



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

**CONTROL BIOLÓGICO DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS POR ACTINOMICETOS**

TESIS

QUE PRESENTA

ING. JUAN CARLOS RICO AGUILAR

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS LÓPEZ PÉREZ (IIAFUMSNH).

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. EVANGELINA ESMERALDA QUIÑONES AGUILAR (CIATEJ).

Morelia, Michoacán, febrero de 2020



El trabajo de esta tesis de investigación de maestría formó parte del área de investigación intitulada:

“El empleo de los actinomicetos en la agro-biotecnología para el control biológico de enfermedades en cultivos de interés agrícola”

Financiado por distintos proyectos de investigación del Laboratorio de Fitopatología de
Biotecnología Vegetal del CIATEJ

**Líderes del proyecto: Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Dr. Gabriel Rincón Enríquez**

La presente investigación de maestría se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A. C. y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Luis López Pérez y la co-dirección de la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, así como de la asesoría de la Mtra. Nuria Gómez Durante, el Dr. Gabriel Rincón Enríquez y del Dr. José Luciano Morales García.

De los resultados de ésta tesis se han presentado los siguientes trabajos.

9° Foro académico del posgrado en ciencias biológicas y agropecuarias, Morelia Michoacán 12 y 13 de diciembre 2018.

Ponencia poster: Análisis de metabolitos provenientes de actinomicetos para el control de bacterias fitopatógenas. Juan Carlos Rico Aguilar, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez, José Luciano Morales García, Nuria Gómez Dorantes y Luis López Pérez.

XXI Congreso Internacional/XLVI Congreso Nacional de Fitopatología, Morelia, Michoacán, México del 24 al 28 de agosto 2019.

Ponencia oral: Control biológico de bacterias fitopatógenas mediante actinomicetos en condiciones *in vitro*. Juan Carlos Rico-Aguilar, Cecilia Guízar-González, Gabriel Rincón-Enríquez, José Luciano Morales-García, Nuria Gómez-Dorantes, Luis López-Pérez, Evangelina E. Quiñones-Aguilar.

10° Foro académico del posgrado en ciencias biológicas y agropecuarias, Morelia Mich. 27 y 28 de noviembre 2019.

Ponencia oral: Control biológico de bacterias fitopatógenas por actinomicetos. Juan Carlos Rico Aguilar, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez, José Luciano Morales García, Nuria Gómez Dorantes y Luis López Pérez.

Artículo científico. Revista Biotecnología y Sustentabilidad.

Rico-Aguilar, J. C., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., Guizar-Gonzalez, C., Morales-García, J. L., Gómez-Dorantes, N. López-Pérez. L. (2019). Escala de severidad cualitativa de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. Biotecnología y Sustentabilidad. 4 (1). 47-54.

DEDICATORIA

A mi Familia: En especial a mis padres Etelvina Aguilar Guzmán y José Carlos Rico Reyes, por su apoyo incondicional, palabras de aliento ante cualquier obstáculo y por inspirarme a salir adelante cada día, agradezco su confianza, consejos, valores y humildad que me han inculcado y la gran bendición de tenerlos conmigo.

También le dedico este pequeño gran esfuerzo a mis hermanos: Osvaldo Rico Aguilar, Luis Antonio Rico Aguilar, Andrés Rico Aguilar, por animarme a cumplir nuevas metas, creer en mí y ver en mi persona a alguien capaz de lograr los objetivos y metas que se proponga.

A mi novia, amiga, amante y compañera de vida: Maricruz Campos Calderón, gracias por todo lo que me haz brindado: tu compañía, cariño, amistad y el amor compartido. Por tener en ti a alguien capaz de escucharme, apoyarme en mis decisiones y motivarme cuando mi optimismo no es el mejor.

A la Universidad Michoacana De San Nicolás de Hidalgo, por abrirme sus puertas para mí formación. **Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF)**, y al **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnologías y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ)** por el apoyo brindado durante la realización del trabajo y la facilidad de los materiales durante la realización del trabajo.

A la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar: Gracias por aceptar ser mi co-asesora de tesis, facilitarme el financiamiento y ser la actora intelectual del diseño y estructura de mi trabajo de investigación. Gracias por sus atenciones, apoyo y el asesoramiento durante mi maestría.

Al Dr. Luis López Pérez: Gracias por darme la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado, la confianza y asesoramiento brindados. Gracias por ser mi director de tesis, por el trabajo y el tiempo invertido en ello. Por sus consejos y experiencia de vida.

A la Dra. Nuria Gómez Dorantes: Gracias por ser parte de mi comité tutorial, por facilitarme material, equipo de laboratorio y el tiempo invertido en mi formación.

Al Dr. Gabriel Rincón Enríquez: Gracias por ser uno de mis tutores de investigación, por el tiempo invertido en las revisiones de trabajos, la excelente atención que siempre ha tenido conmigo y por facilitarme el aprendizaje de parte de sus conocimientos de estadística.

Al Dr. José Luciano Morales García: Por ser parte de mi comité tutorial, gracias por sus facilidades, le agradezco su atención y tiempo invertido en el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Cecilia Guizar González: Gracias por recibirme en mi estancia, facilitarme material, equipo de laboratorio y el tiempo invertido en mi formación. Por transmitirme parte de sus conocimientos, sus consejos académicos y personales. Admiro su sencillez y amabilidad.

A mis profesores de clase: Dra. Jeannette Sofía Bayuelo Jiménez, Dr. Philippe Lobit, Dr. Miguel Martínez Trujillo, Dr. Cuautémoc Sáenz, Dr. Nahúm Sánchez. Gracias por el esmero en la impartición de sus clases y compartir con nosotros sus conocimientos.

A compañeros y amigos: A Jesús Trinidad Cruz, por ser mi profesor, compañero y un gran amigo, gracias por ser parte de este logro, con tu apoyo y consejos Gracias por los gratos momentos, risas y bromas siempre serán recordados.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
IV. JUSTIFICACIÓN.....	6
V. HIPOTESIS GENERAL.....	7
VI. OBJETIVOS.....	7
• GENERAL.....	7
• ESPECIFICOS.....	7
VII. RESULTADOS.....	8
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS <i>in vitro</i>	8
1.1. RESUMEN.....	8
1.2. ABSTRACT.....	8
1.3. INTRODUCCIÓN.....	9
1.4. HIPOTESIS.....	10
1.5. OBJETIVOS.....	10
1.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1.6.1. Actinomicetos.....	11
1.6.2. Bacterias fitopatógenas.....	11
1.6.3. Medio de cultivo.....	11
1.6.4. Preparación del inóculo.....	11
1.6.5. Confrontación dual.....	12
1.6.6. Diseño experimental.....	12
1.6.7. Análisis estadístico.....	12
1.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
1.8. CONCLUSIÓN.....	19
1.9. BIBLIOGRAFÍA.....	20
ACTIVIDAD DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETOS CONTRA BACTERIAS FITOPATOGENAS <i>in vitro</i>	23
2.1. RESUMEN.....	23
2.2. ABSTRACT.....	23
2.3. INTRODUCCIÓN.....	24
2.4. HIPOTESIS.....	25

2.5. OBJETIVOS.....	25
2.6. MATERIALES Y METODOS	25
2.6.1. Actinomicetos.....	25
2.6.2. Bacterias fitopatógenas	26
2.6.3. Medio de cultivo	26
2.6.4. Sustrato.....	26
2.6.5. Preparación del inóculo semilla.....	26
2.6.6. Fermentación sólida	27
2.6.7. Fermentación semisólida.....	27
2.6.8. Fermentación líquida	27
2.6.9. Montaje del ensayo de confrontación dual.....	28
2.6.10. Diseño experimental	28
2.6.11. Análisis estadístico	29
2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
2.8. CONCLUSIÓN.....	35
2.9. BIBLIOGRAFÍA.....	35
SEPARACIÓN DE EXTRACTOS MEDIANTE CROMOTROGRAFIA DE PLACA FINA (TLC) Y EVALUACION BIOAUTOGRÁFICA.....	38
3.1. RESUMEN.....	38
3.2. ABSTRACT.....	38
3.3. INTRODUCCIÓN.....	39
3.4. OBJETIVO.....	40
3.5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.5.1. Reactivos y medio de cultivo	41
3.5.2. Preparación del inóculo semilla de actinomiceto.....	41
3.5.3. Fermentación sólida del actinomiceto	41
3.5.4. Preparación del extracto.....	41
3.5.5. Cromatografía de placa fina	41
3.5.6. Revelación y tinción	43
3.5.7. Bioautografía.....	43
3.6. RESULTADOS	43
3.7. CONCLUSIÓN	48
3.8. BIBLIOGRAFÍA.....	48
ESCALA CUALITATIVA DE SEVERIDAD DE <i>XANTHOMONAS VESICATORIA</i> EN PLANTAS DE CHILE CULTIVAR BECÁN	50

4.1. RESUMEN.....	50
4.2. ABSTRACT.....	50
4.3. INTRODUCCIÓN.....	51
4.4. OBJETIVO.....	52
4.5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
4.5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	52
4.5.2. Bacteria fitopatógena.....	53
4.5.3. Pruebas de patogenicidad.....	53
4.5.4. Registro de sintomatología.....	53
4.5.5. Diseño experimental.....	53
4.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.7. CONCLUSIÓN.....	56
4.8. BIBLIOGRAFÍA.....	56
CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Xanthomonas vesicatoria</i> CON EXTRACTOS DE ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE CHILE CULTIVAR BECÁN.....	59
5.1. RESUMEN.....	59
5.2. ABSTRACT.....	59
5.3. INTRODUCCIÓN.....	60
5.4. OBJETIVO.....	61
5.5. HIPÓTESIS.....	61
5.6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
5.6.1. Germinación.....	61
5.6.2. Inoculo bacteriano de <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	62
5.6.3. Preparación del inóculo de actinomicetos.....	62
5.6.4. Fermentación sólida de los actinomicetos	62
5.6.5. Diseño experimental	62
5.6.6. Inoculación de la cepa fitopatógena <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	63
5.6.7. Aplicación del extracto bioactivo de actinomiceto.....	63
5.6.8. Muestreos	63
5.6.9. Variables evaluadas	63
5.6.10. Análisis estadístico	64
5.7. RESULTADOS	65
5.7.1. Variables de crecimiento	65
5.7.2. Variables fitopatológicas.....	67

5.7.3. Variables fisiológicas	76
5.8. CONCLUSIÓN.....	76
5.9. BIBLIOGRAFÍA.....	77
CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> CON EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE FRIJOL EN CONDICIONES DE INVERNADERO	80
6.1. RESUMEN.....	80
6.2. ABSTRACT.....	80
6.3. INTRODUCCIÓN.....	81
6.4. HIPÓTESIS.....	82
6.5. OBJETIVO	82
6.6. MATERIALES Y METODOS	82
6.6.1. Germinación.....	83
6.6.2. Inoculo bacteriano de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	83
6.6.3. Preparación del inóculo de actinomicetos.....	83
6.6.4. Fermentación sólida de actinomicetos.....	83
6.6.5. Diseño experimental	83
6.6.6. Inoculación de la cepa fitopatógena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .	84
6.6.7. Aplicación del extracto bioactivo de actinomiceto.....	84
6.6.8. Variables evaluadas	84
6.6.9. Análisis estadístico	84
6.7. RESULTADOS	85
6.8. CONCLUSIÓN.....	91
6.9. BIBLIOGRAFÍA.....	91
VII. DISCUSION GENERAL.....	94
VIII. CONCLUSIÓN GENERAL	96
IX. PERSPECTIVAS	97
X. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA	97
XI. ANEXOS.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Inhibición del crecimiento de la cepa 3937 de *Dickeya dadantii*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 14
- Figura 2.** Inhibición del crecimiento de la cepa RITA de *Erwinia amylovora*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 15
- Figura 3.** Inhibición del crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 16
- Figura 4.** Inhibición del crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 17
- Figura 5.** Inhibición del crecimiento bacteriano generada por distintas cepas de actinomicetos en las 4 especies bacterianas: BV801 de *X. vesicatoria*, 1448A de *P. syringae*, 3937 de *D. dadantii* y RITA de *E. amylovora*. 18
- Figura 6.** Distribución de los tratamientos. A: Antibiótico; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida; TF: Tampón de Fosfato. 28
- Figura 7.** Inhibición del crecimiento in vitro de *D. dadantii* (3937), *E. amylovora* (RITA), *X. vesicatoria* (BV801) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A), por los extractos obtenidos de actinomicetos bajo tres tipos de fermentación. FL: Fermentación líquida. FSM: Fermentación semisólida. FS: Fermentación sólida. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 30
- Figura 8.** Inhibición generada por los extractos de fermentación sólida en el crecimiento de *D. dadantii* (3937), *E. amylovora* (RITA), *X. vesicatoria* (BV801) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A). A: Antibiótico. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$) para el mismo color de columna. I= Error estándar. 31
- Figura 9.** Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. A:

Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	32
Figura 10. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa 1448A de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> . A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	32
Figura 11. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa 3937 de <i>Dickeya dadantii</i> A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	33
Figura 12. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa 3937 de <i>Dickeya dadantii</i> . A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	33
Figura 13. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa BV801 de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> . A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	34
Figura 14. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa BV801 de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> . A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.	34
Figura 15. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).	44
Figura 16. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).	45
Figura 17. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).	46
Figura 18. Bioautografía del extracto de ED65 en los sistemas de disolventes con mejor separación de compuestos activos.	47
Figura 19. Evolución del desarrollo de síntomas en plantas de Chile cultivar Becán, infectadas con la cepa BV801 de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> . A) Planta sana; B) Aparición de puntos de color amarillo pálido; C) Puntos con tonalidad amarillo intenso;	

D) Incremento de puntos amarillos; E) Aparición y unión de manchas cloróticas; F) Inicio de defoliación y, G) Planta con defoliación.	55
Figura 20. Área foliar después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	65
Figura 21. Biomasa seca 18 días después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	66
Figura 22. Número de hojas 16 días después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	67
Figura 23. Número de hojas con manchas cloróticas 12 días después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	68
Figura 24. Número de hojas con manchas necróticas 12 días después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	69
Figura 25. Número de hojas defoliadas 12 días después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	70
Figura 26. Síntomas fitopatológicos encontrados a los 16 días después de la inoculación de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , en los tratamientos: planta sana (PS), y los extractos de ED66 y ED64.	70

- Figura 27.** Síntomas fitopatológicos encontrados a los 16 días después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*, en los tratamientos: extractos de ED65, ED67, EZ71, BZMW18, en el control químico (Q) y en el control planta enferma (PE). 71
- Figura 28.** Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*. K= Kasumin®; PE= Planta enferma; PS= Planta sana; T= Tampón fosfato. 72
- Figura 29.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de EZ71 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 73
- Figura 30.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED64 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 73
- Figura 31.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED65 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 74
- Figura 32.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED66 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 74
- Figura 33.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED67 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 75
- Figura 34.** Nivel de severidad obtenido por el extracto de BZMW18 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico. 75
- Figura 35.** Número de hojas con manchas necróticas 16 días después de la inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar. 85

Figura 36. Número de manchas por hoja 16 días después de la inoculación con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	86
Figura 37. Número de hojas defoliadas 16 días después de la inoculación con <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.	87
Figura 38. Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de frijol a 16 después de la inoculación de <i>P. syringae</i> . PE= Planta enferma; PS= Planta sana.	88
Figura 39. Nivel de severidad obtenido por los extractos de ED67, ED66 y ED65 después de la infección con la cepa 1448A de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaesolicola</i> . PS= planta sana; PE= planta enferma.....	89
Figura 40. Nivel de severidad obtenido por los extractos de ED67, ED66 y ED65 con base en la escala de virulencia en frijol a 16 días después de la infección con la cepa 1448A de <i>P. syringae</i> . PS= planta sana; PE= planta enferma.	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño de tratamientos del experimento control biológico por extractos bioactivos en plantas de chile cultivar Becán contra la mancha bacteriana (<i>Xanthomonas vesicatoria</i>).	63
Cuadro 3. Diseño de tratamientos de control biológico en frijol contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	84

I. RESUMEN GENERAL

Las bacterias fitopatógenas pueden causar enfermedades en una amplia gama de plantas, ocasionando síntomas como: manchas, canchros, pudriciones y desequilibrios hormonales, que perjudican a las plantas en un nivel cualitativo y cuantitativo. Esto afecta negativamente los suministros mundiales de alimentos, generando daños devastadores y pérdidas económicas significativas. Donde agentes de biocontrol microbiano como los actinomicetos tienen la capacidad de realizar antibiosis, parasitismo o competencia contra el patógeno por nutrientes y espacio; también pueden inducir en la planta resistencia a enfermedades, actuando en diferentes etapas del proceso de infección. Por esta razón, en este trabajo se evaluó la capacidad de cepas de actinomicetos y sus extractos bioactivos en la inhibición del crecimiento de cuatro bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*). El medio de cultivo utilizado para las bacterias fitopatógenas fue NYGA, KB y LB respectivamente. Las cepas de actinomicetos se evaluaron a través de un ensayo *in vitro* de confrontación en doble placa de Petri con el medio de cultivo PDA. Los extractos bioactivos se evaluaron mediante gotas de 5 μ L provenientes de tres fermentaciones distintas (líquida, semisólida y sólida). Se realizó una bioautografía directa combinada con la cromatografía en capa fina, para la separación de compuestos con actividad bactericida. Posteriormente en una fase de invernadero utilizando plantas de chile y frijol, se evaluó la capacidad de control biológico de algunos extractos bioactivos provenientes de actinomicetos, en la inhibición del crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria* y de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Se asperjaron 2 mL por planta del extracto bioactivo, 18 h después de la inoculación con la bacteria. Se encontró en los resultados del análisis de varianza diferencias significativas para el porcentaje de inhibición ($P=0.00$). De las 45 cepas de actinomicetos evaluadas, 41 mostraron actividad bactericida al menos contra una bacteria fitopatógena. En todas las bacterias fitopatógenas evaluadas, el actinomiceto ED65 presentó el mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de la bacteria. Se encontró diferencia significativa en el diámetro de inhibición generada por los extractos producidos bajo fermentación sólida en las cepas seleccionadas ($P=0.00$). El extracto de la cepa ED65 presentó un diámetro de inhibición mayor o igual al generado por el antibiótico "sulfato de gentamicina" en *Xanthomonas vesicatoria*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*. La TLC con bioautografía permitió identificar más de un compuesto activo, obteniendo mayor movilidad de los compuestos activos con sistemas de disolventes de polaridad media alta,

lograron separar y movilizar al menos un compuesto activo. Del experimento en plantas de chile en invernadero, se obtuvo diferencia significativa en las variables fitopatológicas ($P=0.00$), donde se presentó menor cantidad en de hojas con manchas cloróticas en las plantas asperjadas con extractos bioactivos de las cepas ED64 y ED65, en comparación con el producto químico Kasumin®. Las plantas asperjadas con los extractos provenientes de la cepa de actinomiceto ED65, no presentaron hojas con manchas necróticas ni defoliación. El análisis de varianza del experimento de frijol mostro diferencias significativas en las tres variables ($P=0.00$). Se obtuvo una disminución en el número de hojas con manchas necróticas y el número de manchas por hoja, en las plantas asperjadas con los extractos bioactivos de las cepas ED65, ED66 y ED67, en comparación al tratamiento donde solo se asperjó el inoculo de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Los extractos de actinomicetos con actividad bactericida son una alternativa viable de control biológico en cultivos hortícolas.

Palabras clave: Xanthomonas, Pseudomonas, Extractos, Bioactivo, Toxicidad.

II. ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria can cause diseases in a wide range of plants, causing symptoms such as, spots, cankers, rot and hormonal imbalances, which harm plants at a qualitative and quantitative level. This negatively affects world food supplies, generating devastating damage and significant economic losses. Where microbial biocontrol agents such as actinomycetes have the ability to perform antibiosis, parasitism or competition against the pathogen for nutrients and space, they can also induce disease resistance in the plant, acting at different stages of the infection process. For this reason, in this work we evaluated the ability of actinomycete strains and their bioactive extracts to inhibit the growth of four phytopathogenic bacteria (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora* and *Dickeya dadantii*). The culture medium used for the phytopathogenic bacteria was NYGA, KB and LB respectively. Actinomycete strains were evaluated through an *in vitro* test of double Petri dish confrontation with PDA culture medium. The bioactive extracts were evaluated by drops of 5 μ L from three different fermentations (liquid, semi-solid and solid). A direct bioautography combined with thin layer chromatography was performed for the separation of compounds with bactericidal activity. Subsequently in a greenhouse phase using chili and bean plants, the biological control capacity of some bioactive extracts from actinomycetes was evaluated, in the inhibition of the growth of strain BV801 of *Xanthomonas vesicatoria* and strain 1448A of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. 2 mL per plant of the bioactive extract was sprayed, 18 h after inoculation with the bacteria. Significant differences were found in the results of the variance analysis for the percentage of inhibition ($P = 0.00$). Of the 45 strains of actinomycetes evaluated, 41 showed bactericidal activity against at least one phytopathogenic bacteria. In all phytopathogenic bacteria evaluated, actinomycete ED65 had the highest percentage of inhibition in bacterial growth. A significant difference was found in the diameter of inhibition generated by the extracts produced under solid fermentation in the selected strains ($P = 0.00$). The extract of strain ED65 had a diameter of inhibition greater than or equal to that generated by the antibiotic "gentamicin sulfate" in *Xanthomonas vesicatoria*, *Erwinia amylovora* and *Dickeya dadantii*. The TLC with bioautography allowed to identify more than one active compound, obtaining greater mobility of the active compounds with solvent systems of high medium polarity, managed to separate and mobilize at least one active compound. From the experiment in greenhouse chili plants, a significant difference was obtained in the phytopathological variables ($P = 0.00$), where there was a lower amount of

leaves with chlorotic spots in the plants sprinkled with bioactive extracts of the ED64 and ED65 strains, in comparison with the Kasumin® chemical. The plants sprinkled with the extracts from the actinomycete strain ED65 did not show leaves with necrotic spots or defoliation. The variance analysis of the bean experiment showed significant differences in the three variables ($P = 0.00$). There was a decrease in the number of leaves with necrotic spots and the number of spots per leaf, in plants sprinkled with the bioactive extracts of strains ED65, ED66 and ED67, compared to the treatment where only the inoculum of the strain was sprayed 1448A of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Actinomycete extracts with bactericidal activity are a viable alternative of biological control in horticultural crops.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas están ampliamente colonizadas por una gran diversidad de microorganismos, que favorecen una alta variedad de interacciones planta-microbio. Algunas de estas interacciones son beneficiosas, mientras que otras son perjudiciales para la planta, ya que el suelo es un ambiente heterogéneo que está densamente poblado con microorganismos como bacterias y hongos.

Las bacterias fitopatógenas pueden causar enfermedades en una amplia gama de plantas en todo el mundo (Strange y Scott, 2005), ocasionando síntomas como manchas, chancros, pudriciones, desequilibrios hormonales que conducen al crecimiento excesivo de plantas o retraso en el crecimiento, ramificación de raíces y epinastia de hojas, entre otros (Kannan *et al.*, 2015). Estos problemas afectan a las plantas en un nivel cualitativo y cuantitativo, perjudicando negativamente los suministros mundiales de alimentos (Kannan *et al.*, 2015), generando daños devastadores y pérdidas económicas significativas de más de \$ 1 mil millones de dólares en todo el mundo, cada año a la cadena de producción de alimentos (Mansfield *et al.*, 2012).

Los agentes de biocontrol microbiano tienen la capacidad de realizar antibiosis, parasitismo o competencia contra el patógeno por nutrientes y espacio. También pueden inducir resistencia a enfermedades en la planta huésped que colonizan, actuando en diferentes etapas del proceso de infección (Vurukonda *et al.*, 2018). En general, las actinobacterias o actinomicetos son bacterias grampositivas con un contenido extremadamente alto de guanina y citosina (G + C) del genoma, existen como bacterias filamentosas como resultado de la formación de hifas ramificadas (Barka *et al.*, 2016). Conocidos su producción de un amplio espectro de antibióticos, especialmente especies del género *Streptomyces* (Procópio *et al.*, 2012). Los actinomicetos pueden producir enzimas que degradan las paredes celulares, especialmente por la producción de quitinasas (Gutpa *et al.*, 1995).

La mayoría de los actinomicetos se describen como productores de metabolitos que interfieren positivamente con la vida vegetal, al mejorar la adquisición de nutrientes o al estimular los mecanismos de defensa de la planta contra los patógenos (Brader *et al.*, 2014). Siendo los actinomicetos famosos por su complejo ciclo de vida de desarrollo (Elliot *et al.*, 2008), y su capacidad para producir una gama extraordinaria de metabolitos especializados que tienen propiedades antibióticas, antifúngicas, antiparasitarias y anticancerígenas (Hopwood, 2007).

La naturaleza filamentosa y esporulante de *Streptomyces* les permite sobrevivir durante condiciones ambientales desfavorables. Por lo tanto, parecen competir de manera más eficiente contra muchos otros microorganismos presentes en la rizosfera (Seipke *et al.*, 2012). El género *Streptomyces* ha sido ampliamente estudiado y utilizado para el biocontrol de patógenos transmitidos por el suelo debido a su intensa actividad antagonista a través de la producción de varios metabolitos (Xiao, 2002).

Por este motivo se desarrolló un estudio acerca del control biológico de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile (*Capsicum annum* L.) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el agente causante del tizón de halo en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), mediante la aplicación de extractos de microorganismos de control biológico como actinomicetos. Previamente se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro* con actinomicetos contra el fitopatógeno (confrontación dual), posteriormente se analizó la producción del extracto de actinomicetos y su actividad *in vitro*. Posteriormente se evaluó el control biológico de los extractos contra la mancha bacteriana y el tizón del halo en plantas de chile cultivar “Becán” y plantas de frijol variedad “Azufrado”, en condiciones de invernadero. Los resultados mostraron que los extractos de actinomicetos son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de las bacterias fitopatógenas, además son capaces de reducir el nivel de severidad *in planta*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios antimicrobianos productores de estreptomicetos presentan una alternativa atractiva a los fertilizantes químicos, pesticidas y suplementos, lo que puede resultar en un aumento significativo en el crecimiento de las plantas de interés agrícolas y el control de sus plagas y enfermedades (Sousa *et al.*, 2008). Los actinomicetos son fuentes prometedoras en compuestos activos y herramientas de biocontrol en varios sectores agrícolas (Behal, 2000). De hecho, en los últimos 30 años, alrededor del 60% de los nuevos insecticidas y herbicidas reportados se originaron a partir de *Streptomyces* (Tanaka y Omura, 1993).

