde se recubrieron las semillas con la cepa de actinomiceto CD 24, Celest Top y control positivo, los cuales mostraron diferencias estadísticas entre

ellos. Este resultado demuestra la baja efectividad biológica que tuvieron estos tratamientos en la protección de las plantas (Figura 8).



**Figura 8.** Lesiones en el tallo y raíces del cultivar de frijol común Quivicán a los 21 días posteriores a la inoculación con *R. solani*

Valores intermedios se alcanzaron en los tratamientos con las combinaciones de las cepas de actinomicetos CD24+B8 y B8, las cuales también difirieron estadísticamente. La combinación de las cepas de actinomicetos CB14+EA2 y *T. harzianum* fueron las que mostraron los menores valores de severidad de la enfermedad, sin diferencias estadísticas entre ellas, pero si con respecto al control positivo.

Este último resultado indica la efectividad biológica que tuvo el tratamiento a las semillas de frijol común con la combinación de las cepas CB14+EA2 en la reducción de la enfermedad, de manera similar al tratamiento con el hongo antagonista *T. harzianum*, por lo que se presenta como una nueva alternativa biológica para el cultivo de esta leguminosa.

Estos resultados corroboran los obtenidos por Procópio *et al.* (2012) quienes plantean que los actinomicetos, y particularmente las especies de *Streptomyces*, producen un amplio espectro de antibióticos, los cuales les permiten desarrollar interacciones simbióticas con las plantas, protegiéndolas de diversos agentes patógenos; al mismo tiempo, los exudados de las plantas promueven el crecimiento de *Streptomyces*.

La mayoría de las actinobacterias del suelo son productoras de varias clases de enzimas extracelulares que incluyen nucleasas, lipasas, glucanasas, xilanasas, amilasas, proteinasas, peptidasas, peroxidasas, quitinasas, celulasas, ligninasas, pectinasas, hemicelulasas y queratinasas. Todas estas enzimas juntas contribuyen a su potencial de control biológico contra una amplia gama de fitopatógenos, debido a que la mayoría de los patógenos fúngicos y bacterianos tienen constituida su pared celular por polímeros como quitina, glucano, celulosa, proteínas y lípidos (Gupta *et al.*, 1995; Fodil *et al.*, 2011).

Bautista *et al.* (2007) y Scherwinski *et al.* (2008) informaron que las cepas pertenecientes al género *Bacillus* redujeron la severidad de la enfermedad entre un 12-83 % y las del género *Pseudomonas* entre un 52-57 %. Estudios previos realizados por estos autores, comunicaron a los géneros de bacterias antagonistas *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* como exitosos en el control biológico de *R. solani*.

Figen *et al.* (2015) probaron *in vivo* a 73 aislados bacterianos antagonistas frente a *R. solani* en papa y frijol común bajo condiciones de casa de cultivo y obtuvieron que tres cepas tuvieron efecto en la reducción de los niveles de infección por *R. solani*, con valores entre 12-83 % comparados con el control. Este estudio reveló que los agentes de biocontrol pudieran tener un papel importante en el manejo de las pudriciones de las raíces en papa y frijol común.

Omara *et al.* (2017) evaluaron cinco rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en el biocontrol de *R. solani* en soya e informaron una reducción de la enfermedad damping off e incremento de la salud de las plantas en todos los tratamientos.

Los resultados obtenidos en esta investigación relacionados con el uso potencial de actinomicetos para evitar la incidencia y severidad de *R. solani* en el cultivo del frijol común aporta una alternativa más para la lucha contra este hongo en un programa de manejo integrado en condiciones de campo.

## **5. Conclusiones**

1. Las cepas de actinomicetos empleadas ejercieron un efecto antagónico sobre el hongo fitopatógeno *R. solani* destacándose las cepas EA2 y B8 bajo condiciones *in vitro*.