Tres cuartos de las especies de *Streptomyces* registradas son capaces de producir alguna clase de antibiótico (Alexander, 1977). Como ejemplo, la kasugamicina registrada en varios países como agroquímico bactericida y fungicida, fue descubierta en *Streptomyces kasugaensis* (Umezawa *et al.*, 1965). Más recientemente, Siddique *et al.* (2013) informaron

que la avermectina B1b, un componente de la abamectina disponible comercialmente, se obtuvo como producto de fermentación de *Streptomyces avermitilis*, se ha utilizado con frecuencia como agente insecticida.

Debido a la aparición de reportes de resistencia de ciertas bacterias a los bactericidas comerciales, se busca encontrar extractos bioactivos con potencial agrícola para el control de esas bacterias fitopatógenas, es por ello que en este trabajo se evaluaron los extractos de cepas de actinomicetos obtenidos bajo fermentación sólida en la bioprotección contra *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile y contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bajo condiciones de invernadero.

V. HIPOTESIS GENERAL

Los actinomicetos y sus extractos bioactivos presentarán algún grado de inhibición en el crecimiento de bacterias fitopatógenas *in vitro* e *in planta* bajo condiciones de invernadero.

VI. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la actividad antagónica de actinomicetos y sus extractos bioactivos contra bacterias fitopatógenas *in vitro* e *in planta* en invernadero.

ESPECIFICOS

- Evaluar *in vitro* diferentes cepas de actinomicetos contra cuatro especies de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*).
- Determinar *in vitro* la actividad de los extractos bioactivos de actinomicetos en la inhibición en crecimiento de cuatro especies de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*).
- Evaluar el control biológico de *Xanthomonas vesicatoria* mediante extractos bioactivos de actinomicetos en plantas de chile caribe en condiciones de invernadero.
- Evaluar el control biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* mediante extractos bioactivos de actinomicetos en frijol en condiciones de invernadero.

VII. RESULTADOS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS *in vitro*

1.1. RESUMEN

Las bacterias fitopatógenas, originan grandes pérdidas económicas en la agricultura, al disminuir la cantidad y la calidad de los productos cosechados. En este trabajo se evaluó en condiciones *in vitro* la capacidad de 45 actinomicetos aislados del suelo para inhibir el crecimiento de cuatro cepas de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaesolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*), a través de un ensayo de confrontación en doble placa. Los actinomicetos se sembraron en medio PDA-Y a pH 7, durante siete días a 28° C, posteriormente se cortaron tapones de micelio (7 mm de diámetro) y se colocaron en placas de agar (PDA), incubándose a 28°C durante 5 días. Después en la caja Petri donde creció el actinomiceto se vertió 4 mL de medio suave a 48°C con 400 µL de bacteria ajustada a 1×10^7 UFC mL⁻¹. El porcentaje de inhibición del crecimiento para cada una de las bacterias se determinó después de 48 h del crecimiento bacteriano. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey (P<0.05). El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la inhibición de crecimiento de las bacterias fitopatogenas: *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaesolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya daddantii* (P=0.00). De las 45 cepas de actinomicetos evaluadas, 41 mostraron actividad antibacteriana al menos contra una bacteria fitopatógena, donde las cepas de actinomicetos ED65, ED66, ED67 mostraron porcentajes de inhibición mayores al 80% (P=0.00). En todas las bacterias fitopatógenas la cepa de actinomiceto ED65 presentó el mayor porcentaje de inhibición en crecimiento, por lo tanto, se podría evaluar y producir extractos bioactivos con la capacidad de control biológico.

1.2. ABSTRACT

Phytopathogenic bacteria, cause great economic losses in agriculture, by decreasing the quantity and quality of harvested products. In this work, the ability of 45 isolated actinomycetes from the soil to inhibit the growth of four strains of phytopathogenic bacteria (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaesolicola*, *Erwinia amylovora* and

Dickeya dadantii) was evaluated *in vitro* conditions, through double plate confrontation. The actinomycetes were seeded in PDA-Y medium at pH 7, for seven days at 28°C, subsequently mycelium plugs (7 mm in diameter) were cut and placed in agar plates (PDA), incubated at 28°C for 5 days. Then in the Petri dish where the actinomycete grew, 4 mL of soft medium was poured at 48°C with 400 µL of bacteria adjusted to 1×10^7 CFU mL⁻¹. The percentage of growth inhibition for each of the bacteria was determined after 48 h of bacterial growth. An analysis of variance and comparison tests of Tukey means ($P < 0.05$) were performed. The analysis of variance showed significant differences in the inhibition of growth of phytopathogenic bacteria: *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora* and *Dickeya dadantii* ($P = 0.00$). Of the 45 strains of actinomycetes evaluated, 41 showed antibacterial activity at least against a phytopathogenic bacterium, where the actinomycete strains ED65, ED66, ED67 showed inhibition percentages greater than 80% ($P = 0.00$). In all the phytopathogenic bacteria, the actinomycete strain ED65 had the highest percentage of growth inhibition; therefore, bioactive extracts with the biological control capacity could be evaluated and produced.

1.3. INTRODUCCIÓN

El criterio más importante en la selección de los alimentos se basa en criterios de calidad, que determinan el precio, la oportunidad y venta de los productos. El productor ve mermada la calidad y comercialización de sus cosechas, debido al ataque de patógenos como bacterias fitopatógenas (Serrano *et al.*, 2003), agravado por el desconocimiento de resistencia a ciertos ingredientes activos, aunado la toxicidad, y los largos períodos de degradación y contaminación ambiental (Gregory *et al.*, 2004).

El uso de agentes de biocontrol contra los principales patógenos de las plantas se está convirtiendo en una alternativa valiosa para el control químico de las enfermedades de las plantas y representa un recurso importante para el futuro de la agricultura (Bardin *et al.*, 2015). Ningún microorganismo puede sobrevivir independientemente, ya que todos los microorganismos interactúan y se generan interacciones beneficiosas, neutrales y dañinas (Moënné-Loccoz *et al.*, 2014).

Los actinomicetos han sido estudiados por sus efectos antibacterianos y antifúngicos (Wei *et al.*, 2017), así como por sus capacidades de promoción del crecimiento de las plantas (Viaene *et al.*, 2016), secreción de metabolitos secundarios entre ellos diversos antibióticos y enzimas degradativas de la pared celular (Franco-Correa, 2008). Por lo tanto, son

candidatos interesantes para el control de patógenos de plantas (Doumbou *et al.*, 2001), por su variedad de metabolitos con actividades biológicas (Barka *et al.*, 2016).

A través de un ensayo de cultivo dual Kunova *et al.*, 2016 comparó la actividad de inhibición de cepas de actinomicetos contra múltiples patógenos, encontrando cepas con una fuerte actividad *in vitro* contra los seis patógenos. Mientras que Nguyen *et al.*, 2015 establecieron evidencias de antagonismo mediante la producción de metabolitos antifúngicos a partir de *Streptomyces griseus* H7602, que fueron activos en la inhibición micelial de *Phytophthora capsici* en los ensayos *in vitro*. Kaur *et al.*, 2016 encontró que la cepa DH16 de *S. hydrogenans* y sus metabolitos, exhibieron diversas actividades biológicas, demostrando ser potentes agentes nematocidas. Siendo un biopesticida multifuncional, seguro (no fitotóxico, no mutagénico y no citotóxico) contra una amplia gama de patógenos y plagas de plantas (hongos, nematodos e insectos). Además, de poder usarse como un biofertilizante eficiente para promover el crecimiento de las plantas.

Por tanto, en este capítulo se planteó como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de actinomicetos bajo condiciones *in vitro*.

1.4. HIPOTESIS

Las cepas de actinomicetos seleccionadas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de al menos una especie de bacteria fitopatógena.

1.5. OBJETIVOS

- Determinar el porcentaje de inhibición de diferentes especies de bacterias fitopatógenas por parte de cada uno de los actinomicetos evaluados en confrontación dual *in vitro*.
- Seleccionar las cepas de actinomicetos con mayor actividad antibacteriana con base a la inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro*.

1.6. MATERIALES Y MÉTODOS

Estos experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

1.6.1. Actinomicetos

Las cepas de actinomicetos empleadas pertenecen a la colección de actinobacterias del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ. Estas cepas fueron aisladas por Jesús Trinidad, de suelos del estado de Michoacán (EZ, EZMW, ED y ABV) y Zacatecas (BZ y BZMW); y fueron obtenidas por la técnica de diluciones y tratamientos de calor (70°C durante 1 h y 3 minutos en microondas). Se utilizaron 45 cepas de actinobacterias que presentaron previamente inhibición contra la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*, de acuerdo al experimento previo de selección realizado por Jesús Trinidad (2018) como parte de su trabajo de doctorado.

1.6.2. Bacterias fitopatógenas

Se evaluaron las siguientes bacterias fitopatógenas:

- *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (cepa 1448A)
- *Erwinia amylovora* (cepa RITA)
- *Dickeya dadantii* (cepa 3937)
- *Xanthomonas vesicatoria* (cepa BV801)

Las cepas evaluadas fueron proporcionadas por el laboratorio Fitopatología del CIATEJ.

1.6.3. Medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la reactivación de los actinomicetos fueron PDA-Y (39 g L⁻¹ de agar papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7; ISP2 (Pridham *et al.*, 1956-1957) a pH 7.3; e ISP3 (Küster, 1959a). El medio de cultivo utilizado para establecer los ensayos de confrontación fue PDA (39 g L⁻¹ de agar papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7.

1.6.4. Preparación del inóculo

Los actinomicetos se reactivaron dependiendo del medio de aislamiento en PDA-Y, ISP2 o ISP3, durante siete días a 28°C bajo oscuridad en incubadora, posteriormente se transfirió un disco de micelio de 7 mm de diámetro de cada cepa en estudio, a una caja Petri de 90 mm de diámetro que contenía 25 mL medio PDA a pH 7 y se incubó a 28°C durante cinco días.

1.6.5. Confrontación dual

Se vertió 4 mL de medio suave LB, NYG o KB según la cepa bacteriana a 48°C con 400 µL de cultivo bacteriano ajustado a 1×10^7 UFC mL⁻¹ en cajas Petri con medio PDA a pH 7 y un disco de micelio de 7 mm previamente incubado durante cinco días. Después de 48 horas se procedió a medir el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano, con el cual se calculó el porcentaje de inhibición, mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición bacteriana} = \frac{\text{Área de inhibición de cada tratamiento}}{\text{Área de crecimiento del control}} \times 100$$

El área de control se control se determinó mediante el radio de crecimiento de la bacteria por π al cuadrado, mientras que el área de inhibición se calculó mediante el radio de inhibición generado por cada tratamiento por π al cuadrado.

1.6.6. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar en donde se evaluaron las 45 cepas de actinomicetos y un control donde únicamente se colocó al patógeno. Se evaluaron 46 con cuatro repeticiones.

1.6.7. Análisis estadístico

A los datos se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, estos se realizaron en el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II.

1.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la inhibición de crecimiento de las bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaesolicola*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii* ($p=0.00$). Las cepas de actinomicetos mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias fitopatógenas, mostrando diferencias dependiendo de la bacteria y la cepa utilizada, debido a que los actinomicetos usan diferentes mecanismos antagonistas y producen diferentes moléculas bioactivas involucradas en el antagonismo contra diferentes patógenos (Kunova *et al.*, 2016). Del total de actinomicetos 29 cepas (64%) inhibió el crecimiento de la cepa 3937 de *Dickeya dadantii* (**Figura 1**). Mientras que solo 26 de las cepas (58%) inhibieron el crecimiento de la cepa Rita de *Erwinia amylovora*, de las cuales ED63, ED65 y ED67 generaron un porcentaje de

inhibición mayor al 45% (**Figura 2**). Se presentó una mayor inhibición con las cepas de actinomicetos pertenecientes a la colección ED (**Figura 1-4**), en ambas bacterias fitopatógenas. Solo 39 cepas de actinomicetos (87%) generó inhibición de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*, se encontró que existen cepas muy específicas para una bacteria, tal es el caso de EZ71 que inhibe en más del 70% a *Xanthomonas vesicatoria* (**Figura 3**), mientras que a *Dickeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. *Phaesolicola* la inhibió en menos del 8% y a *Erwinia amylovora* en menos del 25%. Se obtuvo una inhibición mayor al 80% en *Pseudomonas syringae* pv. *Phaesolicola* con las cepas ED65, ED66 y ED67 (**Figura 4**). La cepa de actinomiceto ED65 generó una inhibición mayor al 71% en todas las bacterias fitopatógenas en estudio. La formación de una zona de inhibición (**Figura 5**) generalmente es causada por los metabolitos secundarios producidos por actinomicetos (Guerra *et al.*, 2014), debido a efectos bacteriostáticos, bactericidas, o combinación de ambos.

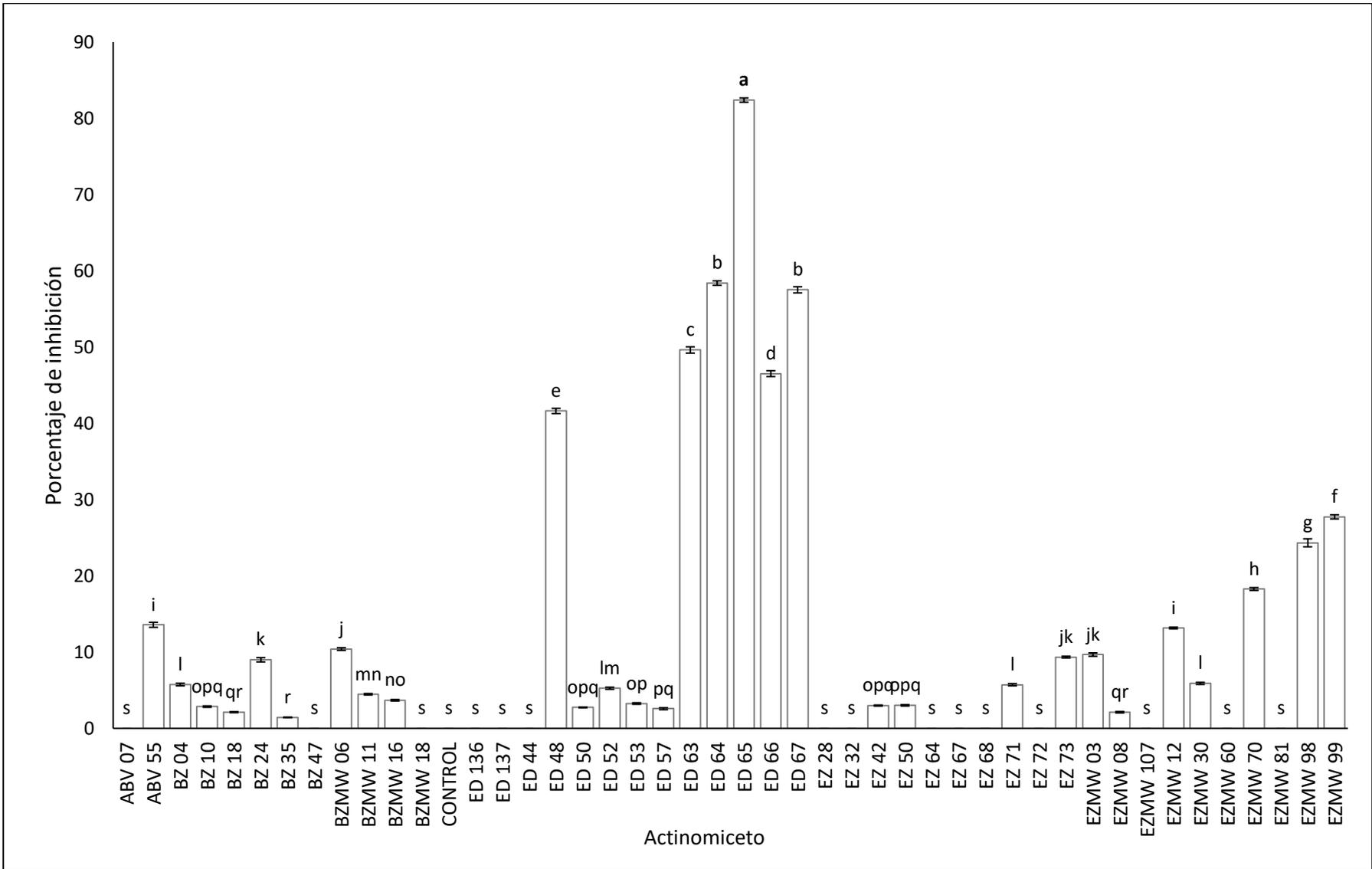


Figura 1. Inhibición del crecimiento de la cepa 3937 de *Dickeya dadantii*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

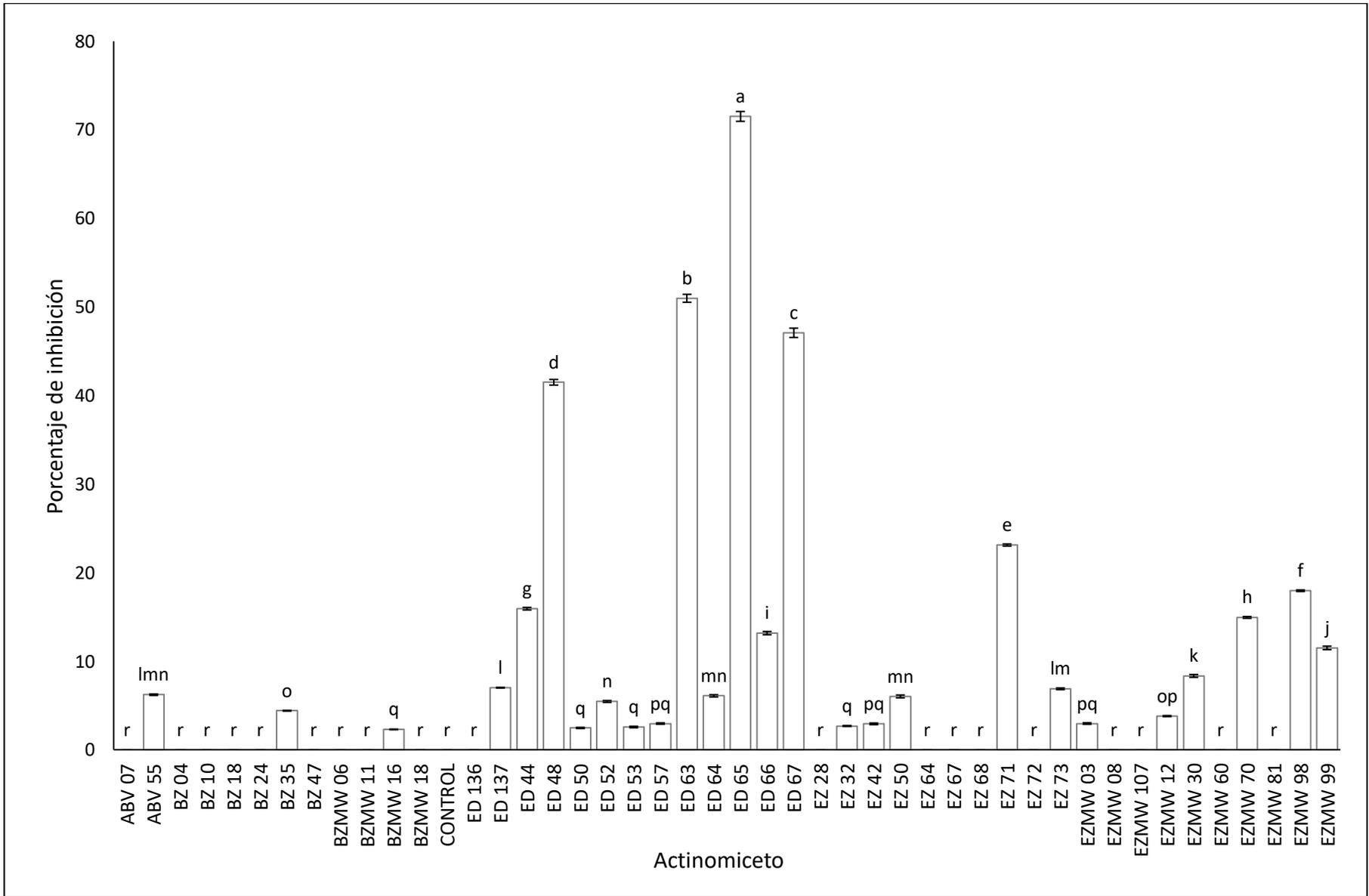


Figura 2. Inhibición del crecimiento de la cepa RITA de *Erwinia amylovora*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

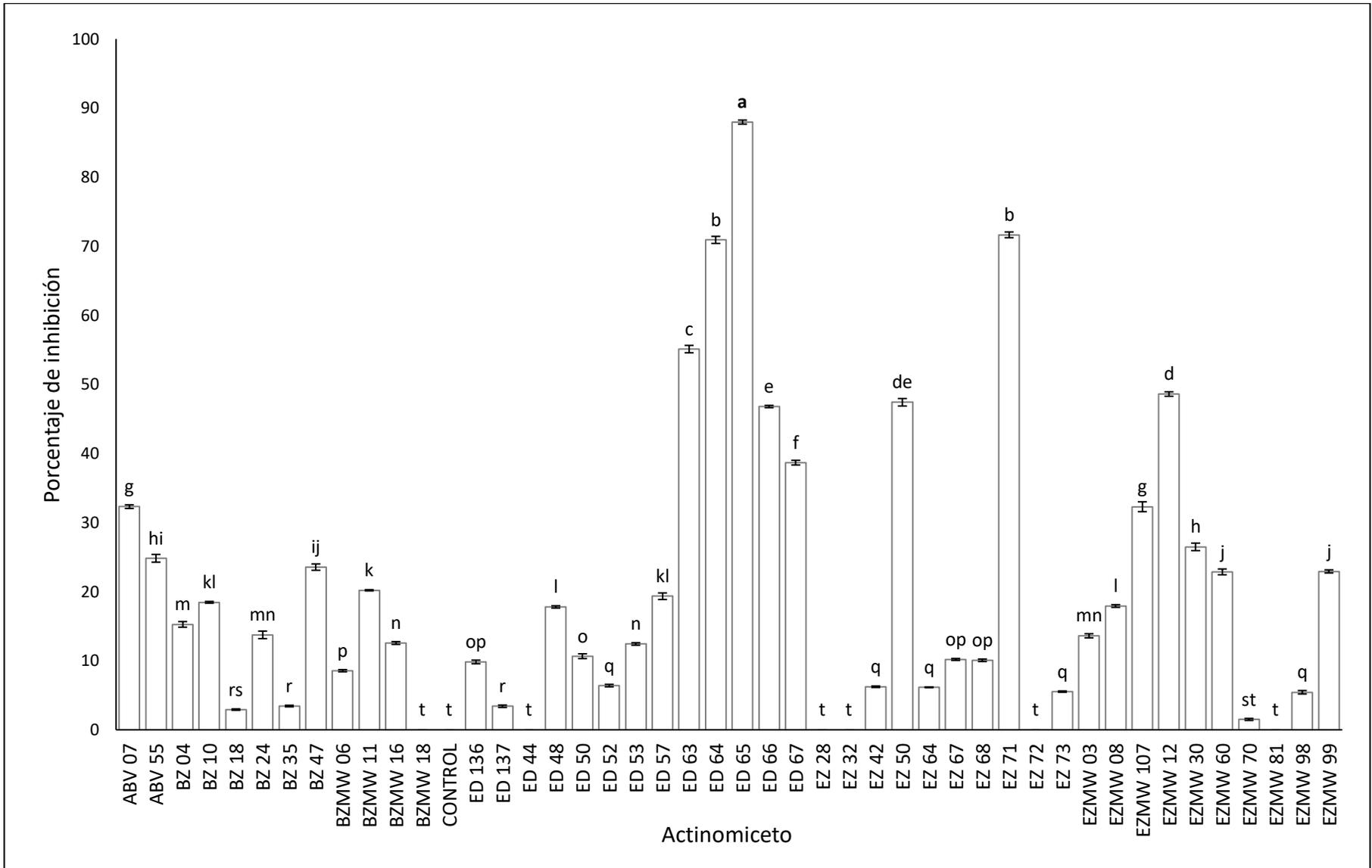


Figura 3. Inhibición del crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

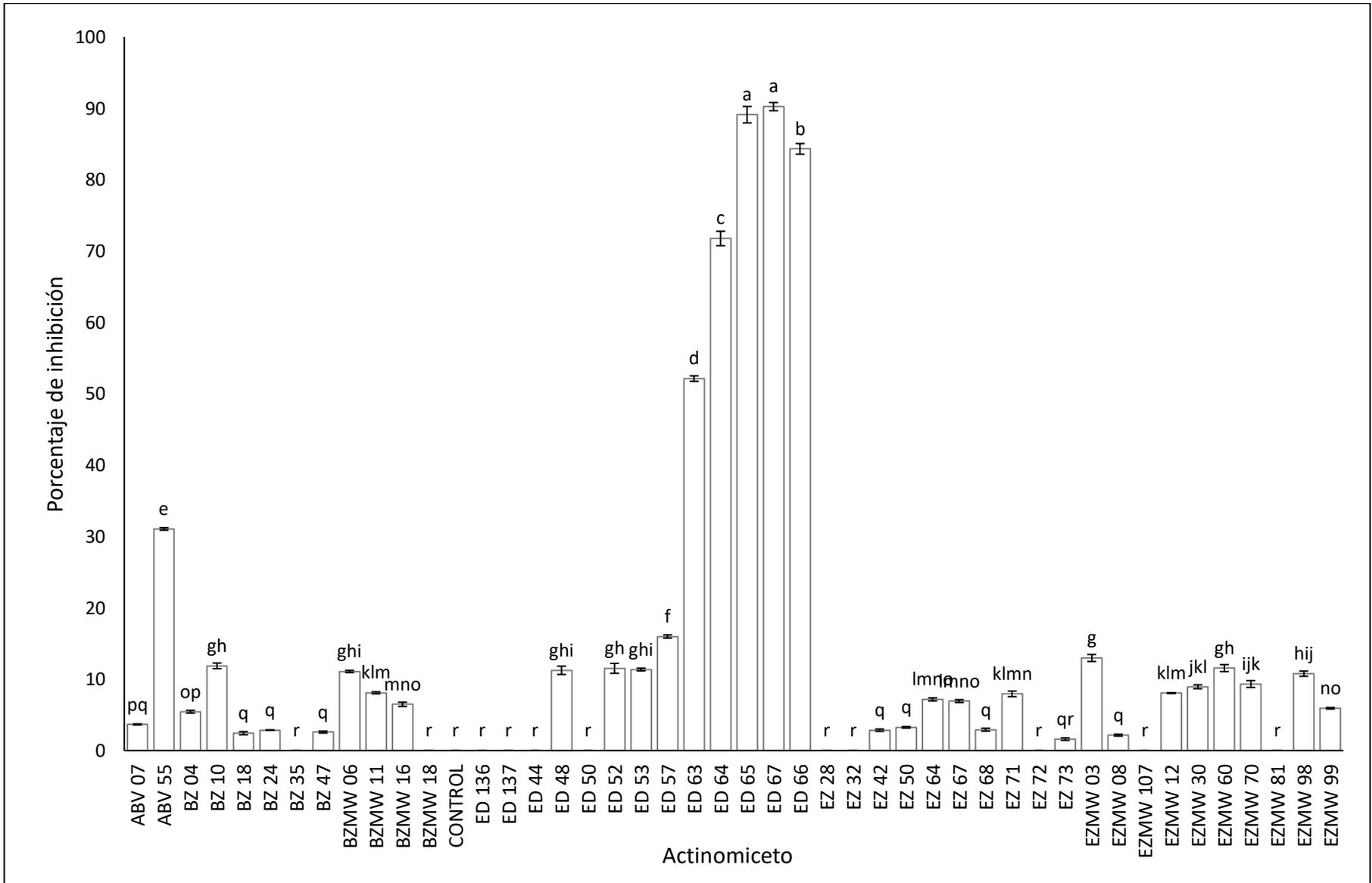


Figura 4. Inhibición del crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa según (Tukey, P<0.05). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