2. Las combinaciones de las cepas de actinomicetos empleadas no presentaron incompatibilidad alguna entre ellas.
3. En la incidencia del damping-off pre emergente, las cepas de actinomicetos CD 24 y CD24+B8 presentaron los mejores efectos de control; mientras en la post emergencia la combinación de actinomicetos CB14+EA2.
4. Los menores porcentajes de severidad de la enfermedad se obtuvieron al tratar las semillas con la combinación de las cepas de actinomicetos CB14+EA2 sin diferencias con *T. harzianum* a los 21 días posteriores a la inoculación de *R. solani*.

## **6. Recomendaciones**

1. **Identificar molecularmente las cepas de actinomicetos empleadas en el estudio.**

2. Evaluar el empleo del tratamiento a las semillas de frijol común con las combinaciones de cepas de actinomicetos CD24+B8 y CB14+EA2 en otras condiciones, con diferentes cultivares y tipos de suelo.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Abdel-Fatah, G. M. and Mohamedin, A. H. (2000). Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of brawn scales. *Biol. Fertility Soils* 32: 401-409.
2. Abou-Elaid, H., El-Naggar, M. A., Abdel-Kareem, F., El-Deeb, H. M. and El-Shahawy, I. E. (2014). Field Application with Biocontrol Agents for Controlling Root-rot Disease of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research* 3(4): 775-781.
3. Abyad, M., Sayed, M., Shanshoury, A. and Sabbagh, S. (1996). Antimicrobial activities of *Streptomyces pulcher*, *S. canescens* and *S. citrofluorescens* against fungal and bacterial pathogens of tomato *in vitro*. *Folia Microbiol.* 41:321-328.
4. Aceves, M., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R. y Ochoa-Moreno, M. E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma spp.*, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*, *Chapingo* 11: 273-278.
5. Amini, J., Agapoor, Z., Ashengroph, M. (2016). Evaluation of *Streptomyces* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. *J. Plant Prot. Res.* 56 (3):257–264.
6. Amule, F. C., Sirothiya, P., Rawat, A. K., and Mishra, U. S. (2018). Effect of actinobacterial, *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria consortium inoculation on rhizosphere soil properties in soybean in Jabalpur district of Madhya Pradesh. *International Journal of Chemical Studies* 6 (1): 583-586.

7. Argaw, A. and Akuma, A. (2015). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sp. inoculation improves the agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environ. Syst. Res.* 14:11. DOI 10.1186/s40068-015-0036-z.
8. Arias, J. H., Jaramillo, M. y Rengifo, T. (2007) Manual Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de frijol voluble. Ed. Colombia, p. 25-48.
9. Arias, J. R. (2015). Selección de cepas de actinomicetos biocontroladoras de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, con efecto estimulante en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al Título Académico de Master en Agricultura Sostenible. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 68pp.
10. Artursson, V., Finlay, R. D. and Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology Reports*, 8:1–10.
11. Ashour, A. Z. A. and Afify, Aida. (1999). Use of *Bacillus* strains mixture to improve biological control of cotton seedling disease. *Pro. Second, 1nt. Conf. on Fungi: Hopes- Challenges. Cairo*, II: 109-120.
12. Ashour, A. Z. A. and Afify, A. (2000) Biological of flax seedling blight with mixtures of *Pseudomonase* spp. *Pakistan, J. Biolo. Sci* 3:368-371.
13. Bautista, G., Mendoza, H., Uribe, D. (2007). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biol. Colomb* 12 (1):19–32.
14. Bayer (2008). *Rhizoctonia solani*. Disponible: <http://www.bayercropscience.com.pe> (Consultado: 7 marzo de 2018).

15. Ben-Omar, N., Merroun, M. L., Arias Peñalver, J. M. and Gonzalez Muñoz, M. T. (1997). Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere* 35 (10): 2217-2283.
16. Bergey, D. H. and Holt, J. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott. Williams & Wilkins. Philadelphia edn.: Williams & Wilkins Company, 1957, p. 1094.
17. Bocourt, Y., Cantillo, T., Ramos, E., González, M. y López, M. (2009). Prospección de hongos del suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistema cubanos. *Rev. Fitosanidad* 13 (1): 3-5.
18. Burke, D. J., Kretzer, A. M., Rygiewicz, P. T. and Topa, M. A. (2006). Soil bacterial diversity in a loblolly pine plantation: Influence of ectomycorrhizas and fertilization. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 409-419.
19. Bradley, C. A., Hartman, G. L., Nelson, R. L., Müller, D. S., Pedersen, W. L. (2001). Response of ancestral soybean lines and comercial cultivars to *Rhizoctonia solani* root and hypocotyls rot. *Plant Disease*. 85: 1091-1095.
20. Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Albert, H. and Robison, R. (2001). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* RRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* 148:2675-2685.
21. Castillo-Fabelo, E., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Cepeda-Siller, M. y Zamora-Villa, V. M. (2001). Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19 (2): 204.

22. Conn, V. M., Walker, A. R., Franco, C. M. M. (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:208–218.
23. Cuesta, G., García -de la Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., Torriani-Gorini, A., Yagil, E. and Silver, S. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management* 95: S281-S282.
24. Cupull R., Andreu, C. M, 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.
25. Dávila-Medina, M. D., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Ochoa Fuente, Y. M. y Flores Olivas, A. (2013). Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias agrícolas* 4(8): 1187-1196.
26. Díaz, M. (2011). Incidencia de *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Departamento de agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, 95p.
27. Echávez, R. y Gómez, J. E. (1997) Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) controlan *R. solani* y *M. phaseolina* en Puerto Rico. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Libro de Resúmenes. Montevideo, Uruguay, p. 290.
28. Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T., Chebotar, V., Tikhonovich, I., Kamilova, F., Validov, S. and Lugtenberg, B. (2011). Bacteria able to control foot and root rot and to

promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and Fertility of Soils* 47:197–205.

29. El-Tarabily, K. A. (2003). An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupine caused by *Plectosporium tabacinum*. *Aust. J. Bot.* 51:257–266.
30. Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Ahmed, A. y Candela, M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*, *Anales de Biología* 26: 61-68.
31. Figen, M., Uysal, B., Demirci, E., Ercisli, S., Cakmakc, R. (2015). Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kühn on potato and bean using antagonist. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 14 (5): 29-40.
32. Fodil, D., Badis, A., Jaouadib, B., Zarai, N., Ferradji, F. Z. and Boutoumi, H. (2011). Purification and characterization of two extracelular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids. *Int. Biodeterior Biodegrad.* 65:470–478.
33. Folgueras, M. (2010). Las pudriciones radicales de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Cuba. Etiología. Epifitiología y manejo. Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. Santa Clara. Cuba, 98p.
34. Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias (PGPR) con Hongos Formadores de Micorrizas. Universidad de Granada, p. 38-90.
35. Franco-Correa, M. (2009). Use of actinomycetes in processes biofertilization. *Rev. Peru. Biol.* 16 (2): 239-242.

36. Franco, F., Pedroso, R., Noa, A., Castañeda, I., Ríos, C., Aredondo, I. y Chacón, A. (2004). Lista oficial de plantas. Material complementario para la Botánica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Centros de Estudios del Jardín Botánico. Cuba.
37. Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128 (2):197-210.
38. García, N. B. (2014). Selección de cepas de actinomicetos para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Diploma, Departamento de Biología. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, 51p.
39. Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A. and Goodfellow, M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32:24-32.
40. Gomes, R. C., Semeão, L. T. A. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., Linhares, L. F. and Coelho, R. R. R. (2000). Chitinolytic actinomycetes from a Brazilian tropical soil active against phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:109-110.
41. Gómez de la Luz, J. A. (2003). Actualidad. Insecticidas de compuestos de origen vegetal. Disponible en: <http://www.finagro.com/@noticias/index.asp>.
42. González, D. (2002). Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20 (2):200-205
43. González, Marleny. (2008). Aspectos de la sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Rev. Fitosanidad* 12(3): 147-159.