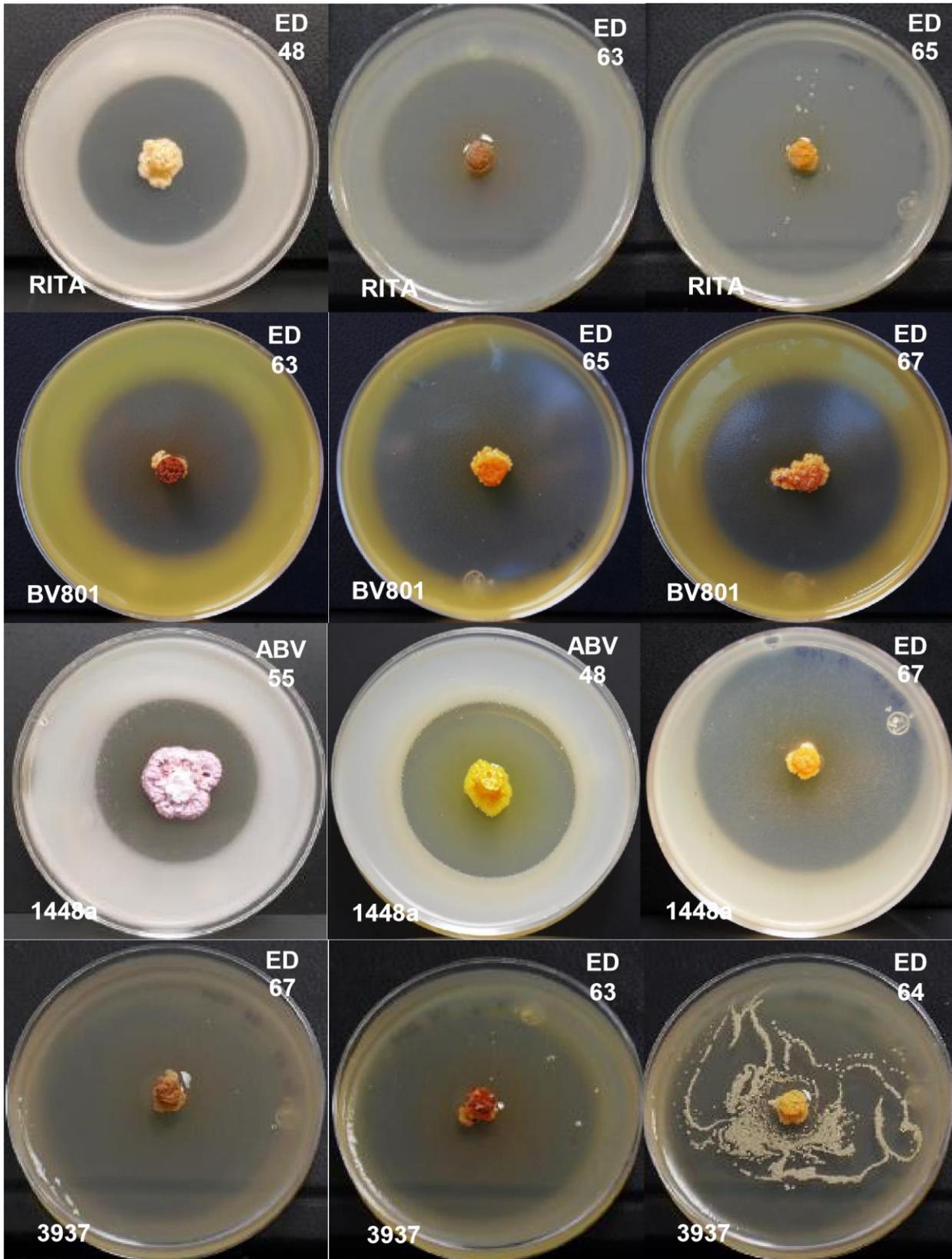


Figura 5. Inhibición del crecimiento bacteriano generada por distintas cepas de actinomicetos en las 4 especies bacterianas: BV801 de *X. vesicatoria*, 1448A de *P. syringae*, 3937 de *D. dadantii* y RITA de *E. amylovora*.

La selección de agentes de control biológico generalmente comienza con un examen *in vitro* de una colección de cepas contra patógenos seleccionados mediante un ensayo de confrontación dual, en el que el candidato, en este caso la cepa de actinomiceto se cultiva junto con el patógeno en medio de agar y su actividad antagonista se cuantifica en términos de inhibición del crecimiento del patógeno (Pliego *et al.*, 2011). La supresión del crecimiento del agente patógeno ocurre cuando los microbios antagonistas compiten con los patógenos por los nutrientes y el espacio (Siddiquee *et al.*, 2010). Para suprimir los patógenos, los microbios antagonistas exhiben varios mecanismos que incluyen la producción de antibióticos, enzimas que degradan la pared celular y parasitismo (directo) e inducción de resistencia del huésped (indirecto). Los microbios antagonistas que exhiben múltiples mecanismos tienen más éxito en la supresión del agente causal de la enfermedad en las plantas. Tales microbios son los candidatos preferidos para el desarrollo de agentes de biocontrol (Palaniyandi *et al.*, 2013). Según los resultados de un ensayo de cultivo dual de Kunova *et al.* (2016), enfatizaron sobre la actividad específica antagonista patógeno de las cepas individuales de *Streptomyces*, ya que producen diferentes moléculas bioactivas involucradas en el antagonismo contra diferentes patógenos. Los actinomicetos producen una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos que se sabe que tienen actividades antiinflamatorias, antipalúdicas, antifúngicas, antibacterianas, antialgas y anticancerígenas. El género *Streptomyces* produce compuestos como ivermectina, tetraciclina, estreptomina, nistatina, etc. (Ser *et al.*, 2016). Lyu *et al.* (2017), identificaron dos compuestos de *Streptomyces*, como reveromicinas A y B, que demostraron una alta actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer* y *Sclerotinia sclerotiorum*. *Streptomyces spectabilis* puede producir muchos tipos de antibióticos con alta actividad antibacteriana, incluida la espectinomicina (Kim *et al.*, 2008), estreptovaricina (Kakinuma *et al.*, 1976) y desertomicina (Ivanova, 1997). Cheng *et al.* (2016), indican que *Streptomyces sp.* MJM4426 puede proteger las hojas de arroz de la infección de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331 (Xoo) al producir estaurosporina.

1.8. CONCLUSIÓN

El 91% de las cepas de actinomicetos evaluadas mostraron un efecto antagónico en distinta proporción al menos con una especie de bacteria fitopatógena. El actinomiceto ED65 presentó el mayor porcentaje de inhibición estadísticamente significativo ($P = 0.00$) en las cuatro bacterias fitopatógenas en estudio. Cada cepa de actinomiceto mostró respuesta

distinta de una bacteria a otra. Las cepas ED48, ED63, ED64, ED65, ED66, ED67, EZ50, EZ71 y EZMW12 presentaron un diámetro de inhibición mayor al 50% cuando menos en una bacteria, las cuales se recomiendan usar en estudios posteriores ($P = 0.00$).

1.9. BIBLIOGRAFÍA

- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillet, B., Siegwart, M., Nicot, P. C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides?. *Frontiers in Plant Science*. 6: 566.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van-Wezel, G. P. (2016). Taxonomía, fisiología y productos naturales de las actinobacterias. *Microbiología y Revisiones de Biología Molecular*. 80 (1): 1–43.
- Chen, X., Pizzatti, C., Bonaldi, M., Saracchi, M., Erlacher, A., Kunova, A., ... Cortesi, P. (2016). Control biológico de la caída de lechuga y colonización de la planta huésped por estreptomicetos rizosféricos y endofíticos. *Frontiers in Microbiology*. 7.
- Doumbou, C., Hamby Salove, M., Crawford, D. y Beaulieu, C. (2001). Actinomicetos, herramientas prometedoras para controlar las enfermedades de las plantas y promover el crecimiento de las plantas. *Fitoprotección*, 82 (3), 85-102.
- Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR de actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral, Universidad de Granada. 261.
- Gregory, E., Welbaum, A. V., Sturz, Z. D., y Jerzy N. (2004). Gestión de los microorganismos del suelo para mejorar la productividad de los agroecosistemas, críticas en ciencias de las plantas. 23: 2, 175-193.
- Guerra-Rodríguez, E. y Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*. 92 (4) 784-791.
- Ivanova, V. (1997). Nueva macrolactona de la familia desertomicina de *Streptomyces spectabilis*. *Deberes. Biochem. Biotech.* 27, 19-38.

- Kakinuma, K., Hanson, C. A. y Rinehart, K. L. Jr. (1976). Spectinabilin, un nuevo metabolito que contiene nitro aislado de *streptomyces spectabilis*. *Tetrahedron* 32, 217–222.
- Kaur, T., Kaur, A., Sharma, V. y Manhas, R. K. (2016). Purificación y caracterización de un nuevo compuesto antifúngico 10- (2,2-dimetil-ciclohexil)-6,9-dihidroxi-4,9-dimetil-dec-2-enoico Éter metílico de *Streptomyces hydrogenans* Strain DH16. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Kim, K. R., Kim, T. J. y Suh, J. W. (2008). El grupo de genes para la biosíntesis de espectinomicina y la función de resistencia a aminoglucósidos de spcm en *Streptomyces spectabilis*. *Curr. Microbiol* 57, 371–374.
- Kuester, E. (1959). Esquema de un estudio comparativo de criterios utilizados en la caracterización de los actinomicetos. *Boletín Internacional de Nomenclatura y Taxonomía Bacteriológica*. 9: 97-104.
- Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M. y col. (2016). Selección de *Streptomyces* contra patógenos fúngicos transmitidos por el suelo mediante un ensayo de cultivo dual estandarizado y evaluación de sus efectos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. *BMC Microbiol* 16, 272.
- Lyu, A., Liu, H., Che, H., Yang, L., Zhang, J., Wu, M., y col. (2017) Las reveromicinas A y B de *Streptomyces* sp. 3–10: actividad antifúngica contra hongos patógenos de plantas *in vitro* y en un sistema modelo de alimento de fresa. *Frente. Microbiol* . 8: 550.
- Moënné-Loccoz, Y., Mavingui, P., Combes, C., Normand, P. (2014). Microorganisms and biotic interactions. In: Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, editors. *Environmental microbiology: fundamentals and applications*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 395–444.
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Kim, Y. H., Moon, J. H. y Kim, K. Y. (2015). Antagonismo de metabolitos antifúngicos de *Streptomyces griseus* H7602 contra *Phytophthora capsici*. *J. Básico. Microbiol*. 55, 45-53.
- Palaniyandi, S., Yang, S. y Suh, J. W. (2013). las proteasas extracelulares de *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhiben la adhesión de esporas, la germinación y la formación de *apresorio en los coccodes* de *Colletotrichum*. *J Appl Microbiol*, 115: 207-217.

- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F. M. (2011). Detección de posibles agentes de control biológico bacteriano contra patógenos de plantas fúngicas transmitidas por el suelo. *Suelo vegetal*. 340: 505–20.
- Pridham, T. G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hasseltine, C. W., Benedict, R. G. (1957). Una selección de medios para el mantenimiento y el estudio taxonómico de *Streptomyces*. *Antibiótico Annu.* 947 – 953.
- Ser, H. L., Tan, L. T. H., Palanisamy, U. D., Abd-Malek, S. N., Yin, W. F., Chan, K. G., et al. (2016) *Streptomyces antioxidans* sp. nov., una nueva actinobacteria del suelo de manglar con potencial antioxidante y neuroprotector. *Frente. Microbiol.* 7: 899.
- Serrano, L., Flores, C., Patiño, M., Ortiz, M., Albiter, V., Caro, M., Allende, R., Carrillo, A., Galindo E. (2003). “Desarrollo de bioprocesos para la producción de agentes de control biológico: experiencias de escalamiento y pruebas de campo”, Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, Jalisco.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H. y Sa, T. (2010) Aislamiento, caracterización y uso para la promoción del crecimiento de plantas bajo estrés salino, de bacterias halotolerantes productoras de desaminasas ACC derivadas del suelo costero. *J Microbiol Biotechnol.* 20.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* como el mejor amigo de una planta. *FEMS Microbiología Ecología.* 92. 119.
- Wei, Z., Xu, C., Wang, J., Lu, F., Bie, X., Lu, Z. (2017). Identificación y caracterización de *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 como un nuevo productor de actinomicina D y holomicina. *Peer J* 5: e3601.

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETOS CONTRA BACTERIAS FITOPATOGENAS *in vitro*

2.1. RESUMEN

El aumento de bacterias resistentes a los compuestos activos disponibles en el mercado se ha generalizado cada vez más en las últimas décadas. La naturaleza es el principal reservorio de moléculas biológicamente activas, siendo la fuente auspiciosa más consistente de mayor diversidad química y estructural. Los principales productores de los metabolitos secundarios son los microbios, siendo la fuente de nuevos metabolitos secundarios con una gama de actividades biológicas. En este capítulo se evaluó la capacidad de diez extractos bioactivos provenientes de actinomicetos para inhibir el crecimiento de cuatro bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* y *Dickeya dadantii*), a través de un ensayo en doble placa agar. Para la obtención de los extractos, se realizaron tres fermentaciones: líquida, semisólida y sólida, adicionando 2 mL de inóculo semilla e incubándose estáticamente a 28°C, en oscuridad, durante 12 días. El extracto se obtuvo añadiendo tampón fosfato a pH 8.0 a las fermentaciones y manteniendo en agitación durante una hora a 200 rpm a 4°C durante 16 h, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min y por último se filtró a través de una malla de 0.22 µm. Al evaluar el diámetro de inhibición, el análisis mostró diferencias significativas (P=0.00), encontrando inhibición en crecimiento de las diferentes cepas de bacterias fitopatógenas en estudio: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya dadantii* y *Xanthomonas vesicatoria* únicamente bajo fermentación sólida. El extracto de la cepa ED65 presentó un diámetro de inhibición mayor o igual al generado por el antibiótico “sulfato de gentamicina” en tres bacterias fitopatógenas. El hecho de que algunos extractos bioactivos obtuvieran inhibición igual o mayor al efecto de antibiótico es fundamental en la búsqueda de nuevas alternativas de manejo.

2.2. ABSTRACT

The increase in bacteria resistant to the active compounds available in the market has become increasingly widespread in recent decades. Nature is the main reservoir of biologically active molecules, being the most consistent auspicious source of greater chemical and structural diversity. The main producers of secondary metabolites are microbes, being the source of new secondary metabolites with a range of biological activities. In this chapter, the ability of ten bioactive extracts from actinomycetes to inhibit the growth of

four phytopathogenic bacteria (*Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* and *Dickeya dadantii*) was evaluated through a double agar plate assay. To obtain the extracts, three fermentations were carried out: liquid, semi-solid and solid, adding 2 mL of seed inoculum and incubating statically at 28°C, in the dark, for 12 days. The extract was obtained by adding phosphate buffer at pH 8.0 to the fermentations and keeping under stirring for one hour at 200 rpm at 4°C for 16 h, then centrifuged at 13000 rpm for 30 min and finally filtered through a mesh 0.22 µm. When evaluating the diameter of inhibition, the analysis showed significant differences (P = 0.00), finding growth inhibition of the different strains of phytopathogenic bacteria under study: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya dadantii* and *Xanthomonas vesicatoria* only under solid fermentation. The extract of strain ED65 had a diameter of inhibition greater than or equal to that generated by the antibiotic "gentamicin sulfate" in three phytopathogenic bacteria. The fact that some bioactive extracts obtained inhibition equal to or greater than the antibiotic effect is fundamental in the search for new management alternatives.

2.3. INTRODUCCIÓN

La naturaleza es el principal reservorio de moléculas biológicamente activas (Girao *et al.*, 2019). Siendo la fuente auspiciosa más consistente de mayor diversidad química y estructural (Singh, 2012). Los principales productores de los metabolitos secundarios son los microbios, siendo la fuente de nuevos metabolitos secundarios con una gama de actividades biológicas (Dharmaraj, 2010; Manivasagan *et al.*, 2014; Hassan y Shaikh, 2017).

Los actinomicetos son un importante recurso microbiano y están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Sharma *et al.*, 2014). Entre los compuestos activos identificados a partir de fuentes microbianas, aproximadamente dos tercios son producidos por actinomicetos, incluida la validamicina (Yu *et al.*, 2005), la kasugamicina (Ikeno *et al.*, 2002) y la qingfengmicina (Wu *et al.*, 1994), que se utilizan comúnmente en la agricultura (Bérdy, 2005). La exploración y la utilización de productos con actividad antibacteriana de actinomicetos son importantes para el biocontrol de las enfermedades de las plantas (Ni *et al.*, 2019). El aumento de bacterias resistentes a los compuestos activos disponibles en el mercado se ha generalizado cada vez más en las últimas décadas (Jones, 2008), por tanto, se requiere de nuevos productos que cubran diferentes necesidades.

Por otro lado, los procesos metabólicos de los microorganismos están influenciados en gran medida por el cambio de temperatura, pH, sustrato, contenido de humedad, suministro de

aire, concentración de inóculo, etc. Estas condiciones varían ampliamente de una especie a otra para cada organismo. Por lo tanto, es muy importante conocer las condiciones ambientales de los microorganismos para una producción máxima (Machado *et al.*, 2013). La producción de compuestos activos a partir de microbios se ha llevado a cabo utilizando tecnologías de fermentación en estado sólido y sumergido, donde una ofrece ventajas y desventajas sobre la otra (Pandey *et al.*, 2000).

En este capítulo se evaluó la producción y actividad antimicrobiana de los extractos bioactivos provenientes de las cepas EZMW12, EZ50, EZ71, ED48, ED63, ED64, ED65, ED66 y ED67, bajo tres fermentaciones distintas (líquida, semisólida y sólida), bajo condiciones *in vitro*.

2.4. HIPOTESIS

Los extractos provenientes de cepas de actinomicetos con actividad bactericida fermentados en distintas condiciones, tienen la capacidad de generar metabolitos que inhiben el crecimiento de bacterias fitopatógenas.

2.5. OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana y producción de compuestos activos de las distintas fermentaciones *in vitro*.
- Determinar el diámetro de inhibición del crecimiento de bacterias fitopatógenas mediante extractos bioactivos provenientes de actinomicetos *in vitro*.
- Determinar la susceptibilidad de las diferentes bacterias fitopatógenas al extracto bioactivo *in vitro*.

2.6. MATERIALES Y METODOS

Estos experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

2.6.1. Actinomicetos

Los actinomicetos provenían de colecciones de actinobacterias del laboratorio de Fitopatología del CIATEJ que fueron aisladas de suelos del estado de Michoacán y Zacatecas. Se utilizaron las cepas de actinomicetos que presentaron inhibición contra bacterias fitopatógenas, de acuerdo con el experimento del capítulo anterior. Las cepas

seleccionadas fueron: EZMW12, EZ50, EZ71, ED48, ED63, ED64, ED65, ED66 y ED67, además se utilizó una cepa (BZMW18) que no presentó actividad contra las bacterias evaluadas en el capítulo anterior, fungiendo como posible control negativo. Estas colecciones pertenecen a el Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

2.6.2. Bacterias fitopatógenas

Se evaluaron las siguientes bacterias fitopatógenas:

- *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (cepa 1448A)
- *Erwinia amylovora* (cepa RITA)
- *Dickeya dadantii* (cepa 3937)
- *Xanthomonas vesicatoria* (cepa BV801)

Las cepas evaluadas fueron proporcionadas por el laboratorio Fitopatología del CIATEJ.

2.6.3. Medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la reactivación de los actinomicetos fueron el medio PDA-Y (39 g L⁻¹ de agar papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7; ISP2 (Pridham *et al.*, 1956-1957) a pH 7.3; y ISP3 (Küster, 1959a). El medio de cultivo utilizado para obtener el inóculo semilla fue PDB (24 g L⁻¹ de caldo papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7.

2.6.4. Sustrato

Se utilizaron cubos (1,0 cm³) de fibra (parte verde) de nylon (Scotch Brite®) como soporte inerte. Se trataron previamente con agua en ebullición durante 10 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada (Linko, 1991), posteriormente se secaron en horno a 30 °C. Como soporte natural se utilizó sémola comercial de trigo.

2.6.5. Preparación del inóculo semilla

Los actinomicetos seleccionados se cultivaron en medio PDA-Y, ISP2 o ISP3, durante siete días a 28°C en oscuridad en incubadora, posteriormente se transfirieron dos discos de micelio de siete milímetros de diámetro a matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de medio de cultivo (PDB-Y, ISP2 o ISP3), el cual estuvo en función de su medio de aislamiento, se taparon con algodón. Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm y 28° C durante cinco días. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 10

minutos; los sedimentos resultantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril.

2.6.6. Fermentación sólida

Se realizó de acuerdo a la metodología de Ellaiah *et al.* (2004), en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 10 g de sémola humedecida con 12 mL de PDB a pH 7, para producir un nivel de humedad del 70%. Los matraces se esterilizaron en autoclave (esterilizada a 120 °C a una presión interna de 103 kPa durante 20 min) durante 30 minutos. Después de enfriar los matraces a temperatura ambiente, se añadieron 2 mL de inóculo (equivalente a 1.2-5.6 mg p / p de masa celular seca). Los matraces se incubaron a 28°C durante 12 días. Al final de la fermentación, el extracto bioactivo se obtuvo añadiendo 50 mL de tampón fosfato (8.06 g de NaCl L⁻¹, 0.22 g de KCl L⁻¹, 1.15 g de Na₂HPO₄ L⁻¹, 0.2 g de KH₂HPO₄ L⁻¹) a pH 8.0 en cada matraz Erlenmeyer (Adinarayana *et al.*, 2003) para obtener el líquido retenido por el soporte. Luego, los matraces se mantuvieron en un agitador orbital a 200 rpm durante 1 h, posteriormente se mantuvieron 16 horas a 4°C, luego el contenido de cada matraz se centrifugó (13000 rpm, 20 min) en dos ocasiones y finalmente se filtró con membrana de 0,22 µm (MILLEX®GP).

2.6.7. Fermentación semisólida

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la metodología de Machado *et al.* (2013). En matraces Erlenmeyer de 250 mL tapados con algodón que contenían 2 g de cubos de esponja de nailon, 25 mL de medio de cultivo PDB a pH 7 y 2 mL de inóculo. Los matraces se incubaron a 28°C y oscuridad durante 12 días. El extracto bioactivo se obtuvo añadiendo 5 mL de tampón fosfato (pH 8,0) en cada matraz Erlenmeyer (Adinarayana *et al.*, 2003) para obtener el líquido retenido por el soporte. Luego, los matraces se mantuvieron en un agitador orbital a 200 rpm durante 1 h, posteriormente se mantuvieron 16 horas a 4°C, y luego el contenido de cada matraz se centrifugó (13000 rpm, 20 min) dos veces y se filtró con membrana de 0,22 µm (MILLEX®GP).

2.6.8. Fermentación líquida

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL tapados con algodón que contenían 25 mL de medio de cultivo PDB a pH 7 y 2 ml de inóculo. Los matraces se incubaron a 28°C, durante 12 días en agitación constante a 200 rpm. El extracto bioactivo contenido en cada matraz se obtuvo centrifugando a 13000 rpm, durante 20 min y se filtró con membrana de 0,22 µm (MILLEX®GP).

2.6.9. Montaje del ensayo de confrontación dual

El filtrado se utilizó para realizar las pruebas de actividad biológica mediante el método de difusión en agar (prueba de Kirby-Bauer, 1996). En cajas Petri con medio Luria Bertani (LB), se vertió 4 mL de medio suave LB o NYGA a 48° C con 400 µL de bacteria ajustada a 1×10^7 UFC mL⁻¹, una vez que este solidificó, se colocó una gota de 10 µL de extracto obtenido de cada fermentación en estudio, así como de ambos controles en la caja Petri bajo la siguiente distribución (**Figura 6**).

Después de 48 horas se procedió a medir el diámetro de inhibición (mm).