44. González, Mirta. (1988). Enfermedades fungosas de frijol en Cuba. Ed. Científico-Técnica. La Habana, p. 152.
45. Gupta, C., Dubey, R and Maheshwari, D. (2002). Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas* Biol. *Fertil. Soils.* 35:399-405.
46. Gupta, R., Saxena, R.K., Chaturvedi, P., Viridi, V.S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J. Appl. Bacteriol.* 78:378–383.
47. Hamdi, Y. A. (1985). La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO. 49. ONUFAO, 188 p.
48. Hernández, A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, N. (2015). Clasificación de los Suelos de Cuba. Edición. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cuba, 93 p.
49. Hernández, D. (2005). Uso de la bacterización en el control de los contaminantes fungosos en la micropropagación de *Musa* spp., Trabajo de diploma. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
50. Herrera, L. (2004). Los hongos fitopatógenos de los suelos tropicales y subtropicales. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, 287p.
51. Hong, T., Cheng, C., Huang, J. and Meng, M. (2002). Isolation and biochemical Characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- $\beta$ -glucan. *Microbiology* 148: 1151-1159.

52. Index-Fungorum (2008). Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/Index.htm>. (Consultado: 12 marzo 2018).
53. Kamara, V. and Gangwar, M. (2015). Antifungal Activity of Actinomycetes from Rhizospheric Soil of Medicinal plants against phytopathogenic fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4 (3): 182-187.
54. Keijer, J., Korman, M. G., Dulleman, A. M., Houterman, P. M., de Bree, J. and van Silfhout, C. H. (1997). *In vitro* analysis of host plant specificity in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology* 46:659-669.
55. Khan, M. R., Ashraf, S., Rasool, F., Salati, K. M., Mohiddin, F. A., Haque, Z. (2014). Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Rhizoctonia solani*. *Turk J. Agric For.* 38:447–454.
56. Kimm, D. S., Cook, R. J. and Weiller, D. M. (1997). *Bacillus* spp. (Lt-324-92), biological control of three root disease of wheat growth with reduced tillage. *Phytopatology* 87(5): 551-558.
57. Kishore, K., Pande, S. and Podile, A. R. (2005). Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *American Phytopathological Society* 95: 1157-1165.
58. Koneman, E. W. (2001). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. *Médica Panamericana*, Buenos Aires, Argentina, p. 10-16 y 75-82.
59. Krishna–Prasad, S., Giovanardi, D. and Stefani. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Int. J. Mo. Sci.* 19:952.

60. Lahdenpera, M. L., Simon, E. and Uoti, J. (1991). Mycostop a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria. *Elsevier*, p. 258-263.
61. Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, El., Paramathma, M., Samiyappan, R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Appl Soil Ecol.* 49:215–223.
62. Leiva, S., Yáñez, M. y Zaror, L. (2004). Actividad Antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile* 132: 151-159.
63. Leveau, J. Y. y Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial, Acribia.
64. Llanes, E. R. (2005). Caracterización morfoagronómica y fisiológica del Banco de Germoplasma de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del CIAP. Trabajo de diploma. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
65. Maketon, M., Apisitsantikul, J., Siriraweeikul, C. (2008). Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Braz J. Microbiol.* 39:296–300.
66. Mardec, F. (2007). *Rhizoctonia* Genus. *Phytopathology* 4(1):157 - 162.
67. Márquez, M., Martínez, M. y Franco, M. (2003). Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista Agronomía Colombiana* XIX (1-2): 81-88.

68. Martín, A. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. Ciudad de México, p. 134-262.
69. Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Vegetal* 28 (1):1-11.
70. Mayea, S. y Padrón, J. (1983). Bacterias y hongos fitopatógenos. Ed. Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. Cuba, 233p.
71. Mehmood, Y., Khan, M. A. (2016). Effectiveness of resistant germplasm and biological control agents as a sustainable management for *Fusarium* wilt disease on chickpea. *Int J Agric Biol.* 18:726–734.
72. MINAG. (2016). Listado oficial de variedades comerciales. Subdirección de certificación de semilla. CENSA. Cuba, 41 p.
73. Misk, A. and Franco, C. (2011). Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacterias. *Biocontrol* 56(5): 811-822.
74. Molano, A., Algecira, N., Bernal, J. y Franco-Correa, M. (2000). Evaluación y Selección de un Medio de Cultivo a partir de Actinomycetes. Memorias del II Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
75. Mora, F. (1996). Combate biológico de *R. solani* mediante el empleo de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* en el campo. *Agronomía Mesoamericana* 7(2): 21-23.
76. Mudawi HI, Idris MO. 2014. The efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates in the control of chickpea wilt pathogens. *Agric. For. Fish.* 3(5):346–351.

77. Muriño, B. L., Villa, P., Gutiérrez, I. y Cordovez, M. (2001). Eficiencia de un nuevo fungicida biológico para el control de enfermedades en cultivos de importancia económica. Cuarto Seminario Científico Internacional de Sanidad vegetal. Segundo Congreso de la Sección Regional Neotropical de la Organización Internacional de Control Biológico. La Habana, p.150.
78. Nawani, N. N., Kapadnis, B. P., Das, A. D., Rao, A. S and Mahajan, S. K. (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *Journal of Applied Microbiology* 93: 965–975.
79. Nawar, L. S. (2007). Pathological and rhizospherical studies on root-rot disease of squash in Saudi Arabia and its control. *Afri. J. Biotechno* 6 (3): 219-226.
80. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761):622-627.
81. Nerey, Y. (2009). Characterization, pathogenicity and control of *Rhizoctonia* spp. associated with bean in various Cuban soil types. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of doctor (PhD) in Applied Biological Sciences, Ghent, Belgium, 143p.
82. Omara, A., Hauka, F., Nour El-Din, A. and Kassem, M. (2017). The role of some PGPR strains to biocontrol *Rhizoctonia solani* in soybean and enhancement the growth dynamics and seed yield. *Env. Biodiv. Soil Security* 1: 47 – 59.
83. Papavizas, G. C., Sutherland, E. D. (1991). Evaluation of oospore hyperparasites for the control of *Phytophthora* crown rot of pepper. *J. Phytopathol* 131:33–39.

84. Park, J. O., El-Tarabily, K. A., Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. (2002). Pathogenesis of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soilborne fungal pathogens. *Applied Microbiology* 35: 361-365.
85. Pérez, L., Batlle, A., Chacón, J., Montenegro, V. (2009). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* A34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*, agente causal de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá de los bananos en Cuba. *Rev. Fitosanidad* 13(4): 259-263.
86. Prashith, K., Shobha, K. S. and Onkarappa, R. (2010). Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharmacy Res.* 3:250-256.
87. Prescott, L. M. (2002). *Microbiology*. McGraw-Hill. Boston, Massachusetts, USA., p. 524- 528.
88. Procópio, R.E., Silva, I.R., Martins, M.K., Azevedo, J.L., Araújo, J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis* 16:466–471.
89. Reddy, G.S., Rao, A.S. (1971). Antagonism of soil actinomycetes to some soil borne plant pathogenic fungi. *Indian Phytopathol* 24:649–657.
90. Rejane, M., Machaculeha, A., Martins, F. and Hungria, M. (2018). Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated in Mato Grosso do Sul, a hotspot of Brazilian biodiversity. *Symbiosis* <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0543-6>.
91. Rheims, H., Spróer, C., Rainey, F. A. and Stackebrandt, E. (1999). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of

the Actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology* 142: 2863-2870.

92. Romero, A., Doval, M., Sturla, A., Judis, A. (2013). Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 11p.
93. Rothrock, C.S., Gottlieb, D. (1981). Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces species* to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.*34:830–835.
94. Sánchez-Yáñez, J. M., Villegas, M. J. y Márquez, B. I. (2007). El papel de los actinomicetos en la agricultura. Laboratorio de Microbiología ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. Monografía. p. 1-2.
95. Santalla, M., Rodiño, A. P., Abelleira, A. y Mansilla, P. (1998). Estudio preliminar de la incidencia del virus del mosaico común en variedades autóctonas de judías común. *Actas de Horticultura* 22: 228-232.
96. Scherwinski, K., Grosch, R., Berg, G. (2008). Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol* 64 (1):106–116.
97. Schoenian, I., Spiteller, M, M., Manoj M, J. (2014). Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf cutting ants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 801-32.