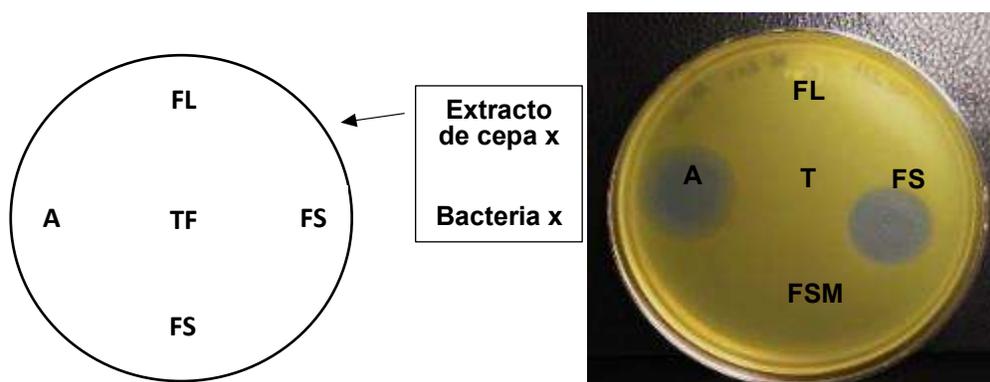


Figura 6. Distribución de los tratamientos. A: Antibiótico; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida; TF: Tampón de Fosfato.

2.6.10. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial en donde se evaluaron el factor actinomiceto con 10 niveles (EZMW12, EZ50, EZ71, ED48, ED63, ED64, ED65, ED66, ED67 y BZMW18) y el factor fermentación con tres niveles: fermentación líquida (FL), fermentación semisólida (FSM) y fermentación sólida (FS) generándose 30 tratamientos, más un control negativo (tampón fosfato) y un control positivo (Sulfato de gentamicina), utilizando la dosis mínima inhibitoria de 1.5 mg mL⁻¹ de acuerdo con la CLSI (2012), quedando finalmente 32 tratamientos con cuatro repeticiones. El arreglo experimental fue completamente al azar. El experimento se realizó de manera independiente para cada una de las cuatro bacterias fitopatógenas en estudio.

2.6.11. Análisis estadístico

A los datos se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, estos se realizaron en el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II.

2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el diámetro de inhibición, el análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P=0.00$), encontrando inhibición en crecimiento de las diferentes cepas de bacterias fitopatógenas en estudio: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya dadantii* y *Xanthomonas vesicatoria* (**Figura 7**), sin embargo, esta inhibición sólo se presentó en fermentación sólida. Una posible causa de esto es debido a que el actinomiceto completo su ciclo de vida y, por tanto, fue capaz de producir compuestos bioactivos. Los actinomicetos tienen un ciclo de vida que abarca tres etapas de crecimiento: producción hifas vegetativas, hifas aéreas y esporas (Elliot *et al.*, 2008), además de un modo de crecimiento denominado "exploración" (Jones *et al.*, 2017). La producción de compuestos activos está correlacionada con la etapa de esporulación la cual requiere de ciertas condiciones para activarse (Jones y Elliot, 2017). Debido a que la producción de metabolitos secundarios es un proceso influenciado por varios factores físico-químicos que incluyen el suministro de nutrientes, la oxigenación, la temperatura y el pH (Olano *et al.*, 2008).

Ellaiah *et al.* (2004) mostraron que la fermentación sólida (FS) condujo a una mayor producción de neomicina que bajo fermentación líquida o sumergida (FL) mediante una cepa de *Streptomyces marinensis*. Castilho *et al.* (2000) encontraron que la producción de lipasa por *Penicillium restrictum* resultó económicamente más ventajosa en FS que en FL. Más recientemente, Osma *et al.* (2011) han demostrado que el costo de producir la enzima lacasa por el hongo de podredumbre blanca *Trametes pubescens* fue 50 veces menor en condiciones de fermentación en estado semisólido (FSM) que en FL.

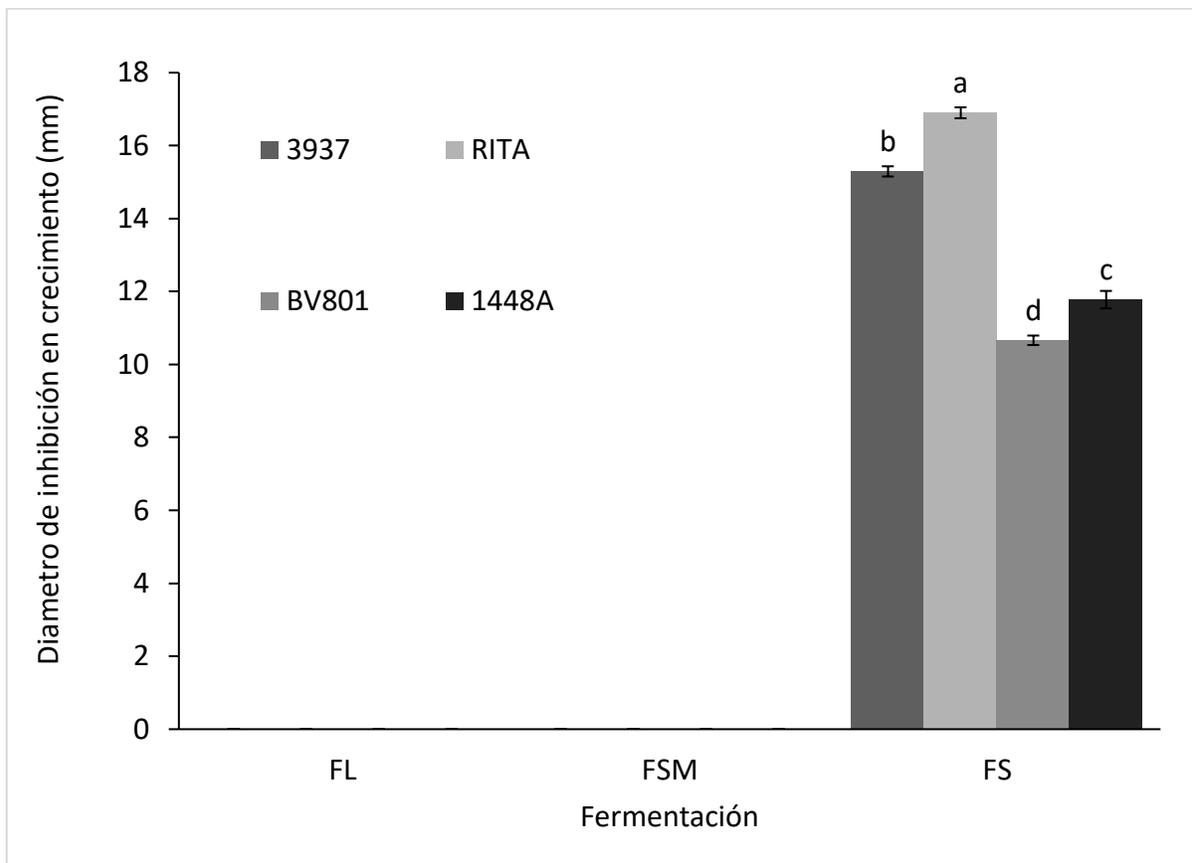


Figura 7. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *D. dadantii* (3937), *E. amylovora* (RITA), *X. vesicatoria* (BV801) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A), por los extractos obtenidos de actinomicetos bajo tres tipos de fermentación. FL: Fermentación líquida. FSM: Fermentación semisólida. FS: Fermentación sólida. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

De los extractos de actinomicetos obtenidos bajo fermentación sólida, los provenientes de las cepas ED64 y ED65 presentaron un diámetro (18.375 y 18.075 mm) de inhibición mayor o igual al generado por el antibiótico “sulfato de gentamicina” (17.965 mm) en la bacteria *Erwinia amylovora*, situación similar se presentó con *Dickeya dadantii* y *Xanthomonas vesicatoria* (**Figura 8**). El hecho de que algunos extractos bioactivos presentaran inhibición igual o mayor al efecto de antibiótico, es fundamental en la búsqueda de nuevas alternativas de manejo.

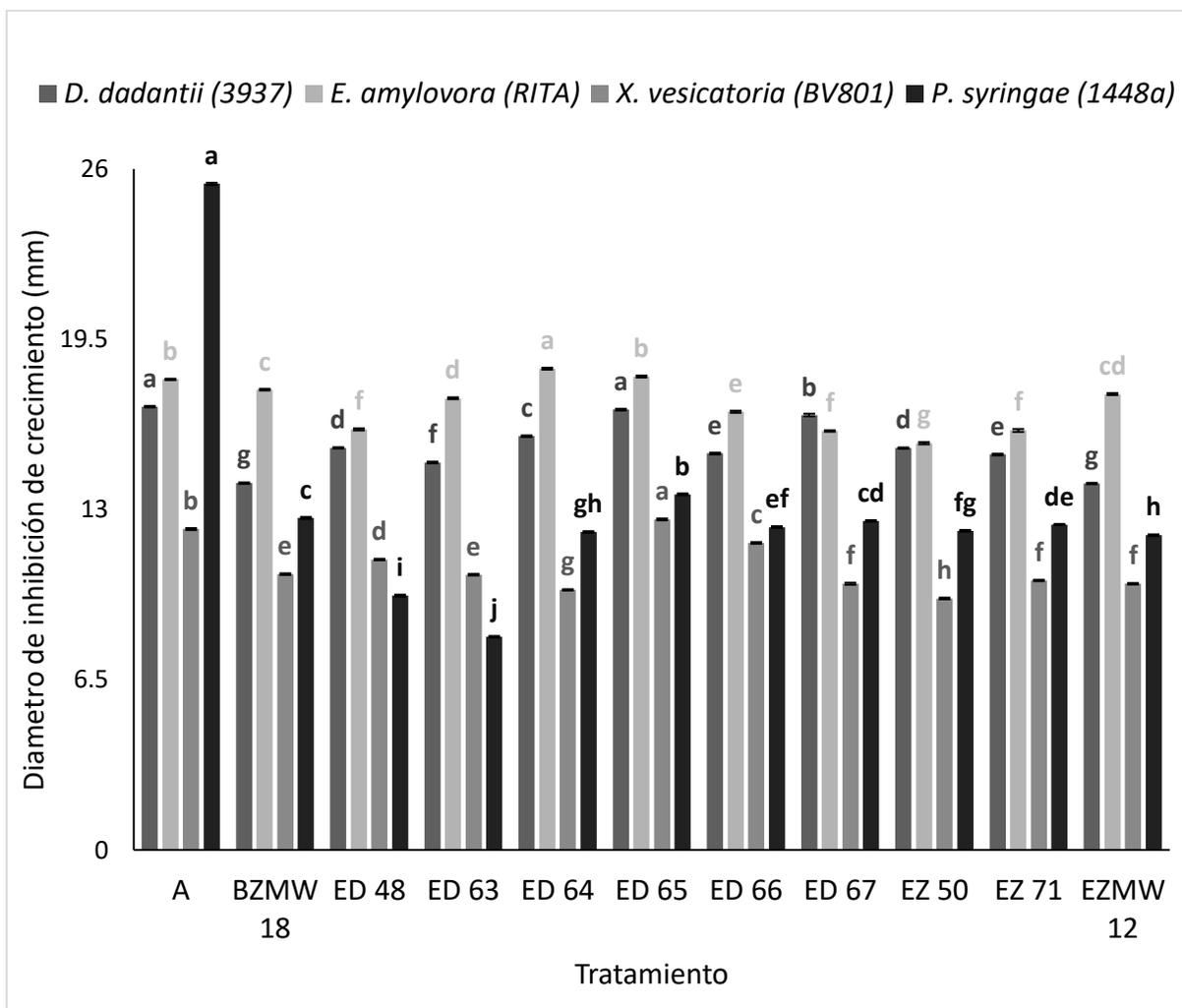


Figura 8. Inhibición generada por los extractos de fermentación sólida en el crecimiento de *D. dadantii* (3937), *E. amylovora* (RITA), *X. vesicatoria* (BV801) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (1448A). A: Antibiótico. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$) para el mismo color de columna. I= Error estándar.

Cada uno de los extractos bioactivos, así como el antibiótico generaron un diferente grado de inhibición respecto a la bacteria fitopatogena (**Figura 9-14**) Las cepas de actinomicetos mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias fitopatogenas, mostrando diferencias dependiendo de la bacteria y la cepa utilizada, debido a que los actinomicetos usan diferentes mecanismos antagonistas y producen diferentes moléculas bioactivas involucradas en el antagonismo contra diferentes patógenos (Kunova *et al.*, 2016).

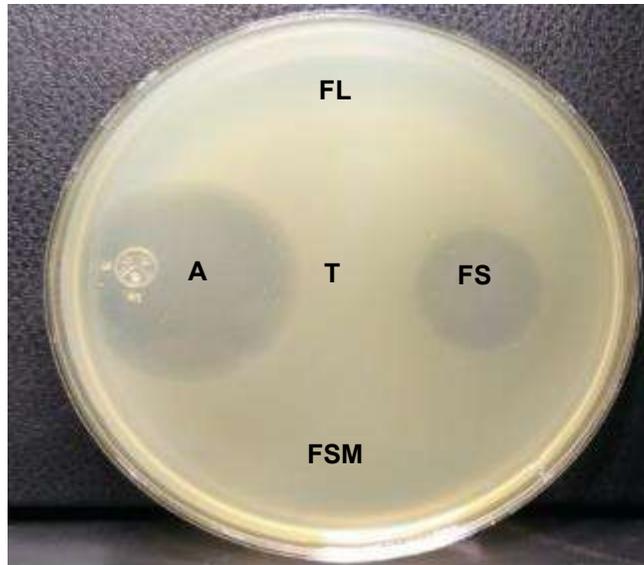


Figura 9. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.

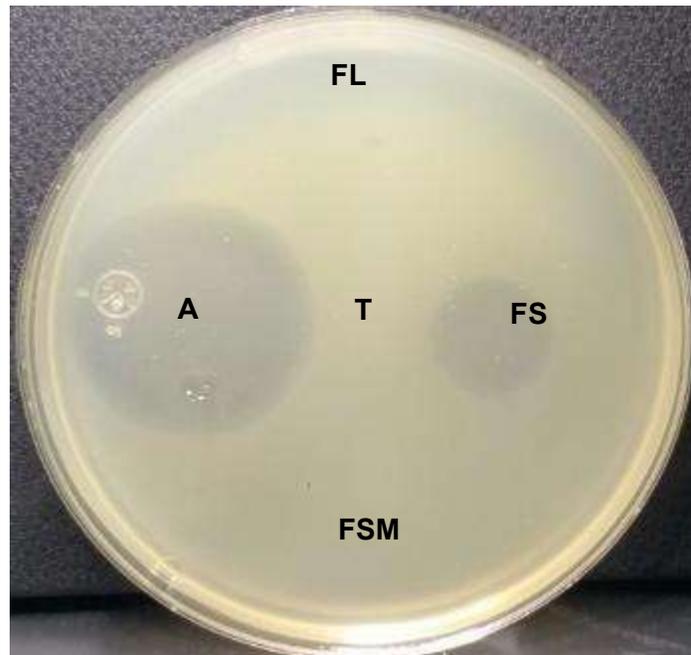


Figura 10. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.

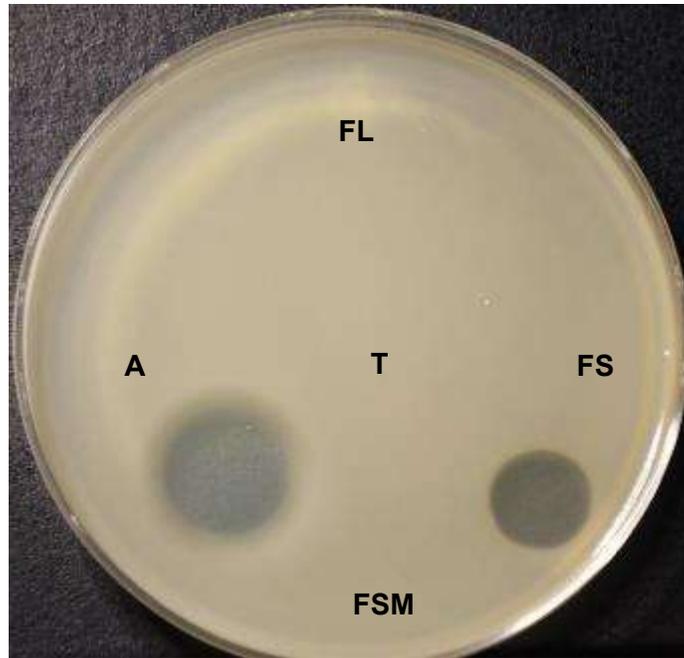


Figura 11. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa 3937 de *Dickeya dadantii*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.

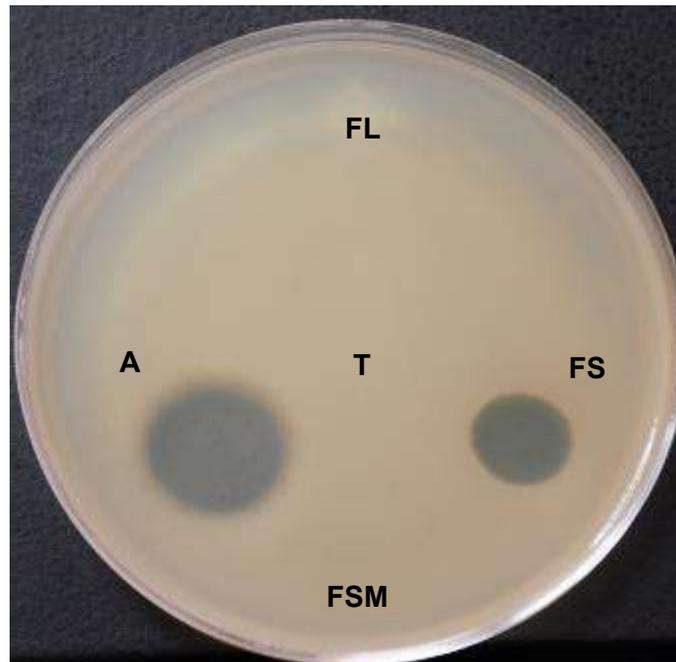


Figura 12. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa 3937 de *Dickeya dadantii*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida.

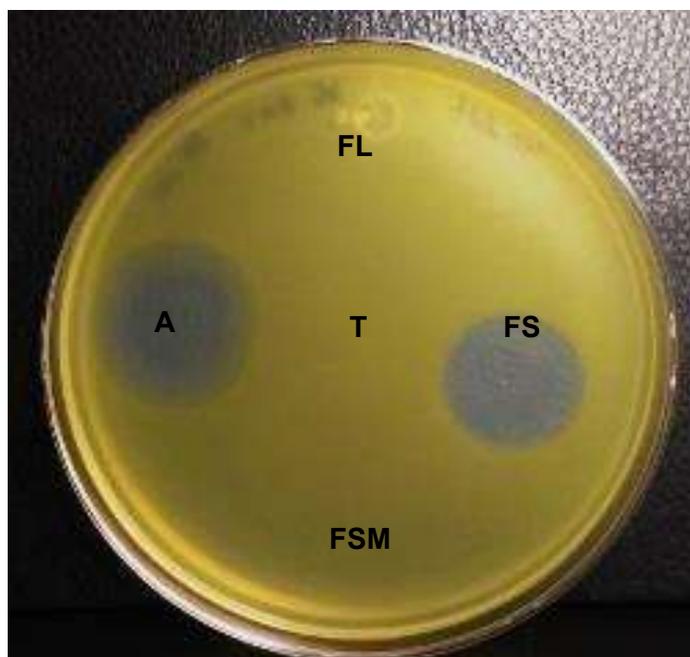


Figura 13. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED65 sobre el crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida

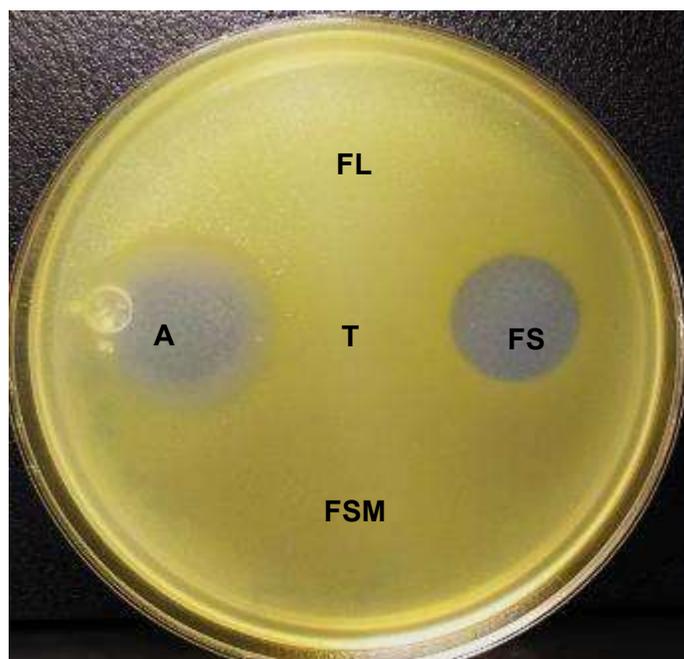


Figura 14. Actividad inhibitoria de los extractos bioactivos del actinomiceto ED66 sobre el crecimiento de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*. A: Antibiótico; T: Tampón Fosfato; FL: Fermentación líquida; FSM: Fermentación semisólida; FS: Fermentación sólida

2.8. CONCLUSIÓN

Solo los extractos provenientes de una fermentación solida lograron inhibir el crecimiento de las cuatro especies de bacterias fitopatógenas, encontrándose mayor inhibición de la bacteria *E. amylovora*. Cada extracto obtenido de fermentación solida generó distinto diámetro de inhibición, sin embargo, el proveniente de la ED65 presentó valores de inhibición superiores o similares a los obtenidos por el antibiótico (sulfato de gentamicina). Estos extractos podrían ser aplicados como agentes de control bilógico, en experimentos posteriores bajo condiciones *in planta*.

2.9. BIBLIOGRAFÍA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Bhavani, D. R., Adinarayana, G. (2003). Enfoque metodológico de superficie de respuesta para optimizar los parámetros nutricionales para la producción de neomicina por *Streptomyces marinensis* bajo fermentación en estado sólido *Process Biochemistry*. 38: 1565 – 1572.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*. 58(1):1-26.
- Castilho, L. R., Polato, C. M. S., Baruque, E. A., Sant’Anna, G. L., Freire, D. M. G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4, 239–247.
- Dharmaraj, S. (2010). *Streptomyces* marino como una nueva fuente de sustancias bioactivas. *Mundo J. Microbiol. Biotecnología*. 26: 2123–2139.
- Elliot, M. A., Buttner, M. J. and Nodwell, J. R. (2008). Multicellular development of *Streptomyces*. *Myxobacteria: multicellularity and differentiation*. 419–438.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2004). Estudios de optimización sobre la producción de neomicina por una cepa mutante de *Streptomyces marinensis* en fermentación en estado sólido. *Process Biochemistry*. 39: 529 – 534.
- Girão, M., Ribeiro, I., Ribeiro, T., Azevedo, I. C., Pereira, F., Urbatzka, R., Leão, P. N., Carvalho, M. F. (2019). Actinobacteria Isolated From *Laminaria ochroleuca*: A Source of New Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 10: 683.
- Hassan, S. S. y Shaikh, A. L. (2017). Actinobacterias marinas como una casa del tesoro de drogas. *Biomed. Farmacista*. 87: 46–57.

- Ikeno, S., Aoki, D., Sato, K., et al. (2002). KasT gene of *Streptomyces kasugaensis* M338M1 encodes a DNA-binding protein which binds to intergenic region of kasU-kasJ in the kasugamycin biosynthesis gene cluster. *J Antibiot.* 55(12):1053-1062.
- Jones, R. J. (2008). Consideraciones clave en el tratamiento de infecciones estafilocócicas complicadas. *Clin Microbiol Infect.* 14: 3-9.
- Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R., Elliot, M. A. (2017), *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *eLife.* 6: 1-21.
- Jones, S. E., y Elliot, M. A. (2017). *Streptomyces* exploration: competition, volatile communication and new bacterial behaviours. *Trends Microbiol.* 25: 1-10.
- Kirby-Bauer, A. (1996). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana por método de difusión en agar. *J Clin Pathol.* 44: 493.
- Kuester, E. (1959). Esquema de un estudio comparativo de criterios utilizados en la caracterización de los actinomicetos. *Boletín Internacional de Nomenclatura y Taxonomía Bacteriológica.* 9: 97-104.
- Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M. y col. (2016). Selección de *Streptomyces* contra patógenos fúngicos transmitidos por el suelo mediante un ensayo de cultivo dual estandarizado y evaluación de sus efectos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas. *BMC Microbiol* 16, 272.
- Linko, S. (1991). Producción de lignina peroxidasa por *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado. Doctor en Filosofía. Tesis, Universidad Tecnológica de Helsinki, Espoo, Finlandia.
- Machado, I., Teixeira, J. A., Rodríguez-Couto, S. (2013). Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. *Journal of Biotechnology.* 165: 195-200.
- Manivasagan, P., Kang, K. H., Sivakumar, K., Li-Chan, E. C., Oh, H. M., y Kim, S. K. (2014) Actinobacterias marinas: una fuente importante de productos naturales bioactivos. *Reinar. Toxicol Pharmacol.* 38: 172-188.
- Ni, M., Wu, Q., Wang, H. L., et al. (2019). Identification of a novel strain, *Streptomyces blastmyceticus* JZB130180, and evaluation of its biocontrol efficacy against *Monilinia fructicola*. *J Zhejiang Univ Sci B.* 20(1):84–94.

- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J. A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 10: 281-292.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., Rodríguez-Couto, S. (2011). Cost analysis in laccase production. *Journal of Environmental Management* 92, 2907–2912.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. A., (2000). New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153–1169.
- Pridham, T. G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hasseltine, C. W., Benedict, R. G. (1957). Una selección de medios para el mantenimiento y el estudio taxonómico de *Streptomyces*. *Antibiótico Annu.* 947 – 953.
- Sharma, M., Dangi, P., Choudhary, M., (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2):801-832.
- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., Jawed, A., Tripathi, C. K. (2016). Aislamiento, detección e identificación de nuevos aislamientos de actinomicetos de la India para aplicaciones antimicrobianas. *Frente Microbiol.* 7: 1921.
- Wu, H. M., Tao, X. L., Lao, X. F., et al. (1994). The structure of Qingjingmycin A novel peptide-type metabolite of a hybrid strain FM3-32 derived from *Streptomyces qingfengmyceticus* and *S. hydroscopicus* var. *jinggangensis*. *Nat Prod* 94 Ni et al. / *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2019 20(1):84-94 Lett, 5(2):89-93.
- Yu, Y., Bai, L. Q., Minagawa, K., et al. (2005). Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *jinggangensis* 5008. *Appl Environ Microbiol*, 71(9):5066-5076.

SEPARACIÓN DE EXTRACTOS MEDIANTE CROMOTROGRAFIA DE PLACA FINA (TLC) Y EVALUACION BIOAUTOGRÁFICA

3.1. RESUMEN

La bioautografía directa combinada con la cromatografía en capa fina, es un método de detección rápido y sensible para la detección de compuestos antimicrobianos. El microorganismo de prueba es capaz de crecer directamente en la placa. En este capítulo se buscó encontrar un sistema de disolventes que permita separar una mayor cantidad de compuestos con propiedades antibacterianas del actinomiceto ED65 contra *X. vesicatoria*. Se utilizaron los solventes metanol, acetato de etilo, cloroformo, acetona y hexano, con el grado de pureza más alto disponible comercialmente de Sigma-Aldrich. Para la obtención del extracto se sonicaron 5 g de masa fermentativa con 10 mL de disolvente de Metanol o Acetato de etilo, durante una hora, posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recuperó y evaporó en el Vacufuge® plus a 30°C, hasta obtener el extracto seco. La cromatografía se realizó en gel de sílice en placas de aluminio de 5 x 5 cm. El extracto seco se llevó a la dilución -1, mediante el disolvente metanol o acetato de etilo. Se cargó la fase estacionaria mediante micropipeta aplicando alícuotas de 0.5 µL del extracto en los puntos de muestra hasta tener un volumen de 2.5 µL. El extracto de sémola se utilizó como control negativo. Se utilizaron sistemas de disolventes desde baja hasta alta con polaridad. La fase móvil se realizó en un vaso de vidrio, ajustando el nivel de solvente a 1 cm. La placa de TLC se incubó en la cámara con la tapa puesta hasta que el frente del solvente alcance 4/5 de la longitud de la placa, una vez alcanzada esta se retiró. La placa se observó bajo luz ultravioleta roja (365 nm) y verde (254 nm). Posteriormente se sumergió la placa en un vaso con ácido fosfomolibdico al 5%, y se calentó la placa a 150°C durante 1 min. En este estudio la TLC con bioautografía permitió identificar más de un compuesto activo, obteniendo mayor movilidad de los compuestos activos con un sistema de disolventes de polaridad media a alta, logrando con los sistemas Metanol: Agua 6: 4; Metanol: Acetona 9: 1; y Metanol: Agua: Acetona 6:2:2 separar y movilizar al menos un compuesto activo.

3.2. ABSTRACT

Direct bioautography combined with thin layer chromatography is a fast and sensitive detection method for the detection of antimicrobial compounds. The test microorganism is able to grow directly on the plaque. In this chapter we sought to find a solvent system that

allows a greater quantity of compounds with antibacterial properties of actinomycete ED65 to be separated against *X. vesicatoria*. The solvents methanol, ethyl acetate, chloroform, acetone and hexane were used, with the highest degree of purity commercially available from Sigma-Aldrich. To obtain the extract, 5 g of fermentative mass were sonicated with 10 mL of methanol or ethyl acetate solvent, for one hour, then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant was recovered and evaporated in Vacufuge® plus at 30 ° C, until the dry extract was obtained. Chromatography was performed on silica gel on 5 x 5 cm aluminum plates. The dried extract was brought to dilution -1, using the solvent methanol or ethyl acetate. The stationary phase was loaded by micropipette by applying 0.5 µL aliquots of the extract at the sample points to a volume of 2.5 µL. Semolina extract was used as a negative control. Solvent systems from low to high with polarity were used. The mobile phase was performed in a glass vessel, adjusting the solvent level to 1 cm. The TLC plate was incubated in the chamber with the lid on until the solvent front reached 4/5 of the plate length, once reached it was removed. The plate was observed under red (365 nm) and green (254 nm) ultraviolet light. Subsequently, the plate was immersed in a glass with 5% phosphomolibdic acid, and the plate was heated at 150 ° C for 1 min. In this study, the TLC with bioautography allowed to identify more than one active compound, obtaining greater mobility of the active compounds with a solvent system of medium to high polarity, achieving with the Methanol systems: Water 6: 4; Methanol: Acetone 9: 1; and Methanol: Water: Acetone 6: 2: 2 separate and mobilize at least one active compound.

3.3. INTRODUCCIÓN

La bioautografía directa combinada con la cromatografía en capa fina (TLC) es un método de detección rápido y sensible para la detección de compuestos antimicrobianos. El microorganismo de prueba es capaz de crecer directamente en la placa de TLC, por lo que cada paso del ensayo se realiza en el sorbente (Botz *et al.*, 2001).

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica analítica simple, rentable y fácil de operar, utilizada de forma rutinaria en cualquier laboratorio para la separación de compuestos bioactivos no volátiles (Cheng *et al.*, 2011), y detección de diversos compuestos en extractos de plantas, alimentos u organismos (Mohammad *et al.*, 2010; Sherma y Rabel, 2018). Logra la separación de una mezcla de compuestos sobre la base de sus diferencias de solubilidad en un sistema de dos fases.

La fase estacionaria suele ser una capa delgada y uniforme de gel de sílice (SiO_2) o polvo de alúmina (Al_2O_3) recubierta sobre una pieza de vidrio, metal o plástico rígido. Por otro lado, la fase móvil es un solvente líquido simple o mixto que sube lentamente la placa de TLC por acción capilar (Jork *et al.*, 1994).

Los puntos de TLC pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente por densitometría en absorbancia ultravioleta (UV) o modos de fluorescencia. Las muestras se aplican sobre la placa de TLC cerca de su lado inferior; entonces la placa se coloca de pie sobre un recipiente lleno con la fase móvil que comienza a elevarse por la placa. Cuando el solvente alcanza el punto de muestra, se establecen diferentes interacciones entre los componentes de la mezcla de muestra, la fase sólida y el solvente. Estas interacciones son el resultado de una amplia gama de fuerzas (enlaces de hidrógeno, pares de electrones donador-aceptor, interacciones ión-ión, ión-dipolo y van der Waals). Dependiendo de la proporción particular de afinidades tanto para la fase de disolvente (solubilidad) como para la fase estacionaria (adsorción), cada compuesto en la muestra se lleva a una altura definida en la placa. Por lo tanto, la elección de un eluyente apropiado con respecto a los compuestos mixtos a separar es una decisión clave para obtener un resultado exitoso del proceso cromatográfico (Sherma y Fried, 2003).

Cada compuesto tiene un factor de retención (R_f) que es igual a la distancia migrada sobre la distancia total cubierta por el solvente. Los valores de R_f deben estar entre 0 (para el punto que permanece en el lugar de inicio) y 1.0 (para el punto que migra con el frente de la fase móvil) (Guevara *et al.*, 2017). Varios factores pueden afectar los valores de R_f : dimensiones y tipo de cámara, naturaleza y tamaño de la capa, dirección del flujo de la fase móvil, volumen y composición de la fase móvil, condiciones de equilibrio, humedad y métodos de preparación de muestras que preceden a la TLC (Touchstone y Dobbins, 1983).

3.4. OBJETIVO

Buscar un sistema de disolventes que permita separar una mayor cantidad de compuestos con propiedades antibacterianas del actinomiceto ED65 contra *X. vesicatoria*.

3.5. MATERIALES Y MÉTODOS

Estos experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Molecular de Biotecnología Vegetal del CIATEJ, bajo la asesoría de la Dra. Cecilia Guizar González.

3.5.1. Reactivos y medio de cultivo

Se utilizaron los solventes metanol, acetato de etilo, cloroformo, acetona y hexano, con el grado de pureza más alto disponible comercialmente de Sigma-Aldrich.

La reactivación de los actinomicetos fue en medio PDA-Y (39 g L⁻¹ de agar papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7. El medio de cultivo utilizado para obtener el inóculo semilla fue PDB (24 g L⁻¹ de caldo papa dextrosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura) a pH 7.

3.5.2. Preparación del inóculo semilla de actinomiceto

El actinomiceto ED65 se cultivó en medio PDA-Y, durante siete días a 28°C en oscuridad en incubadora, posteriormente se transfirió dos discos de micelio de siete milímetros de diámetro a un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 25 mL de medio de cultivo (PDB-Y). Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm y 28° C durante cinco días. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos; los sedimentos resultantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril.

3.5.3. Fermentación sólida del actinomiceto

Se realizó de acuerdo a la metodología de Ellaiah *et al.* (2004), en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 10 g de sémola humedecida con 12 mL de PDB a pH 7, para producir un nivel de humedad del 70%. Los matraces se esterilizaron en autoclave (condición de esterilización) durante 30 minutos. Después de enfriar los matraces a temperatura ambiente, se añadieron 2 mL de inóculo. Los matraces se incubaron a 28°C durante 12 días.

3.5.4. Preparación del extracto

Se colocó 5 g de masa fermentativa del actinomiceto ED65 en un tubo falcón de 50 mL, al cual se le adiciono una alícuota de 10 mL de disolvente (Metanol o Acetato de etilo), posteriormente este se sónico durante una hora (Branson 2510®), y centrifugo a 10,000 rpm durante 10 min (Heraeus multifuge X3K®). Se recuperó el sobrenadante y se procedió a evaporar los disolventes en el concentrator plus/Vacufuge® plus a 30°C, hasta obtener el extracto seco y de color.

3.5.5. Cromatografía de placa fina

La cromatografía se realizó en gel de sílice en placas de aluminio TLC de 5 x 5 cm (Merck, Darmstadt, Alemania). El extracto seco se llevó a la dilución -1, mediante el disolvente

metanol o acetato de etilo. Mediante un lápiz se marcó una línea a 1 cm del fondo de la placa y los puntos de muestra. Los puntos de muestra están separados por 2 cm, y la distancia desde los puntos externos hasta el borde de la placa es de al menos 1.5 cm. Se cargó la fase estacionaria mediante micropipeta aplicando alícuotas de 0.5 μ L del extracto en los puntos de muestra hasta tener un volumen de 2.5 μ L. Después de agregar cada alícuota, la mancha se seca con calor. Alternativamente, la placa se deja debajo de una campana extractora para cada paso de secado. El extracto de sémola se utilizó como control negativo.

Para la fase móvil se utilizó los siguientes sistemas de disolventes par el extracto de acetato de etilo

✚ Metanol: acetona	4:6
✚ Cloroformo: acetona	7:3
✚ Cloroformo: acetona	6:4
✚ Acetona: hexano	6:4
✚ Hexano: acetona	6:4
✚ Cloroformo: metanol	9:1
✚ Cloroformo: hexano	8:2
✚ Metanol: acetona	4:6
✚ Acetona: hexano	8:2

Mientras que, para el extracto de metanol, en la fase móvil se utilizó los siguientes sistemas de disolventes:

✚ Metanol: acetona	6:4
✚ Metanol: agua	9:1
✚ Metanol: agua: acetona	6:2:2
✚ Metanol: cloroformo	7:3

Se vertió la fase móvil en un vaso de vidrio (Cámara de revelado), ajustando el nivel de solvente a 1 cm, se tapó la cámara buscando la saturación de la fase gaseosa con solvente. Posteriormente se colocó la TLC cuidadosamente en la cámara de revelado de manera que el solvente no llegue a las manchas. Óptimamente, debe haber una distancia de 0.5 cm entre el nivel del solvente y la línea del lápiz. La placa de TLC se incubó en la cámara con la tapa puesta hasta que el frente del solvente alcance 4/5 de la longitud de la placa, una vez alcanzada esta se retira.

3.5.6. Revelación y tinción

La placa se observa bajo luz ultravioleta roja (365 nm) y verde (254 nm). Antes de teñir la placa debe estar completamente seca, se revelan sumergiendo la placa en un vaso con ácido fosfomolibdico al 5%, posteriormente se calienta la placa a 150°C durante 1 min. Nota: las repeticiones que se utilizaron para la bioautografía no se revelaron con el ácido fosfomolibdico.

3.5.7. Bioautografía

Después de la cromatografía, se procedo a realizar las pruebas de actividad biológica mediante el método de difusión en agar (prueba de Kirby-Bauer, 1996). Se procedió a colocar las placas de TLC en cajas Petri con medio NYGA, donde se adicionarán 4 mL de medio suave NYGA a 48°C con 400 µL de cultivo bacteria ajustado a 1×10^7 UFC mL⁻¹, después de 48 horas se observó la inhibición.

3.6. RESULTADOS

Los sistemas de disolventes utilizados presentan baja, mediana y alta polaridad, buscando encontrar el sistema que permita la mayor movilidad de compuestos. La tinción con ácido fosfomolibdico revela con más claridad la separación de los compuestos, en comparación con la luz ultravioleta, donde en algunos sistemas no se aprecia separación.

El extracto de la cepa ED65 de actinomiceto (**Figura 15-18**), presentó compuestos de diferente polaridad, ya que en cada sistema se generó movilidad y separación, sin embargo, algunos de estos compuestos presentan el mismo RF que el control de sémola, pero existen bandas con diferente intensidad lo que nos hace pensar que el RF de una banda del control coincide con el RF de algún compuesto bioactivo del extracto. La bioautografía facilita escoger el sistema de disolventes en base a las inhibiciones generadas en doble agar. De tal manera que la TLC con bioautografía es un método rápido y económico de detección de bioactividad después de la separación usando placas TLC (Marston, 2011).

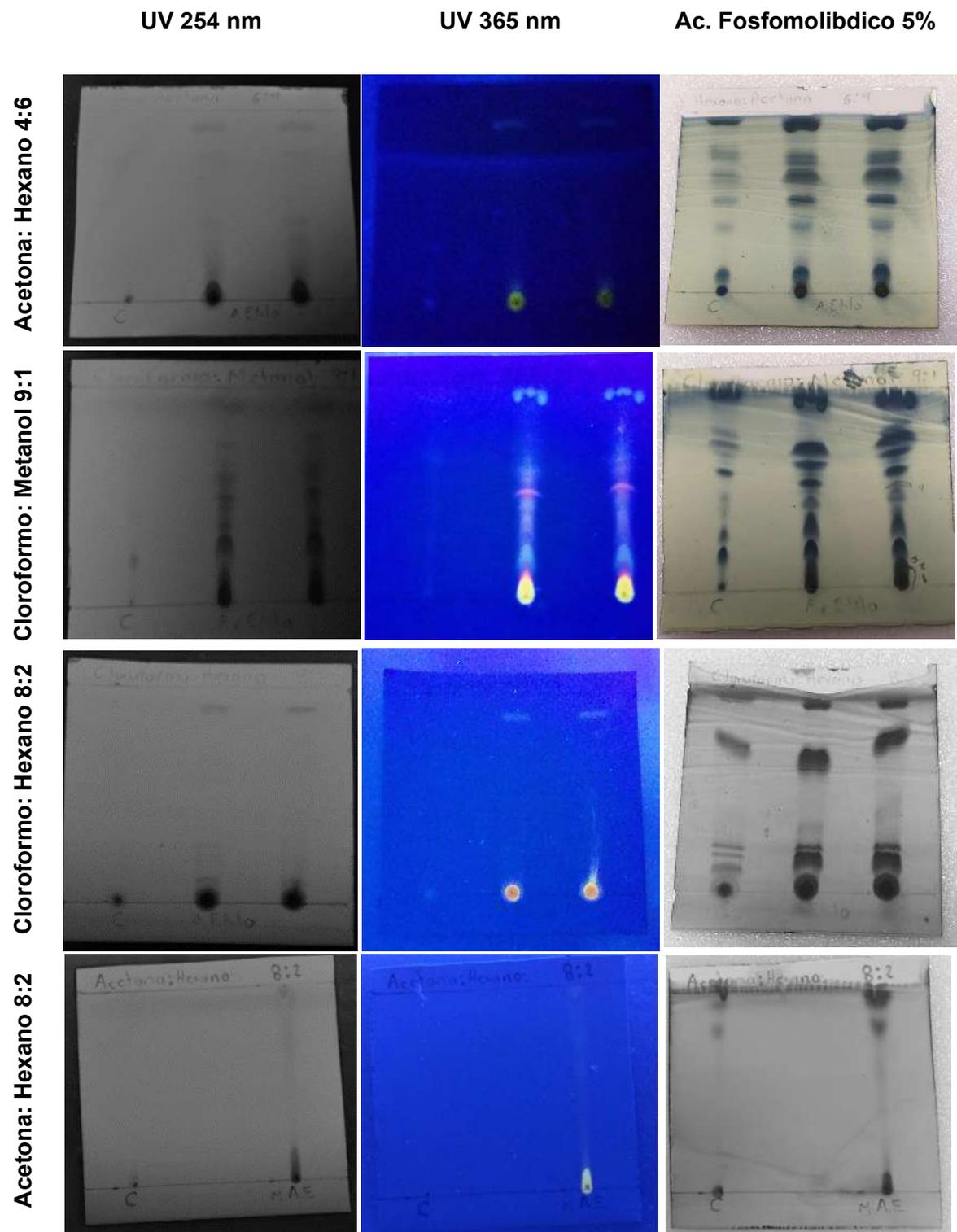


Figura 15. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).

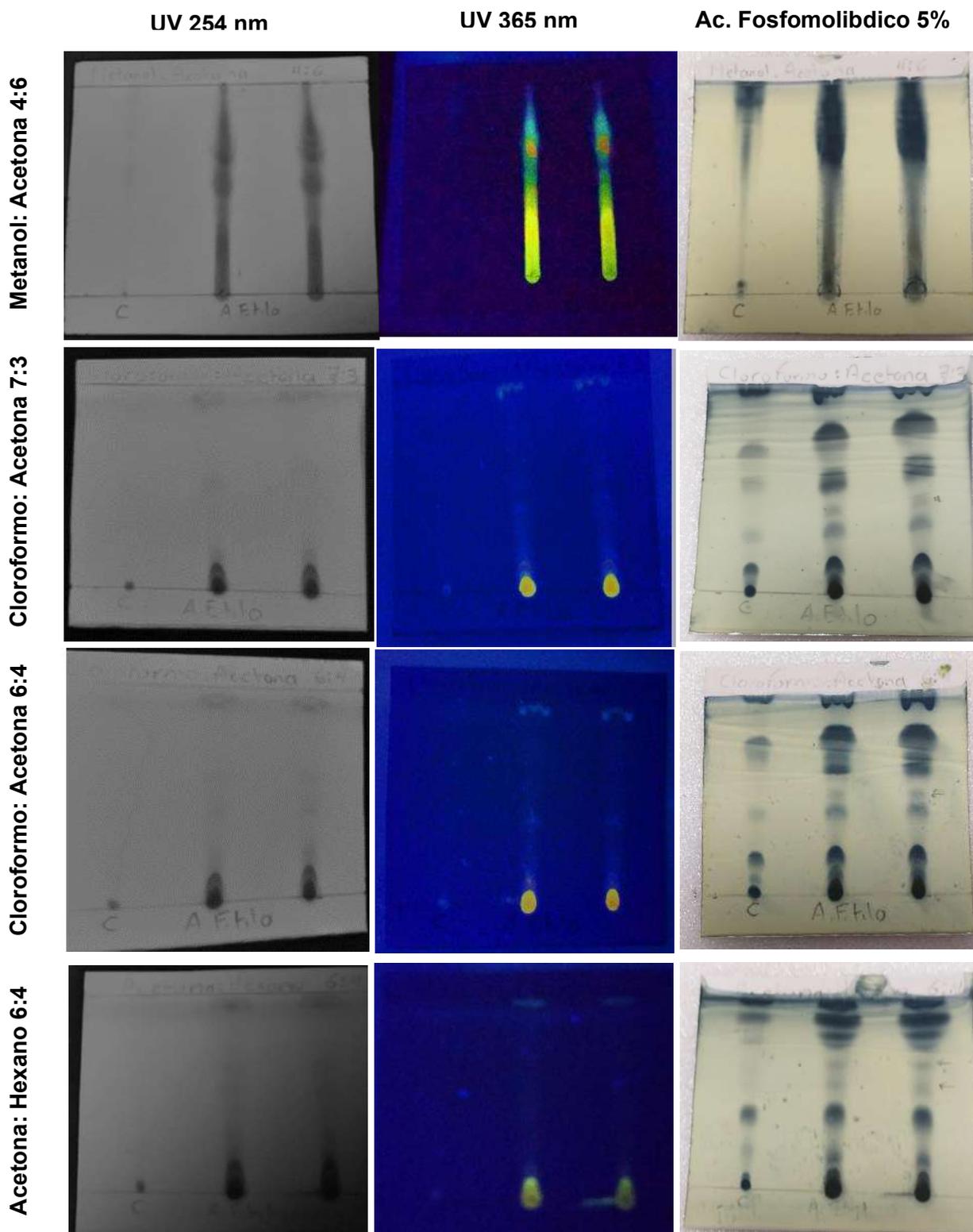


Figura 16. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).

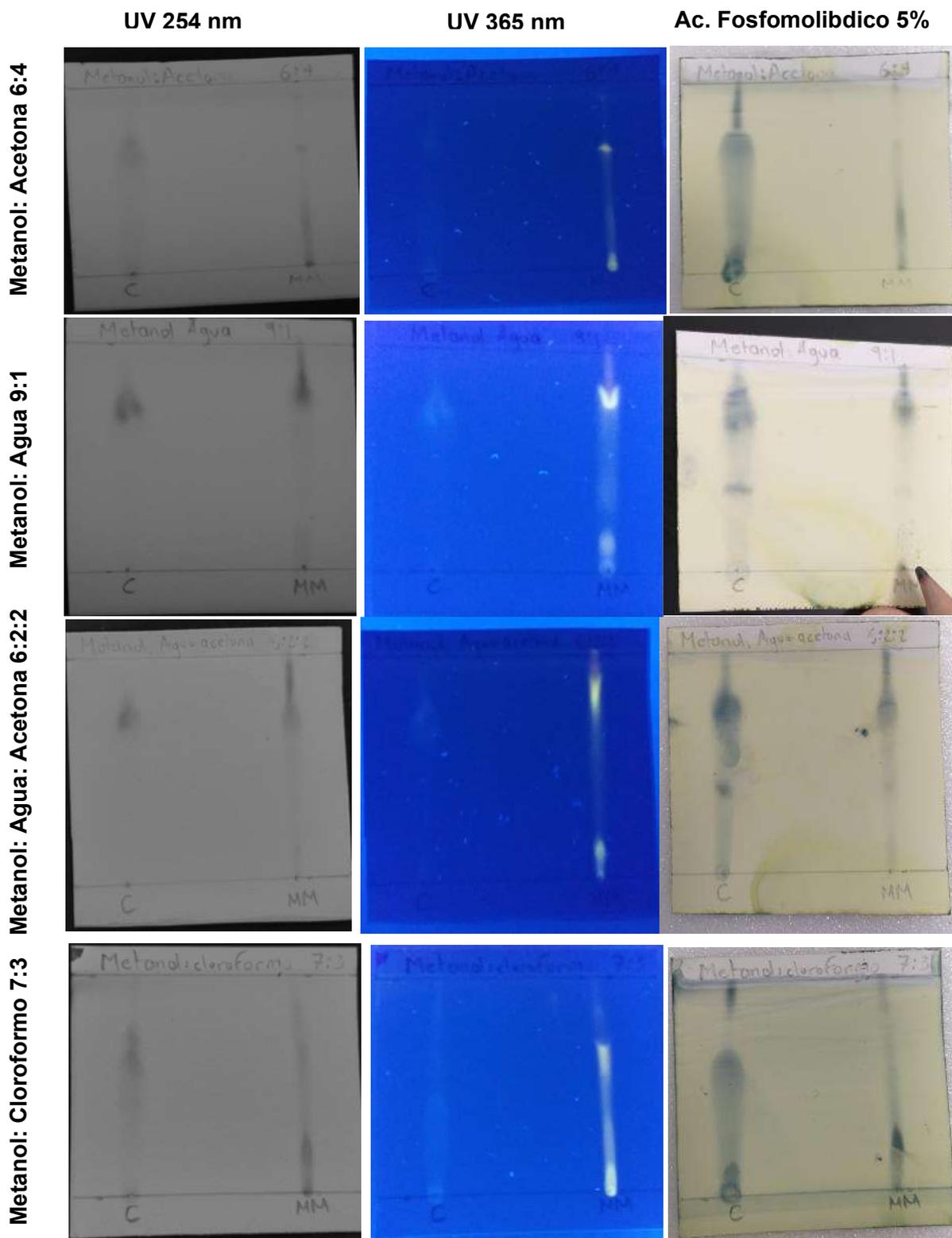
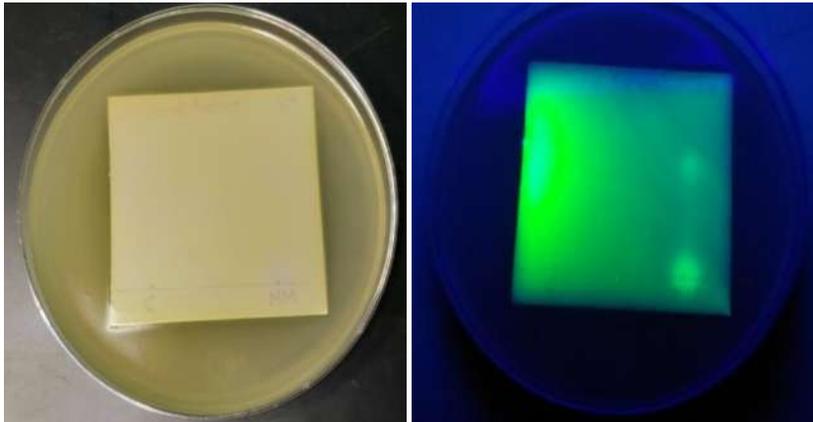
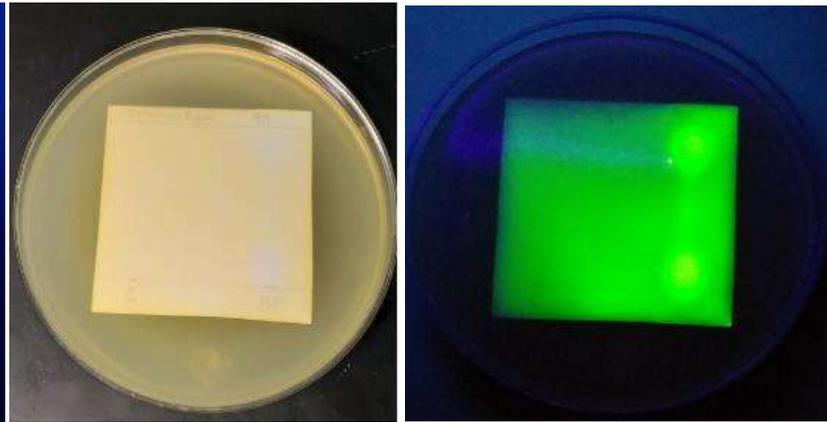


Figura 17. Separación de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de la cepa ED 65 de actinomiceto por cromatografía de placa fina (TLC).