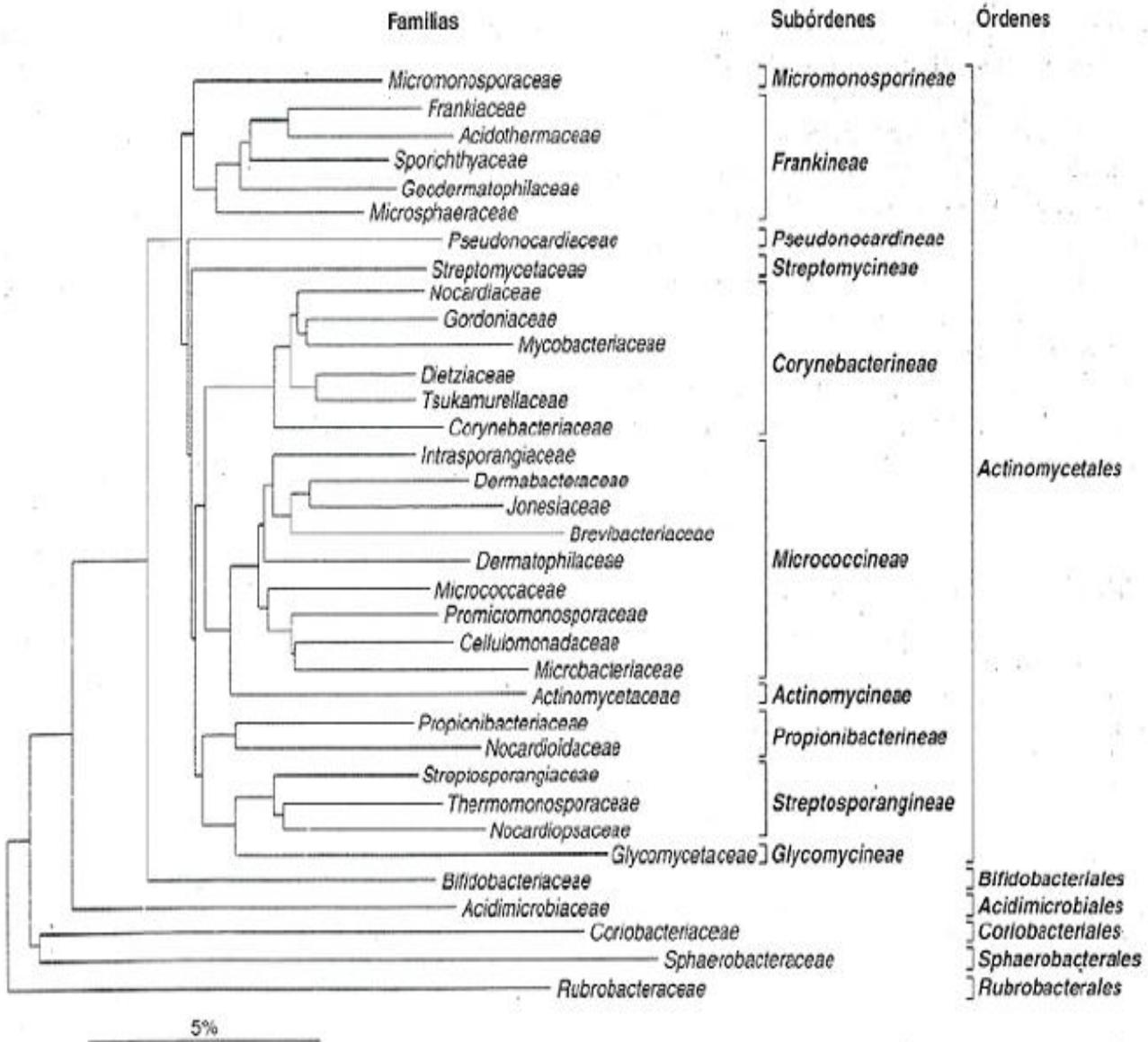
98. Sellem, I., Triki, M., Elleuch, L., Cheffi, M., Chakchouk, A., Smaoui, S., Mellouli, L. (2017). The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. *Journal Basic Microbiol.* 9999: 1. DOI 10.1002/jobm.201600604.
99. Singh, S., Gupta, R., Gaur, R, and Srivastava, A. (2015). Antagonistic actinomycetes mediated resistance in *Solanum lycopersicon* Mill. Against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* DOI 10.1007/s40011-015-0651-5.
100. Singh, C., Singh, R., Jadon, P. and Kumar, A. (2016). Characterization of actinomycetes against phytopathogenic fungi of *Glycine max.* (L.). *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9 (1):216-219
101. Socorro, M. y Martín, D. (1989). Granos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba, p. 1-53.
102. Stanley, Y. (1994). The Family *Streptomycetaceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 605-669 y 2344-2347.
103. Stefanova, M. (2007). Introducción y eficiencia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. *Fitosanidad* 11 (3):75-79.
104. Sylvia, D. M. (2005). Principles and applications of soil microbiology. New Jersey, USA, p. 259-306.
105. Tinatin, D. and Nurzat, T. (2006). Biodiversity of *Streptomyces* of high-mountainous ecosystems of Kyrgystan and its biotechnological potential. *Antonie Leeuwenhoek* 89:325-28.
106. ToKala, K., Strap, C., Jung, D., Crawford, L., Salove, L., Deobald, F., Baile, J. and Morra, J. (2002). Novel plant microbe rhizosphere interaction