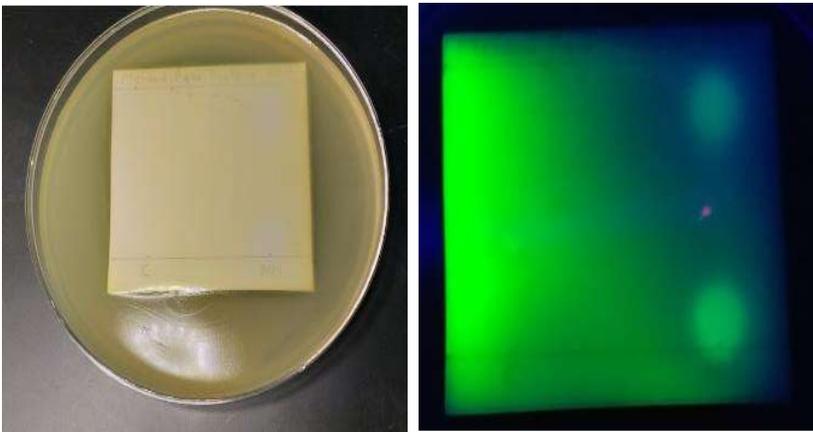
Metanol: Acetona 6:4



Metanol: Agua 9:1



Metanol: Agua: Acetona 6:2:2



Metanol: Cloroformo 7:3

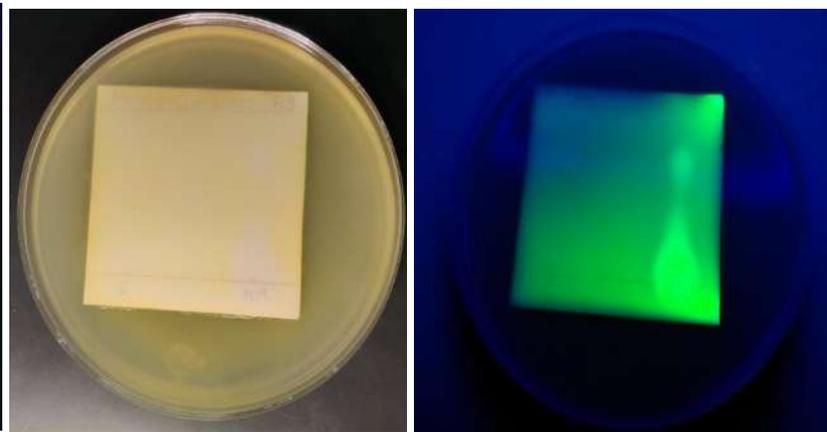


Figura 18. Bioautografía del extracto de ED65 en los sistemas de disolventes con mejor separación de compuestos activos.

3.7. CONCLUSIÓN

En este estudio la TLC con bioautografía permitió identificar más de un compuesto activo, obteniendo mayor movilidad de los compuestos activos con un sistema de disolventes de polaridad media a alta, logrando con los sistemas Metanol: Agua 6: 4; Metanol: Acetona 9: 1; y Metanol: Agua: Acetona 6:2:2, lograron separar y movilizar al menos un compuesto activo.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Botz, L., Nagy, S., Kocsis, B. (2001). Detección de compuestos microbiológicamente activos. En: Nyiredy S., editor. Cromatografía plana, una visión retrospectiva para el tercer milenio. Saltador; Budapest, Hungría. 489–516.
- Cheng, S.C., Huang, M.Z., Shiea, J. (2011). Thin layer chromatography/mass spectrometry, J. Chromatogr. 2700-2711.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2004). Estudios de optimización sobre la producción de neomicina por una cepa mutante de *Streptomyces marinensis* en fermentación en estado sólido. Process Biochemistry. 39: 529 – 534.
- Guevara, G., Perera, J., y Navarro-Llorens, J. M. (2017). Análisis de intermedios de transformaciones de esteroides en células en reposo por cromatografía de capa fina (TLC). Métodos en biología molecular, 347-360.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. (1994). Thin layer chromatography: reagents and detection methods, vol Ib. VCH, Weinheim, Germany.
- Kirby-Bauer, A. (1996). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana por método de difusión en agar. J Clin Pathol. 44: 493.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, J. Chromatogr. 2676-2683.
- Mohammad, A., Bhawani, S. A., Sharma, S. (2010). Análisis de productos herbales por cromatografía en capa fina: una revisión. En t. J. Pharma Bio Sci. 1.
- Sherma, J., Fried, B. (2003). Handbook of thin-layer chromatography. In: Cazes J (ed) Chromatographic science series, vol 89, 3rd edn. Marcel Dekker, New York.

Sherma J., Rabel, F. (2018). Una revisión de los métodos de cromatografía en capa fina para determinar la autenticidad de los alimentos y suplementos dietéticos. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 41: 645-657.

Touchstone, J. C., Dobbins, M. F. (1983). *Practice of thin layer chromatography*. John Willey & Sons, New York.

ESCALA CUALITATIVA DE SEVERIDAD DE *XANTHOMONAS VESICATORIA* EN PLANTAS DE CHILE CULTIVAR BECÁN

4.1. RESUMEN

La mancha bacteriana causada por el agente fitopatógeno *Xanthomonas vesicatoria*, representa una amenaza importante debido a que afecta la producción de diversos cultivos, entre ellos el chile; lo que conduce a graves pérdidas económicas. Por lo que, determinar la gravedad de la enfermedad en las plantas es fundamental para muchos estudios y aplicaciones prácticas donde se necesite el control de la enfermedad, toma de decisiones, estimación de la pérdida de rendimiento y la evaluación de germoplasma con fines de fitomejoramiento. La gravedad de la enfermedad se puede cuantificar de manera precisa mediante herramientas como programas bioinformáticos y plataformas móviles; sin embargo, el método que se usa más ampliamente es la evaluación visual. En este trabajo, a través de un bioensayo de patogenicidad, se elaboró una escala cualitativa ordinal de severidad para *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar "Becán". Se utilizó la cepa bacteriana BV801 de *Xanthomonas vesicatoria* la cual se inoculó a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹, en plantas de chile 22 días después del trasplante. Se asperjaron 2 mL de suspensión bacteriana por planta y posteriormente estas se mantuvieron en un invernadero, con una doble capa de malla sombra, a una temperatura de 32 ± 3 °C, 12 h de luz diurna y una humedad relativa superior al 70%. Se registró la sintomatología mediante observación visual de las plantas. Con base en las observaciones, se generó una escala con siete niveles desde A (planta sana) hasta G (planta defoliada), mostrando las distintas fases de severidad de la enfermedad.

4.2. ABSTRACT

The bacterial spot caused by the phytopathogenic agent *Xanthomonas vesicatoria*, represents a significant threat due to the affectation of the production of various crops, including chili; which leads to graves economic losses. Therefore, determining the severity of the disease in plants is essential for many studies and practical applications where disease control, decision making, performance loss specification and germplasm evaluation with plant breeding fines are required. The severity of the disease can be precisely quantified using tools such as bioinformatics programs and mobile platforms; however, the most modified method used is visual evaluation. In this work, through a pathogenicity bioassay, an ordinal qualitative severity scale for *Xanthomonas vesicatoria* was developed in chili plants cultivar

"Becán". The bacterial strain BV801 of *Xanthomonas vesicatoria*, was considered, which was inoculated at a concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹, in chili plants 22 days after transplantation. Two mL of bacterial suspension can be obtained per plant and subsequently they were kept in a greenhouse, with a double layer of shade mesh, a temperature of $32 \pm 3^\circ\text{C}$, 12 h of daylight and a relative humidity greater than 70%. Based on the observations, a scale was generated with seven levels from A (healthy plant) to G (defoliated plant), showing the different phases of disease severity.

4.3. INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades que atacan al cultivo del chile, la mancha bacteriana es una de las más importantes y es causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. Esta enfermedad representa una seria amenaza al cultivo (Potnis *et al.*, 2015), ya que conduce a pérdidas económicamente importantes (Thieme *et al.*, 2005). *Xanthomonas vesicatoria* ataca a hojas, tallos, frutos y flores; causa manchas foliares inicialmente pequeñas, pero cuando las manchas son numerosas el follaje se vuelve amarillo y finalmente muere, lo que lleva a la defoliación de las plantas (Jones *et al.*, 2004). Por lo anterior, determinar la gravedad de la enfermedad en las plantas es fundamental en muchos aspectos, principalmente en estudios de patología vegetal. La evaluación del daño causado por una enfermedad tiene aplicaciones desde el punto de vista práctico, donde se necesita tomar decisiones para el control de la enfermedad, estimar la pérdida de rendimiento y evaluar germoplasma tolerante con fines de mejoramiento de cultivos, entre otros (Burdon *et al.*, 2006; Cooke, 2006; Bock *et al.*, 2010b; Pethybridge y Nelson, 2018). Desde el punto de vista operativo, la gravedad de la enfermedad se puede cuantificar de manera precisa mediante programas de análisis de imágenes personalizados disponibles en plataformas estacionarias como Evaluation (Lamari, 2002), CUANT (Barbedo, 2014), programas gratuitos como ImageJ (Schneider *et al.*, 2012); además de plataformas móviles como Leaf Doctor (Pethybridge y Nelson, 2015). La limitante de estos paquetes bioinformáticos es la necesidad de equipos específicos (computadoras o dispositivos móviles), además de cierto nivel de conocimiento para su uso. El método que se usa más ampliamente para evaluar la gravedad de una enfermedad de las plantas es la evaluación visual. Por medio de esta, es posible estimar de forma visual el área enferma o una sintomatología específica en una hoja u otro órgano vegetal respecto a una planta sana. La evaluación visual es no destructiva y a menudo es la opción menos costosa, rápida y práctica para evaluar la severidad de la enfermedad en las plantas (Bock *et al.*, 2010). Por otro lado, una desventaja en la estimación

de la severidad por este método es el potencial de error (Bock *et al.*, 2008a); por lo que se requieren de métodos estandarizados de cuantificación. Dentro de los métodos para medir la agresividad o daño del patógeno, el uso de escalas logarítmicas diagramáticas es el más ampliamente utilizado. Estas escalas, consisten en la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de plantas mostrando los síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad (Nascimento *et al.*, 2005). El uso de estas escalas o métodos estandarizados ha sido evaluado en otros cultivos y ha demostrado ser confiable. Hernández-Ramos y Sandoval-Islas (2015), comprobaron que el uso de sistemas estandarizados para la cuantificación de enfermedades en maíz, y en cualquier otro cultivo, resulta ser una poderosa herramienta dado que permite la comparación, con resultados fácilmente reproducibles, con altos niveles de exactitud y precisión entre diversos evaluadores; demostrando así su aplicabilidad en la evaluación de la severidad de una enfermedad.

4.4. OBJETIVO

Elaborar una escala cualitativa ordinal de virulencia de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán bajo condiciones controladas.

4.5. MATERIALES Y MÉTODOS

Estos experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

4.5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se produjeron plántulas a partir de semillas de chile cultivar Becán, en charolas de germinación dentro de una cámara de crecimiento a 26°C. A los 56 días de la siembra, las plantas se trasplantaron a bolsas de polietileno negras con capacidad de 2 L, rellenas con una hojarasca de bosque, arena, suelo, perlita, vermiculita y turba en proporción 9:4:4:3:3:1 (v/v) autoclavada a 120°C a una presión interna de 103 kPa durante 6 h. Las plantas se mantuvieron en un invernadero, bajo una doble capa de malla sombra de color blanco, a una temperatura promedio de 32 ± 3°C y 12 horas de luz. Las plantas se regaron cada tercer día con 100 mL de agua destilada. A los siete y 14 días después del trasplante se aplicaron 50 mL de solución nutritiva "Peters" (10-30-20), a una concentración de 1 gL⁻¹.

4.5.2. Bacteria fitopatógena

Se utilizó la cepa bacteriana BV801 de *Xanthomonas vesicatoria* (aislada de tejido enfermo de chile poblano). La bacteria se reactivó a 30°C en medio nutriente-extracto de levadura-glicerol (NYG) (Daniels *et al.*, 1984), durante 24 h. La suspensión bacteriana se recuperó por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C; posteriormente se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente. Las células bacterianas se suspendieron en buffer fosfato pH 7, ajustándose a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹.

4.5.3. Pruebas de patogenicidad

A los 22 días después del trasplante, las plantas de chile se inocularon asperjando 2 mL de suspensión bacteriana por planta. La aspersión se aplicó a toda la planta en el haz y envés de las hojas, a punto de rocío con un atomizador. Las plantas control se asperjaron con 2 mL de agua destilada estéril para que tuvieran el mismo manejo. Posteriormente, todas las plantas se mantuvieron en un ambiente con una humedad relativa superior al 70%, la cual se obtuvo mediante microaspersiones de cinco minutos cada hora, con el fin de favorecer el proceso infectivo de la bacteria fitopatógena.

4.5.4. Registro de sintomatología

Se registró el daño por el patógeno, desde el momento de la aparición de síntomas que van de puntos o manchas cloróticas, hasta la presencia de necrosis, pérdida de turgencia en las hojas, clorosis generalizada y defoliación.

4.5.5. Diseño experimental

Los bioensayos de patogenicidad se establecieron en un diseño unifactorial (planta enferma) y un control (planta sana), ambos con diez repeticiones.

4.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes del proceso infeccioso, las plantas de chile mostraron una apariencia sana, las hojas estuvieron turgentes, de color verde intenso, sin presencia de algún síntoma o daño en ninguna de sus hojas (**Figura 19A**). Siete días después de la infección comenzaron los primeros síntomas de la enfermedad; puntos de tonalidad amarillo pálido, que mediante observación a contraluz se mostraron traslucidos (**Figura 19B**); estos síntomas se presentaron solo en la tercera y cuarta hoja (contando del ápice hacia la base de la planta). A los dos días de la aparición del primer síntoma, los puntos cambiaron de tonalidad,

pasando de amarillo pálido a amarillo intenso; mientras que en las hojas inferiores inició la aparición de síntomas (**Figura 19C**). Tres días después, en las hojas intermedias aumentó el número de puntos de color amarillo pálido (**Figura 19D**). Así mismo se presentó un aumento en la densidad y tamaño de los puntos amarillos, ocasionando la unión entre varios y formando una mancha clorótica en hojas intermedias e inferiores de la planta. Además, algunos puntos amarillos comenzaron a desarrollar un halo necrótico. Cuatro días después, la mayor parte de las hojas maduras perdieron turgencia; la planta en general empezó a perder su color verde natural y se presentó un color verde amarillento (**Figura 19E**). Después la aparición de manchas necróticas comenzó la defoliación de hojas intermedias, mientras que las hojas inferiores presentaron poca turgencia; en las hojas jóvenes empezaron a aparecer puntos amarillos (**Figura 19F**). Cuatro días después de la pérdida de la primera hoja la planta mostró una defoliación superior al 70% (**Figura 19G**).

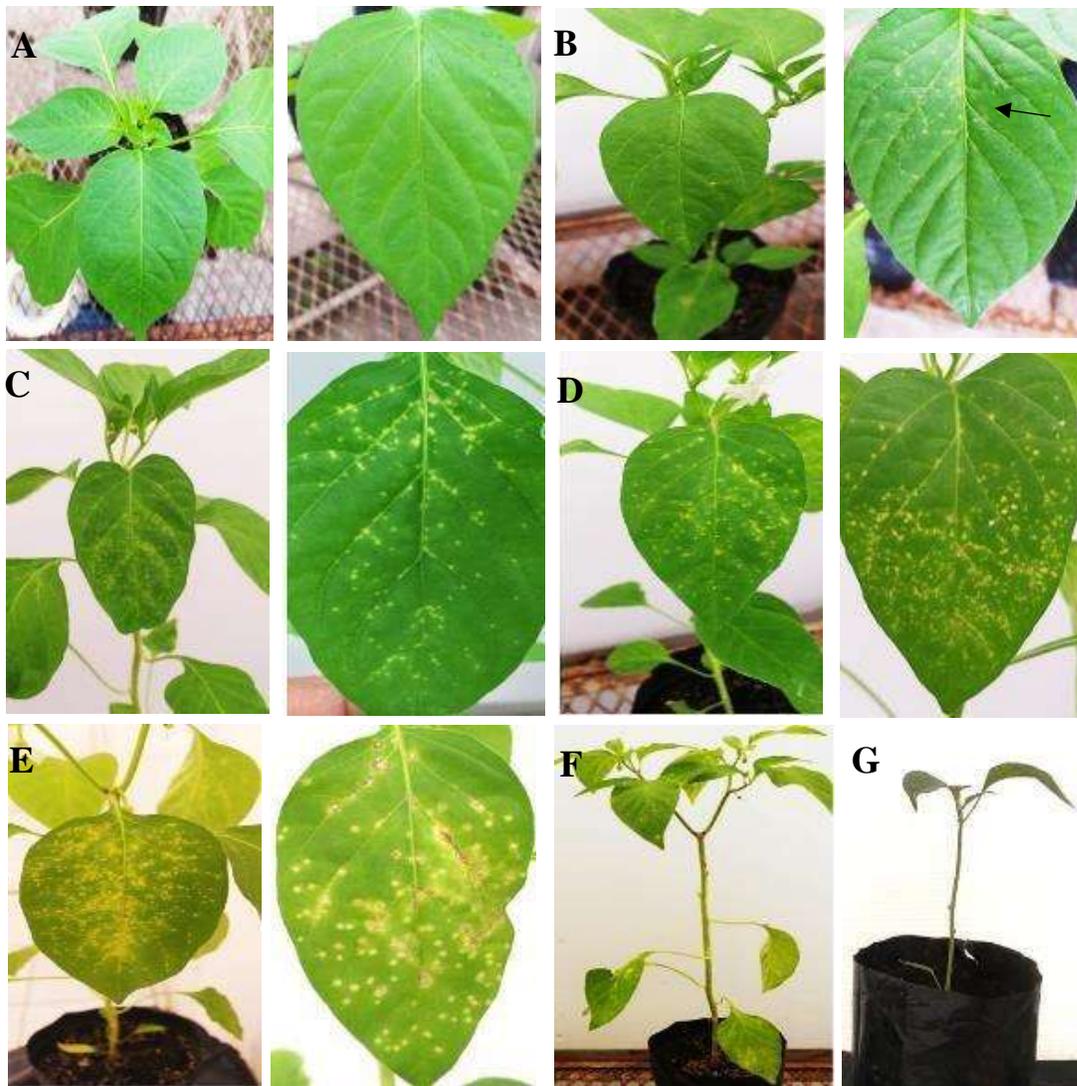


Figura 19. Evolución del desarrollo de síntomas en plantas de chile cultivar Becán, infectadas con la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria*. A) Planta sana; B) Aparición de puntos de color amarillo pálido; C) Puntos con tonalidad amarillo intenso; D) Incremento de puntos amarillos; E) Aparición y unión de manchas cloróticas; F) Inicio de defoliación y, G) Planta con defoliación.

Las proteínas que pertenecen a la biogénesis de la pared celular / membrana / envoltura, el tráfico intracelular y los mecanismos de defensa de la planta, permiten que sea más o menos vulnerable a la bacteria (Park y Han, 2017). Muchas bacterias patógenas de plantas Gram negativas utilizan sistemas especializados de secreción de proteínas para administrar factores de virulencia, incluyendo ADN o proteínas efectoras bacterianas, en las células vegetales (Gerlach y Hensel, 2007). Las bacterias a menudo secretan enzimas que degradan la pared celular, que contribuyen a la virulencia bacteriana, por ejemplo, celulasas,

xilanasas, poligalacturonasas y amilasas (Hématy *et al.*, 2009; Gibson *et al.*, 2011; Hamann, 2012). Facilitando la adquisición de nutrientes y translocación de factores de virulencia en la célula huésped (Wang *et al.*, 2008).

4.7. CONCLUSIÓN

Mediante la visualización y análisis del número, tamaño y forma de las lesiones, se puede caracterizar el avance de la mancha bacteriana en Chile. Con base en la sintomatología registrada se estableció una escala cualitativa ordinal de severidad de la enfermedad causada por *Xanthomonas vesicatoria*, la cual contempló siete niveles. El cultivar Becán, fue susceptible a la mancha bacteriana, debido a la presencia de abundantes manchas cloróticas y necróticas, y al desprendimiento de hojas.

4.8. BIBLIOGRAFÍA

- Barbedo, J. G. A. (2014). Un método automático para detectar y medir los síntomas de la enfermedad de la hoja mediante el procesamiento digital de imágenes. *Plant Diseases*. 98: 1709-1716.
- Bock, C. H., Poole, G. H., Parker, P. E., y Gottwald, T. R. (2010). Gravedad de la enfermedad de la planta estimada visualmente, por fotografía digital y análisis de imágenes, y por imágenes hiperespectrales. *Crit. Rev. Plant Sci*. 29: 59-107.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. W., & Fielding, A. H. (1984). Clonación de genes implicados en la patogenicidad de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que utilizan el amplio rango de huéspedes cósmido pLAFR1. *The EMBO Journal*. 3: 3323-3328.
- Gerlach, R. G., Hensel, M. (2007). Sistemas de secreción de proteínas y adhesinas: el arsenal molecular de los patógenos Gram-negativos. *Int J Med Microbiol* 297: 401 - 415.
- Gibson, D. M., Rey, a., Hayes, M. L., Bergstrom, G. C. (2011). Los patógenos de las plantas como fuente de diversas enzimas para la digestión de la lignocelulosa. *Curr Opin Microbiol* 14: 264 – 270.
- Hamann, T. (2012). El mantenimiento de la integridad de la pared celular de la planta como componente esencial de los mecanismos de respuesta al estrés biótico. *Front Plant Sci* 3: 77.

- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S. (2009). Guerra de huésped-patógeno en la pared celular de la planta. *Plant Opin Curr Biol* 12: 406 - 413.
- Hernández-Ramos, L. y Sandoval-Islas, J. S. (2015). Escala diagramática de severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33: 95-103.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclasificación de las *Xanthomonas* asociadas con la enfermedad de manchas bacterianas de tomate y pimiento. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755-762.
- Lamari, L. (2002). Evaluación: Software de análisis de imágenes para la cuantificación de enfermedades de las plantas. Sociedad Americana de Fitopatología, St. Paul, MN.
- Nascimento, R. P. A., Michereff, J. S., De la Rosa, L. R. y Gómez, M. A. A. (2005). Elaboración y validación de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. *Summa Phytopathol.* 31: 59-64.
- Park, HJ y Han, SW (2017). Los análisis funcionales y proteómicos revelan que ScpBXv está involucrado en el crecimiento bacteriano, la virulencia y la formación de biopelículas en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *The Plant Pathology Journal*, 33 (6), 602-607.
- Pethybridge, S. J., y Nelson, S. C. (2015). Leaf doctor: una nueva aplicación portátil para cuantificar la gravedad de las enfermedades de las plantas. *Plant Dis.* 99: 13101316.
- Pethybridge, S. J., y Nelson, S. C. (2018). Estimate, una nueva aplicación para iPad para la evaluación de la gravedad de las enfermedades de las plantas utilizando diagramas de área estándar fotográficos. *Plant Dis*, 102: 276-281.
- Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J. D., Paret, M. L., & Jones, J. B. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 16: 907-920.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). Imagen de NIH para ImageJ: 25 años de análisis de imágenes. *Nature Methods*, 9: 671-675.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D. & Kaiser, O. (2005). Información sobre la plasticidad del genoma y la patogenicidad de la bacteria

fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revelada por la secuencia completa del genoma. Revista de bacteriología, 187: 7254-7266.

Wang, L., Rong, W., El, C. (2008). Dos poligalacturonasas extracelulares de *Xanthomonas*, PghAxc y PghBxc, están reguladas por los reguladores de secreción tipo III HrpX y HrpG y son necesarias para la virulencia. Mol Plant Microbe Interact 21: 555 - 563.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Xanthomonas vesicatoria* CON EXTRACTOS DE ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE CHILE CULTIVAR BECÁN

5.1. RESUMEN

La mancha foliar bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria*, es un problema mundial, debido a la pérdida de rendimiento y calidad del fruto en la mayoría de las áreas productoras. La propagación a gran escala de los patógenos ocurre a través de semillas contaminadas, los cultivares resistentes son escasos y se superan rápidamente, y a menudo se informa la resistencia bacteriana a los compuestos antimicrobianos. Varios estudios informan la supresión de enfermedades de las plantas por cepas de actinobacterias a través de la producción de antibióticos. En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de cuatro cepas con actividad bactericida (ED64, ED65, ED66 y ED67) y dos cepas sin actividad (EZ71 y BZMW18) para *Xanthomonas vesicatoria* y un producto químico: *Kasugamicina*, bajo condiciones de invernadero. Plantas de Chile de 22 días después de trasplante se infectaron mediante la aspersión de 2 mL por planta de una suspensión ajustada de la cepa BV801 con una $DO_{600} = 2$, a cada uno de los tratamientos correspondientes. Posteriormente a las 18 horas se aplicaron por planta 2 mL de extracto de actinomiceto obtenido bajo fermentación sólida. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en las variables de crecimiento ($P = 0.00$), donde en las plantas asperjadas con los extractos provenientes de las cepas ED64, ED65 y ED66 se presentaron una pérdida en área foliar menor a la obtenida por el ingrediente activo *kasugamicina*. Los extractos de las cepas ED66 y ED67 presentaron únicamente 2 hojas con daños, mientras que ED64 y ED65 lograron disminuir la presencia de hojas con manchas cloróticas a una hoja ($P = 0.00$). Los resultados de este experimento demuestran que los extractos de actinomicetos con actividad bactericida son una alternativa viable de control biológico, al generar mayor disminución en número de manchas cloróticas y necróticas en comparación al ingrediente activo *kasugamicina*.

5.2. ABSTRACT

The bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas vesicatoria* is a worldwide problem, due to the loss of yield and fruit quality in most of the producing areas. Large-scale spread of pathogens occurs through contaminated seeds, resistant cultivars are scarce and rapidly overcome, and bacterial resistance to antimicrobial compounds is often reported. Several studies report the suppression of plant diseases by strains of actinobacteria through the

production of antibiotics. In this study the antimicrobial activity of extracts from four strains with bactericidal activity (ED64, ED65, ED66 and ED67) and two strains without activity (EZ71 and BZMW18) for *Xanthomonas vesicatoria* and a chemical: Kasugamycin, under conditions of greenhouse. Chili plants 22 days after transplantation were infected by spraying 2 mL per plant of an adjusted suspension of strain BV801 with an DO600 = 2, to each of the corresponding treatments. Later, at 18 hours, 2 mL of actinomycete extract obtained under solid fermentation was applied per plant. The statistical analysis showed significant differences in the growth variables ($P = 0.00$), where in plants sprinkled with extracts from strains ED64, ED65 and ED66 there was a loss in leaf area less than that obtained by the active ingredient Kasugamycin. Extracts from strains ED66 and ED67 presented only 2 damaged leaves, while ED64 and ED65 managed to reduce the presence of leaves with chlorotic spots on one leaf ($P = 0.00$). The results of this experiment demonstrate that extracts of actinomycetes with bactericidal activity are a viable alternative of biological control, generating a greater decrease in the number of chlorotic and necrotic spots compared to the active ingredient kasugamycin.

5.3. INTRODUCCIÓN

El género *Xanthomonas* consta de muchos patógenos de importancia económica que causan enfermedades en plantas de más de 200 familias (Bradbury, 1986; Boch y Bonas, 2010). La mancha foliar bacteriana del tomate y el pimiento es causada por cuatro especies de *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*); *X. perforans* se reclasificó recientemente como *X. euvesicatoria* (Constantin *et al.*, 2016). Esta enfermedad es un problema mundial, ya que causa pérdida de rendimiento y perjudica la calidad del fruto en la mayoría de las áreas productoras de tomate y pimiento. (Jones *et al.*, 2004).

La propagación a gran escala de los patógenos ocurre a través de semillas contaminadas, los cultivares resistentes son escasos y se superan rápidamente y a menudo se informa la resistencia bacteriana a los compuestos antimicrobianos (Richard *et al.*, 2017). Además, las restricciones sobre el uso de pesticidas químicos debido a las preocupaciones sobre su impacto en el medio ambiente y la salud humana están aumentando rápidamente (Saha *et al.*, 2012).

Los microorganismos antagonistas como los actinomicetos exhiben varios mecanismos que incluyen la producción de antibióticos, enzimas que degradan la pared celular y parasitismo

e inducción de resistencia del huésped (Palaniyandi *et al.*, 2013). Las actinobacterias son productores prolíficos de antibióticos, que producen alrededor del 45% de los antibióticos actualmente en uso (Liu *et al.*, 2012). Varios estudios informan la supresión de las enfermedades de las plantas por cepas de actinobacterias a través de la producción de antibióticos (Palaniyandi *et al.*, 2013). Además, los antibióticos producidos por las actinobacterias tienen aplicación como un fungicida de suelo de amplio espectro alternativo al uso de fungicidas químicos (Jinhua *et al.*, 2010).

En este capítulo se evaluaron seis extractos de cepas de actinomicetos en la bioprotección de plantas de Chile contra *Xanthomonas vesicatoria*.

5.4. OBJETIVO

- Evaluar la capacidad de control biológico de *Xanthomonas vesicatoria* mediante los extractos de cepas de actinomicetos, en plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) cultivar Becán bajo condiciones de invernadero.

5.5. HIPÓTESIS

La aplicación de extractos de actinomicetos con actividad antibacteriana contra *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de Chile generará un efecto bioprotector contra la mancha bacteriana al disminuir la gravedad y cantidad de síntomas.

5.6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos y materiales biológicos de este capítulo se obtuvieron del Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

5.6.1. Germinación

Se sembró Chile cultivar Becán en charolas de germinación con arena y peat moss esterilizado (120°C / 4 h) en proporción 1:1 (v/v). Se trasplantó a los 65 días después de siembra (DDS) en macetas de 2 L de capacidad que contenían una mezcla de suelo de monte, arena, suelo, perlita, vermiculita y peat moss en proporción 9:4:4:3:3:1 (v/v) esterilizada (120 °C a una presión interna de 103 kPa durante 6 h).

5.6.2. Inoculo bacteriano de *Xanthomonas vesicatoria*

La cepa BV801 se cultivó en medio líquido NYG, en agitación constante a 200 rpm, a 28°C durante 24 horas, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante cinco minutos y lavó dos veces con agua destilada estéril, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en agua estéril, ajustándose a una $DO_{600} = 2$.

5.6.3. Preparación del inóculo de actinomicetos

Las cepas de actinomicetos BZMW18, EZ71, ED63, ED64, ED65, ED66 y ED67 se reactivaron en medio PDA-Y, durante siete días a 28°C. Se transfirieron dos discos de micelio de 7 mm de diámetro a matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de medio de cultivo PDB-Y, incubados a 200 rpm, durante cinco días, a una temperatura de 28°C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min; los sedimentos resultantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril.

5.6.4. Fermentación sólida de los actinomicetos

Se realizó de acuerdo con la metodología de Ellaiah *et al.* (2004), en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 10 g de sémola humedecida con 12 mL de PDB a pH 7. Se añadieron 2 mL de inóculo (equivalente a 1.2-5.6 mg p / p de masa celular seca), incubándose a 28° C durante 12 días. El extracto bioactivo se obtuvo añadiendo 25 mL de tampón fosfato (8.06 g de NaCl L⁻¹, 0.22 g de KCl L⁻¹, 1.15 g de Na₂HPO₄ L⁻¹, 0.2 g de KH₂HPO₄ L⁻¹) a pH 8.0 (Adinarayana *et al.*, 2003), colocándose en un agitador orbital a 200 rpm durante 1 h, y posteriormente 16 h a 4°C. El contenido de cada matraz se centrifugó a 13000 rpm, durante 20 minutos y finalmente se filtró con membrana de 0,22 µm (MILLEX®GP).

5.6.5. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de invernadero, donde se evaluaron los extractos bioactivos provenientes de cuatro cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana (ED64, ED65, ED66 y ED67) y dos cepas sin actividad (EZ71 y BZMW18); un antibiotico: *Kasugamicina* (**Cuadro 1**), y tres controles: un control negativo (sin bacteria), un control positivo al cual solo se le aplicó el inoculo bacteriano, y un control de tampón fosfato; resultando 10 tratamientos con nueve repeticiones cada uno. La unidad experimental consistió de una planta de chile en una maceta.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos del experimento control biológico por extractos bioactivos de actinomicetos en plantas de chile cultivar Becán contra la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*).

TRATAMIENTO	EXTRACTO DE ACTINOMICETO	ACTIVIDAD antibacteriana <i>in vitro</i>	BACTERIABV801 de <i>X. vesicatoria</i>
T1	EZ 71	Sin	Con
T2	ED 64	Con	Con
T3	ED 65	Con	Con
T4	ED 66	Con	Con
T5	ED 67	Con	Con
T6	BZMW 18	Con	Con
T7	Kasugamicina	-	Con
T8	Tampón fosfato	-	Con
T9	Control -	-	Sin
T10	Control +	-	Con

5.6.6. Inoculación de la cepa fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*

A los 22 días después del trasplante (DDT) se asperjó 2 mL a cada planta de una suspensión de la cepa BV801 de *Xanthomonas vesicatoria* a una $DO_{600} = 2$ (2×10^7 UFC mL⁻¹), a cada uno de los tratamientos correspondientes.

5.6.7. Aplicación del extracto bioactivo de actinomiceto

A las 18 horas después de infección (DDI) con la cepa BV801 de *X. vesicatoria* se aplicaron 2 mL de extracto bioactivo de los actinomicetos, por planta obtenidos bajo fermentación sólida.

5.6.8. Muestreos

Las variables de crecimiento se muestrearon 16 días después de infección (DDI), mientras que las variables fitopatológicas a los 12 DDI y las variables fisiológicas a los 15 DDI.

5.6.9. Variables evaluadas

5.6.9.1. Variables de crecimiento

- Biomasa seca foliar

Las muestras se secaron en un horno de secado a 65°C, durante tres días en bolsas de papel estraza. Posteriormente se registró el peso mediante una balanza de precisión.

- **Área foliar**

Se cuantificó el área foliar utilizando el procesamiento de imágenes fotográficas con el Software "ImageJ".

5.6.9.2. Variables fitopatológicas

Se determinó el número de hojas con manchas cloróticas y necróticas, el número de hojas defoliadas y el nivel de severidad presentado por la planta, a través de una escala cualitativa de severidad desarrollada en el anterior capítulo de este trabajo de tesis de maestría.

5.6.9.3. Variables fisiológicas

Se midieron en la tercera hoja de arriba para debajo de cada planta en todos los tratamientos. Las mediciones comenzaron, a las 9:00 am y se prolongaron hasta las 4 pm, debido al número de tratamientos y repeticiones. Se utilizó el instrumento MultispeQ v1.0 para medir los parámetros siguientes:

Variable respuesta	Interpretación
Phi2	La fracción de energía luminosa capturada por Photosystem II que se dirige hacia la fotoquímica para producir ATP y NADPH. Rango típico: 0 – 0.82
PhiNPQ	La fracción de energía luminosa capturada por Photosystem II que se dirige hacia el enfriamiento no fotoquímico y se disipa como calor dentro de la hoja. Rango típico: 0 - 0.85
Contenido relativo de clorofila	La concentración de clorofila en la hoja. Rango típico: 0 - 80.
Intensidad de luz (PAR)	Radiación fotosintéticamente activa en las longitudes de onda de 400-700 nanómetros que se utiliza para la fotosíntesis.

5.6.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables de crecimiento, fisiológicas y algunas fitopatologías se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un

95% de confianza, estos se realizaron en el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II. El nivel de severidad de la enfermedad se sometió a un análisis no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se empleó un intervalo de confianza del 95% de la mediana.

5.7. RESULTADOS

5.7.1. Variables de crecimiento

Se encontró diferencias estadísticas significativas en todas las variables de crecimiento ($P=0.00$). Respecto al área foliar se encontró, una disminución significativa ($P=0.00$) en el área foliar en plantas infectadas con *Xanthomonas vesicatoria*, de 154 cm^2 con respecto a la planta sana (171.07 cm^2). Se observó además que en todos los tratamientos disminuyó significativamente ($P=0.00$), el área foliar respecto a las plantas sanas. En plantas donde se aplicaron los extractos provenientes de las cepas ED64, ED65 y ED66 se encontró diferencia significancia, presentando una pérdida en área foliar menor a la obtenida por el ingrediente activo kasugamicina ($P=0.00$) (**Figura 20**). El agente causal *Xanthomonas vesicatoria* ocasiono defoliación. Lamichhane, (2014) expresó que los daños ocasionados por *Xanthomonas* son frecuentes en las hojas y frutos. Este fitopatógeno en etapas avanzadas, genera que la tasa de fotosíntesis no sea mayor a un cuarto de la tasa normal (Agrios, 1997), donde la reducción de la fotosíntesis da como resultado una reducción en el crecimiento.

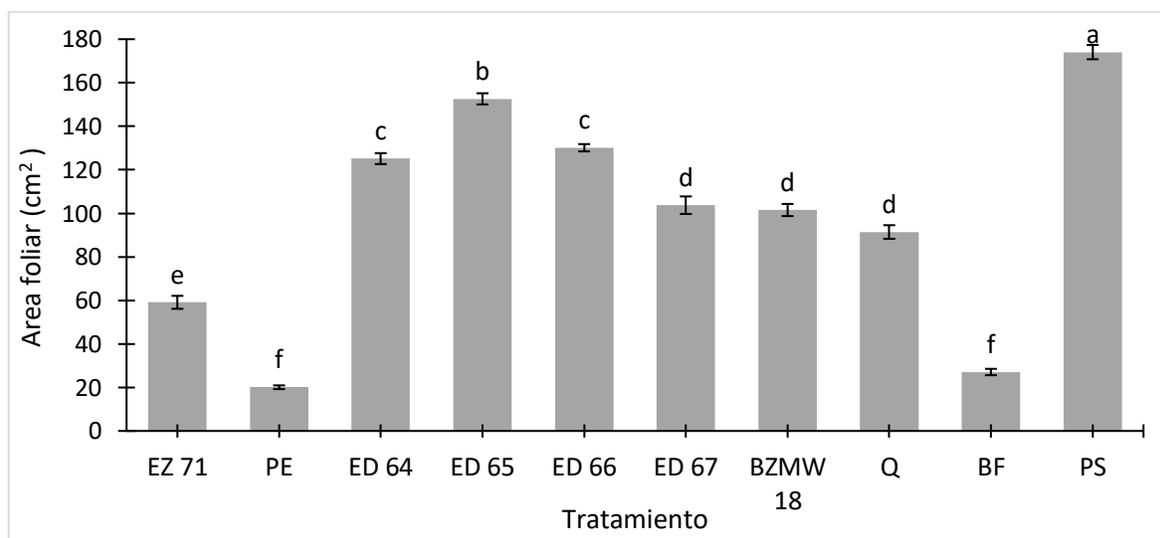


Figura 20. Área foliar después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras distintas sobre las barras indican diferencia significativa según (Tukey, $P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Para el peso seco total de las plantas, se encontró diferencia significativa ($P=0.00$) entre los distintos tratamientos evaluados. Todas las plantas disminuyeron en promedio un 50% su peso respecto a las plantas sanas. La disminución en biomasa fue significativamente menor en los tratamientos asperjados con los extractos de actinomicetos, encontrando la misma o menor pérdida en biomasa que el control químico (**Figura 21**). La causa fue probablemente la defoliación ocasionada por la bacteria fitopatógena y la fitotoxicidad de algunos metabolitos contenidos en los extractos. La disminución de la biomasa por la bacteria, se ha reportado en otros trabajos El-Hendawy *et al.* (1999), inocularon hojas de tomate con *Xanthomonas*, y obtuvieron como resultó una reducción significativa en el peso fresco y seco como resultado de la inoculación con el patógeno bacteriano.

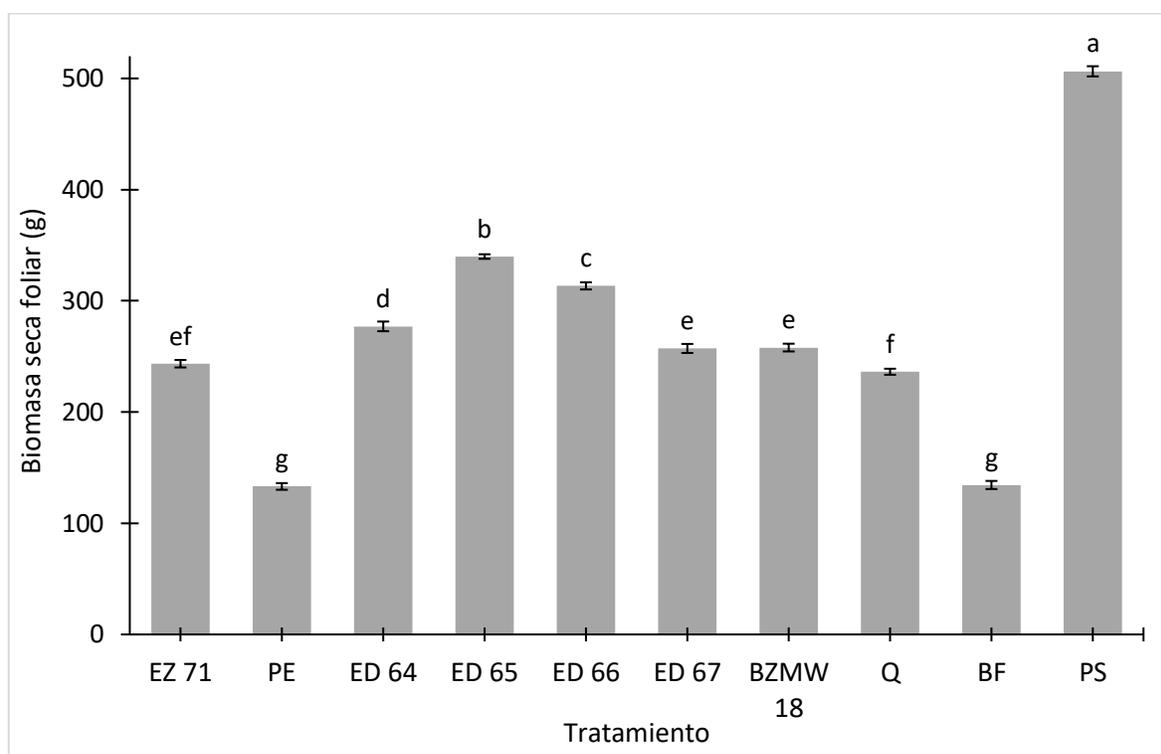


Figura 21. Biomasa seca 18 días después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P<0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Se encontró diferencia significativa entre los distintos tratamientos evaluados, en el número de hojas por planta ($P=0.00$). La aplicación del extracto ED65 obtuvo el mismo número de hojas que el control planta sana, mientras que la aplicación de los extractos ED64, ED66, ED67 y BZMW18 presentaron mayor o igual cantidad de hojas que el control químico (**Figura 22**). El uso de extractos de actinomicetos permite mitigar la caída de hojas, debido a la

interrupción del proceso infectivo de *Xanthomonas*, la cual antes de ingresar a la planta se desarrolla epifitamenté, de tal manera que el extracto evito el crecimiento debido a los compuestos activos que posee, evitando la perdida de área foliar.

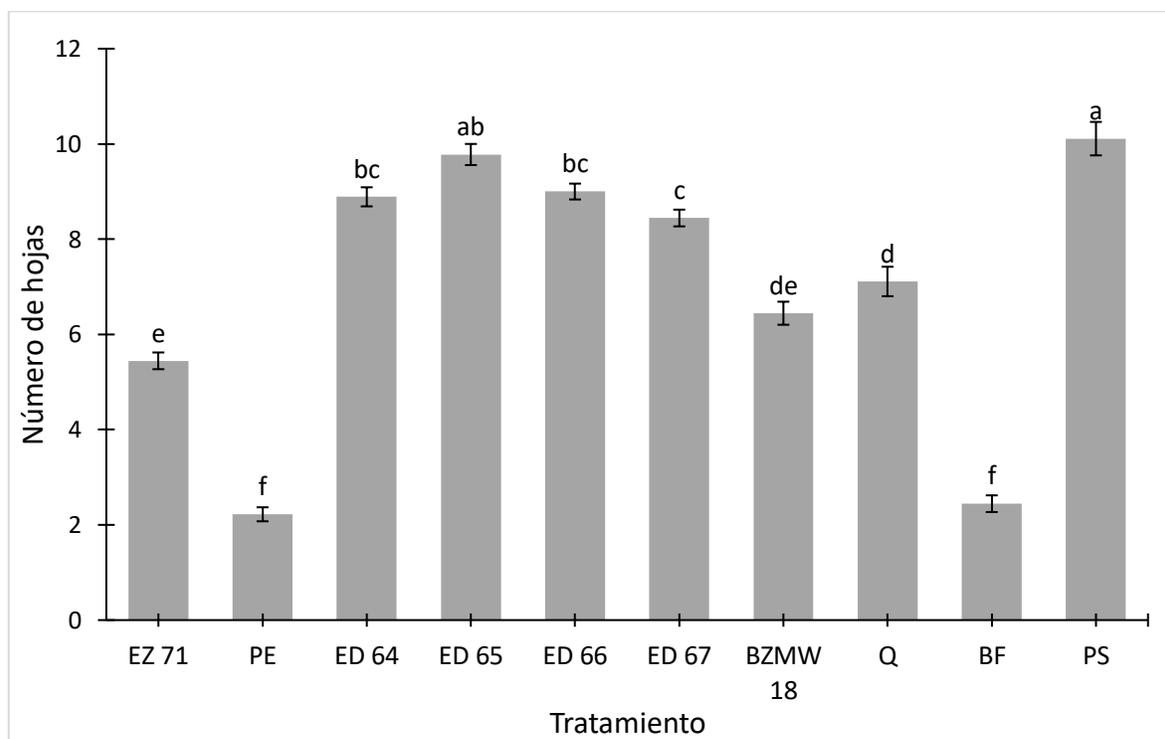


Figura 22. Número de hojas 16 días después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

5.7.2. Variables fitopatológicas

Después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria*, las plantas presentaron síntomas de la enfermedad, como la aparición de puntos de tonalidad amarillo pálido. Se encontró diferencia significativa entre tratamientos en el número de hojas con manchas cloróticas ($P = 0.00$), donde se obtuvo 1 hoja con manchas cloróticas con la aplicación de los extractos ED64 y ED65, mientras que el ingrediente activo Kasagamicina (5 hojas) presento 2 hojas con manchas cloróticas menos que el tratamiento de planta enferma (7 hojas). Las plantas donde se aplicó el extracto BZMW18 (a pesar de no presentar actividad *in vitro*) obtuvo la misma cantidad de hojas con manchas cloróticas que el control químico (**Figura 23**). El buffer fosfato no influyó en la manifestación de los síntomas del agente causal *Xanthomonas vesicatoria*. Situación similar encontró Ibrahim y Al-Saleh, (2012) al inocular plantas de

pimiento de cuatro semanas de edad (10^8 UFC / ml), y rociar agua destilada estéril como tratamiento de control negativo. Los aislamientos bacterianos causaron lesiones necróticas, cada una con un halo amarillo, en las hojas de las plantas inoculadas, mientras que las plantas de control negativo no mostraron síntomas. Rodríguez *et al.* (2018), encontraron que el extracto de *Streptomyces sp.* de la cepa Caat 1-54 fue eficaz en la prevención de lesiones del cítrico cuando se pulveriza en árboles de vivero de naranja dulce antes de la aplicación del inóculo *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. El número de lesiones del cítrico/cm² en las hojas de los árboles tratados con el extracto Caat 1-54 fue significativamente menor (80–93%) que en los árboles rociados con agua o DMSO.

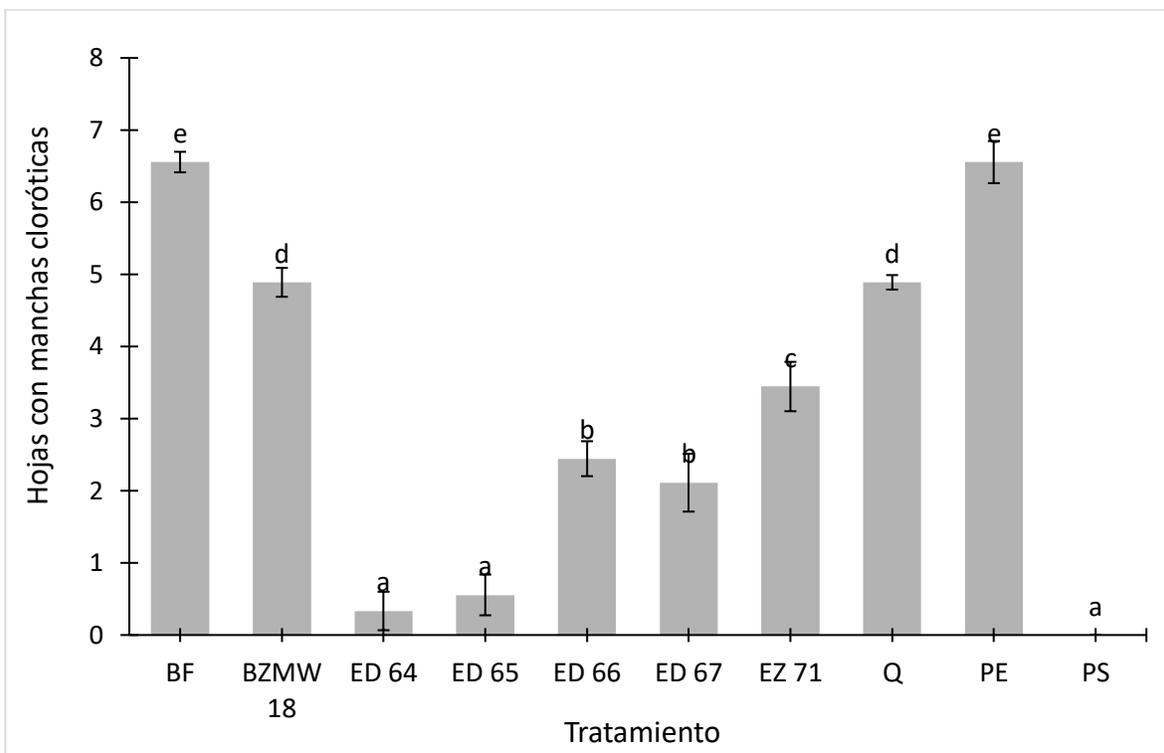


Figura 23. Número de hojas con manchas cloróticas 12 días después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Los resultados del análisis de varianza para el número de hojas con manchas necróticas mostraron diferencias significativas ($P = 0.00$), se encontró que la aplicación de extractos de actinomicetos redujo considerablemente el número de hojas con manchas necróticas. Las plantas con los extractos de ED64 y ED65 no presentaron hojas con manchas necróticas, ED66 y ED67 solo mostraron una hoja con síntomas, en ambos casos la disminución de

hojas necróticas fue significativamente diferente ($P = 0.00$) a lo obtenido en plantas tratadas con el producto químico que presentó tres hojas (**Figura 24**). Los extractos que previamente no presentaron actividad bactericida contra *Xanthomonas vesicatoria in vitro*, si mostraron una disminución de manchas necróticas cuando se aplicó *in planta*. Es probable que algunos extractos presenten ciertos niveles de fenoles, aminoácidos, carbohidratos y proteínas, y puedan generar una activación en el mecanismo de defensa en las plantas, lo cual ya se ha demostrado en *Brassica* contra bacterias patógenas (Simoh *et al.*, 1988).