- involving *Streptomyces lydicus*. WYEC 108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171.
107. Townsend, G. R. y Heuberger, J. W. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, 27(17), 340-343.
108. UNEX (2005). Lecciones hipertextuales de Botánica. Familia Fabaceae. Disponible en: <http://www.unex.es/botanica/LHB/rosidae/fabaceae.htm> (Consultado: 21 de abril de 2018).
109. Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R., Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. and Chung, Y. R. (1996). Biological Control of *Fusarium* wilt of cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.
110. Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. (2ª Edition). Ed. CRC Press. 486p.
111. Whipps, JM. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 52:487–511.
112. Wu, L., Shang, H., Wang, Q., Gu, H., Liu, G. and Yang, S. (2016). Isolation and characterization of antagonistic endophytes from *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl., and the biofertilizing potential of a novel *Pseudomonas saponiphila* strain. *Applied Soil Ecology* 105: 101-108.
113. Yobo, K. S. (2005). Biological control and plant growth promotion by selected *Trichoderma* and *Bacillus* species [dissertation]. Pietermaritzburg: University of KwaZulu-Natal. doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896.

114. Zaim, S., Amine-Bekkar, A. and Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896>.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Relaciones taxonómicas y filogenéticas de la clase Actinobacteria (Prescott, 2002).



**Anexo 2.** Escala para la evaluación de la severidad de la enfermedad causada por *R. solani* en frijol común

| <b>ÓRGANO AFECTADO</b>  | <b>GRADO</b> | <b>DESCRIPCION</b>   |
|---|--------------|--|
| <p style="text-align: center;">Raíz</p> <p>(Keijer <i>et al.</i>, 1997)</p>   | 0            | Ausencia de síntomas.  |
|   | 1            | Decoloración amarillenta-marrón cerca del hipocotilo.                                      |
|   | 2            | Ídem al anterior + lesiones o puntos marrón en la zona.                                    |
|   | 3            | Superficie completamente marrón o lesiones cubriendo más del 75% de la superficie radical. |
|   | 4            | <i>Damping off</i> pre emergente, plántulas muertas o en estado de marchitez.              |
| <p style="text-align: center;">Tallo</p> <p>(Bradley <i>et al.</i>, 2001)</p> | 1            | Ausencia de lesiones en el hipocotilo.   |
|   | 2            | Lesiones superficiales en el hipocotilo (decoloración amarillo-marrón).                    |
|   | 3            | Lesiones profundas en el tejido.   |
|   | 4            | Plántulas muertas o en estado de marchitez   |