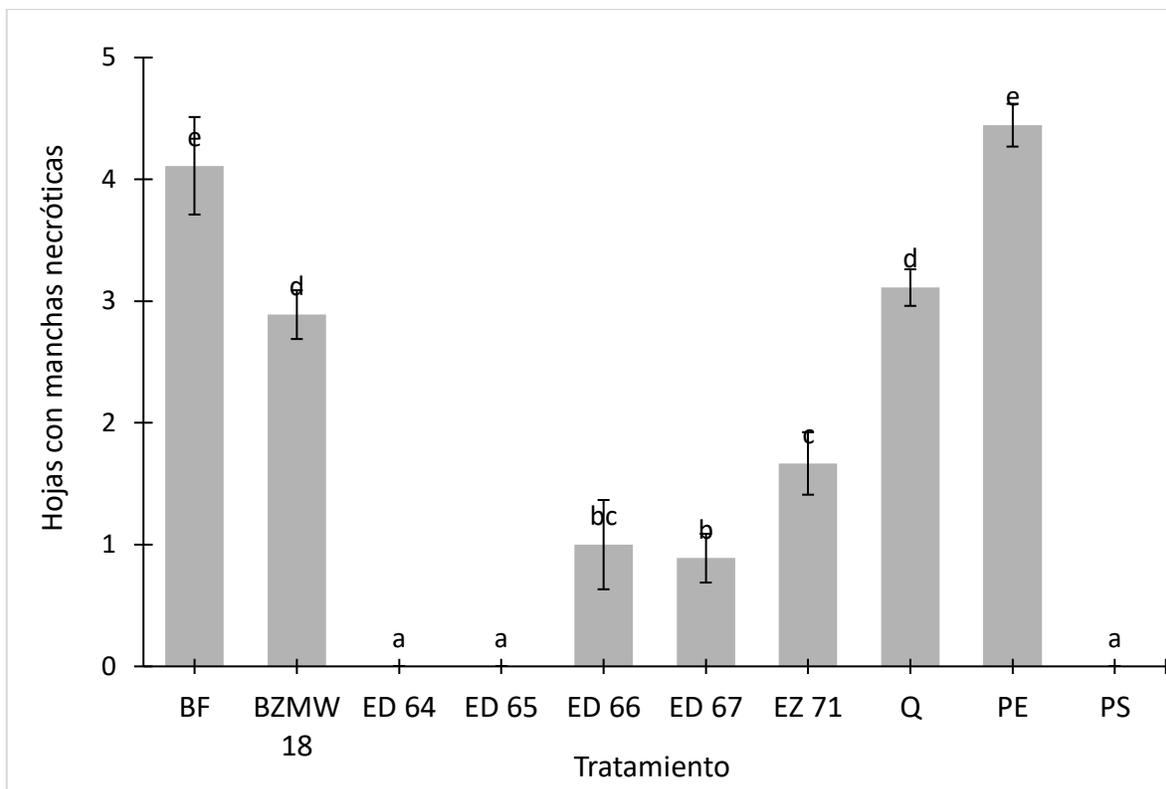


Figura 24. Número de hojas con manchas necróticas 12 días después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de Chile. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Así mismo, se encontró diferencia significativa entre tratamientos en el número de hojas defoliadas ($P = 0.00$), donde plantas con los extractos de BZMW18, ED64, ED65, ED66 y ED67, presentaron sólo una hoja defoliada, resultando estadísticamente iguales a las plantas sanas; y a su vez obteniendo estadísticamente una menor defoliación que el producto químico (**Figura 25-27**). La menor defoliación encontrada en los tratamientos asperjados con extractos de actinomicetos puede ser debido a que los compuestos activos generan inhibición en crecimiento sobre el agente causal *Xanthomonas*. Mageshwaran *et al.*

(2011) encontraron que un metabolito antibacteriano del extracto crudo de *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 mostró una fuerte inhibición contra *Xanthomonas campestris* en las cepas CP-1-1 y M-5.

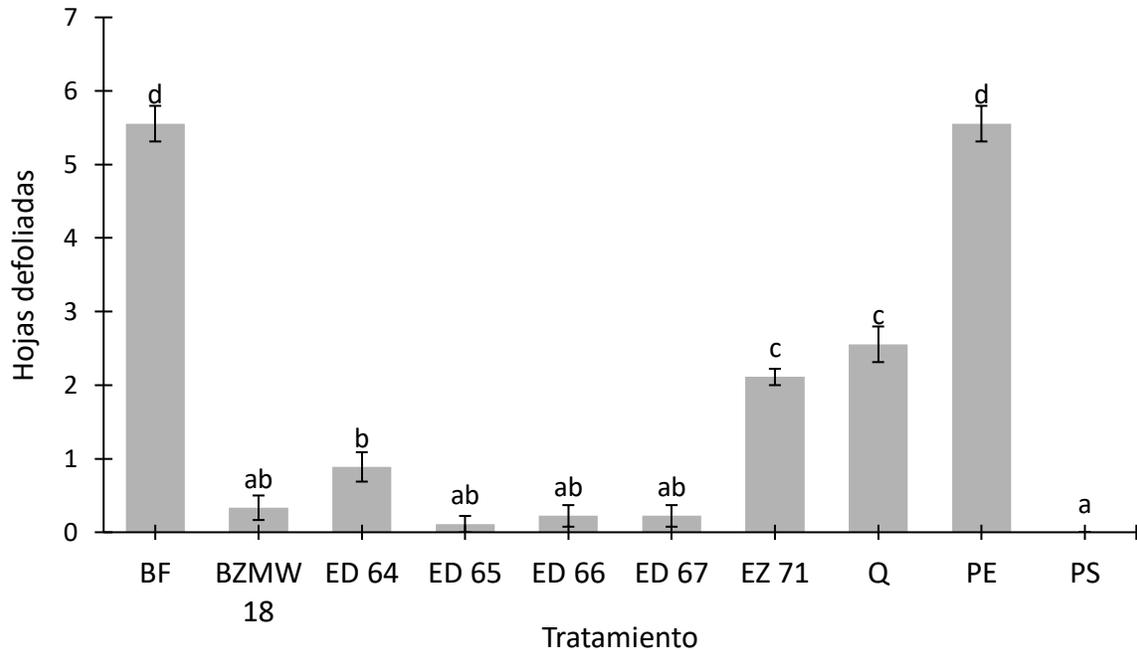


Figura 25. Número de hojas defoliadas 12 días después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. PE= planta enferma; Q= producto químico; BF= buffer fosfato; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.



Figura 26. Síntomas fitopatológicos encontrados a los 16 días después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*, en los tratamientos: planta sana (PS), y los extractos de ED66 y ED64.



Figura 27. Síntomas fitopatológicos encontrados a los 16 días después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*, en los tratamientos: extractos de ED65, ED67, EZ71, BZMW18, en el control químico (Q) y en el control planta enferma (PE).

El análisis no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos (Estadístico = 79.9031, valor-P = 0,00) en la sintomatología observada en plantas de Chile. Después de la infección de *Xanthomonas vesicatoria*, las plantas con los extractos bioactivos de las cepas de actinomicetos ED 64, ED 65, ED 66 y ED 67 presentaron un nivel de severidad (P = 0.00) menor que el producto químico Kasumin® (**Figura 28-34**). Los extractos ED64 y ED65 presentaron un nivel de severidad 0 (planta sana), mismo nivel que el tratamiento planta sana. Mientras que la aplicación de los extractos ED66 y ED67, generaron

disminuir la severidad a un nivel 3 (presencia de puntos de color amarillo intenso). Los extractos BZMW18 y EZ71, que no presentaron actividad bactericida *in vitro* contra *Xanthomonas* obtuvieron el mismo nivel de severidad que el control químico. La aplicación de extractos de actinomicetos disminuye la formación de síntomas debido a que los compuestos bioactivos que están presentes y actúan sobre el crecimiento y desarrollo de la bacteria. El estudio de Das *et al.* (2018), demuestra que el extracto de actinomiceto de la cepa EA-PWS52 posee y contiene compuestos fenólicos y ácido bencenoacético como metabolitos dominantes; los cuales son conocidos por su actividad antimicrobiana (Yogeswari *et al.*, 2012).

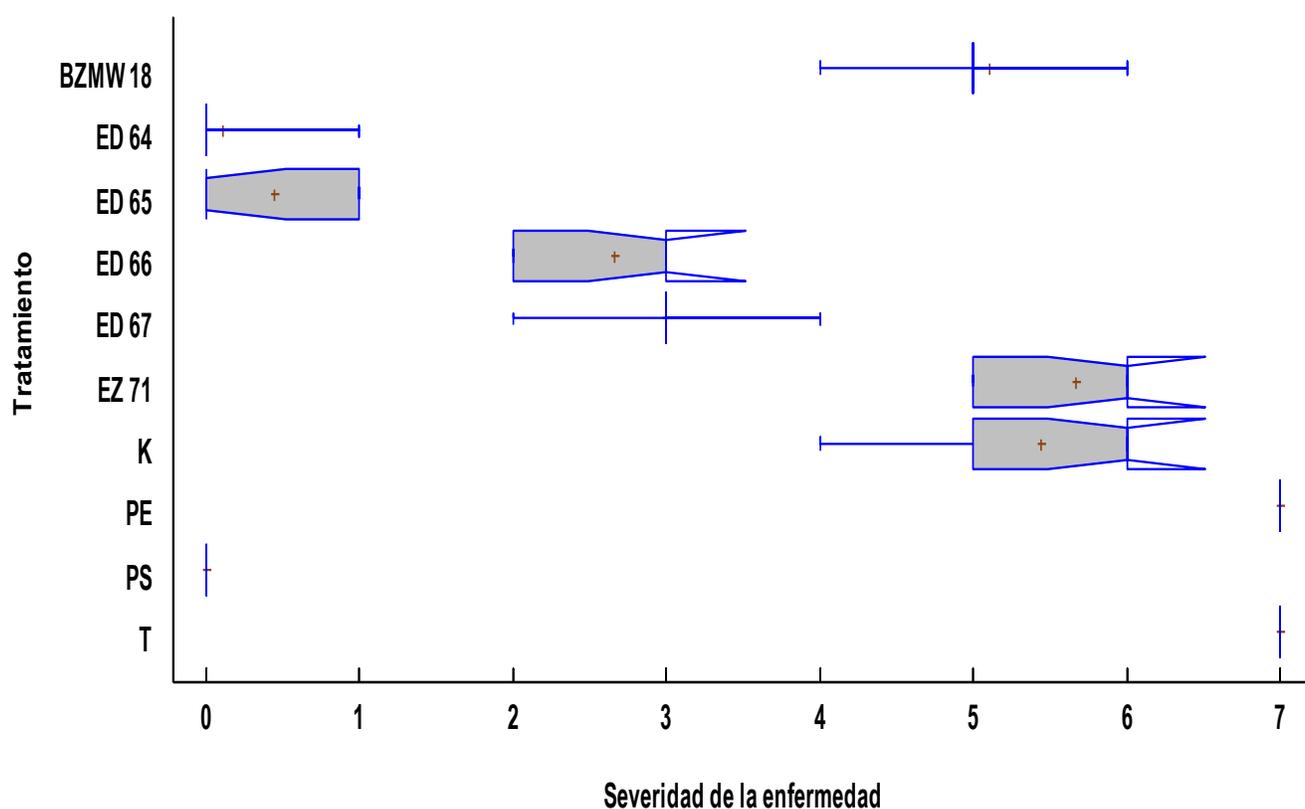


Figura 28. Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*. K= Kasumin®; PE= Planta enferma; PS= Planta sana; T= Tampón fosfato.

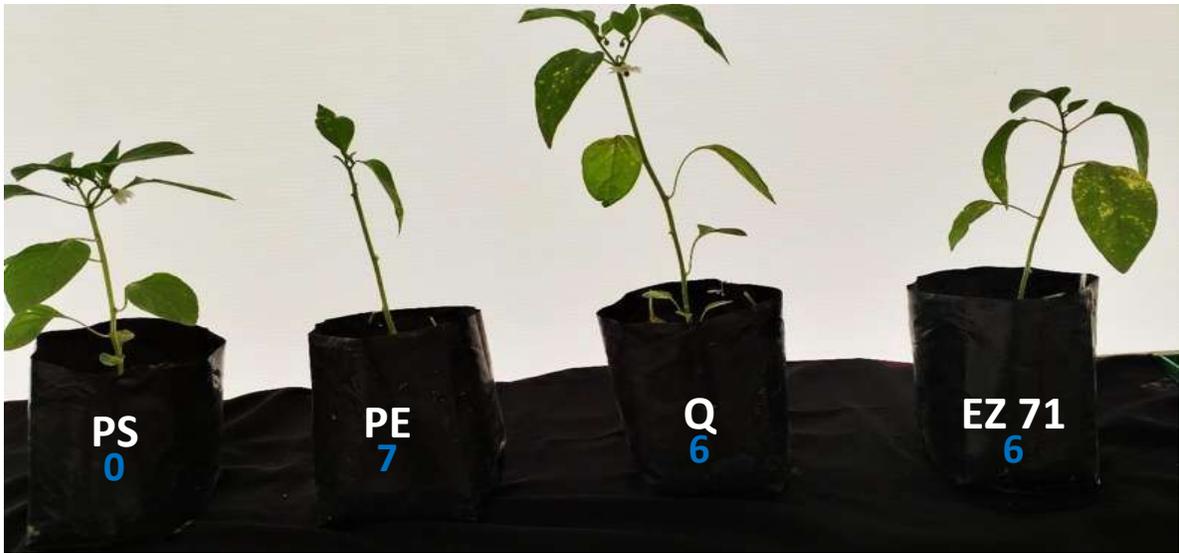


Figura 29. Nivel de severidad obtenido por el extracto de EZ71 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

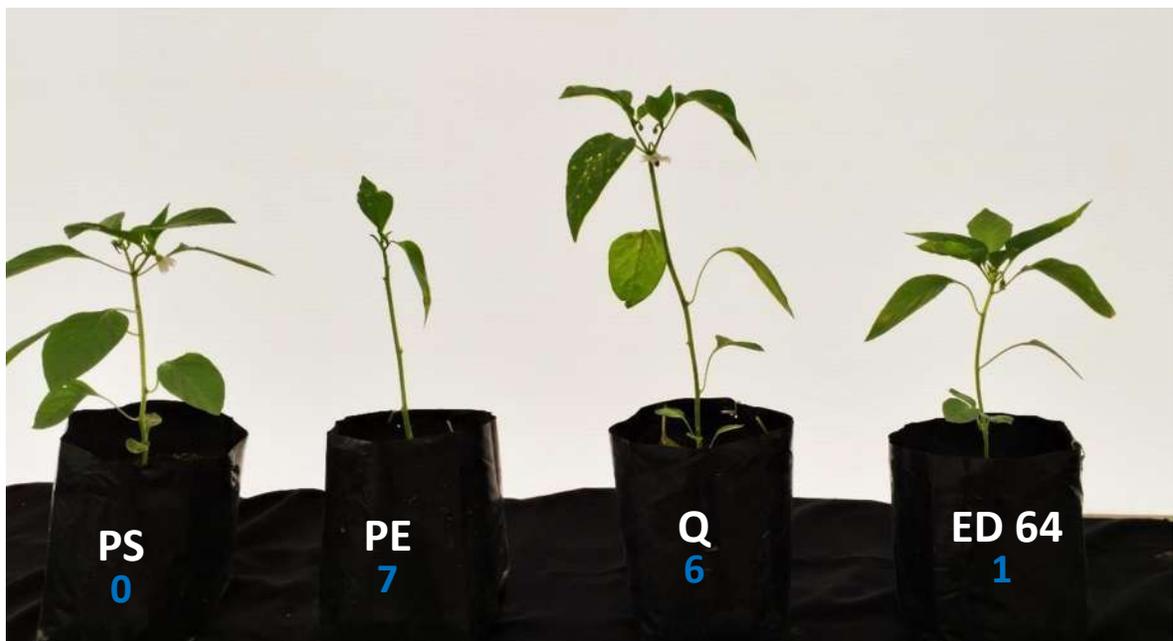


Figura 30. Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED64 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

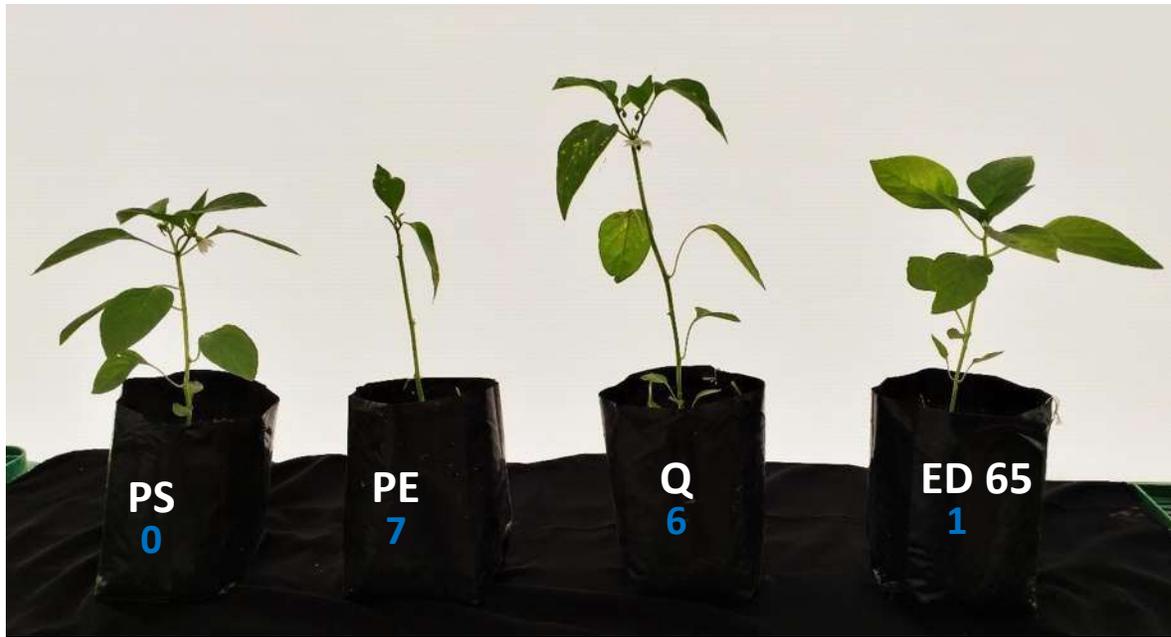


Figura 31. Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED65 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

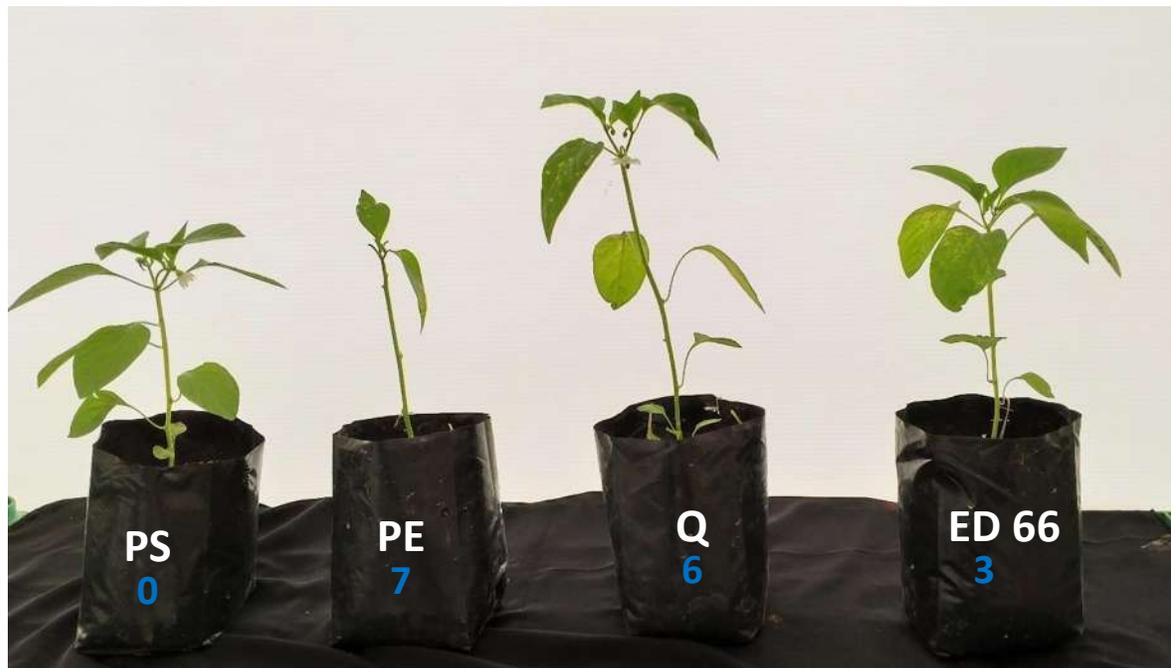


Figura 32. Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED66 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

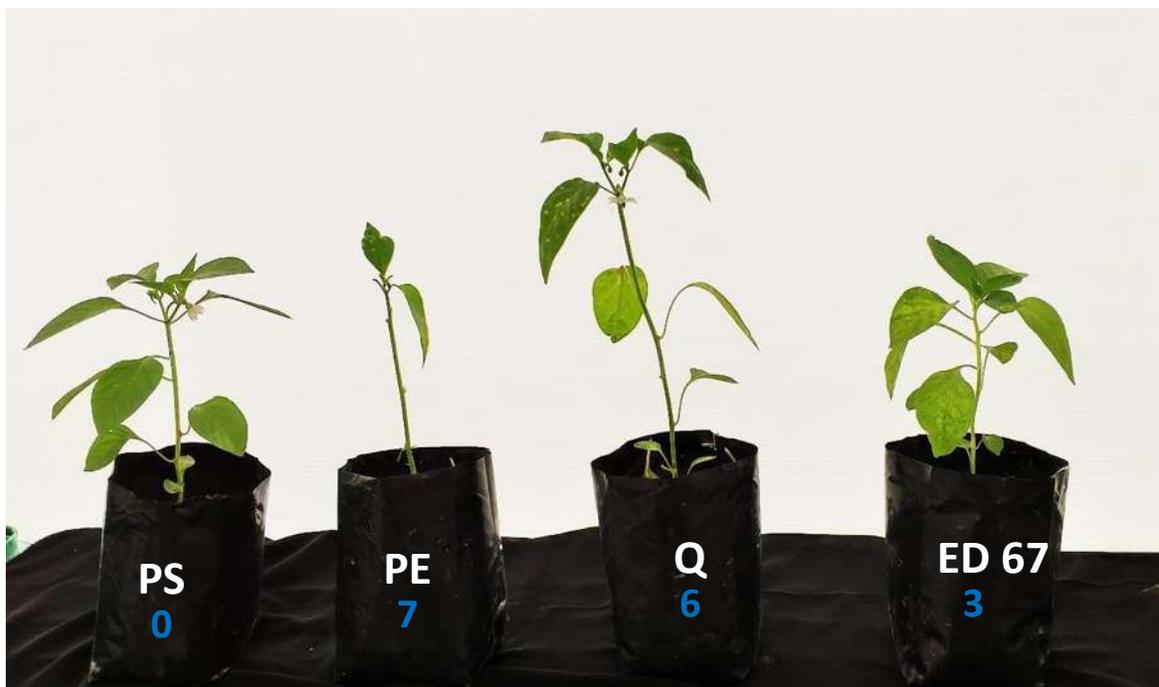


Figura 33. Nivel de severidad obtenido por el extracto de ED67 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

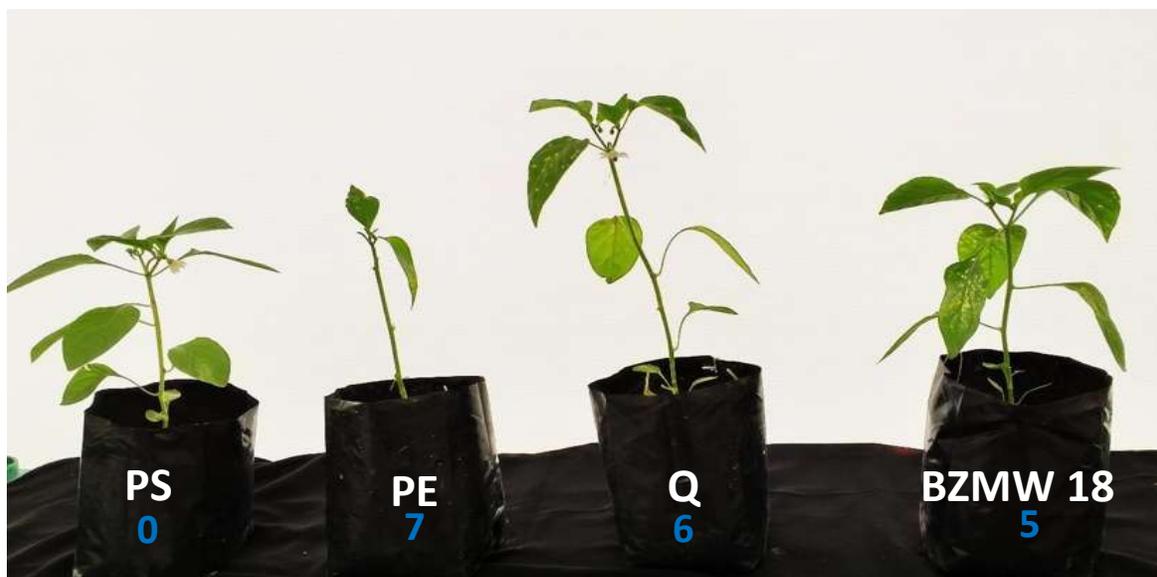


Figura 34. Nivel de severidad obtenido por el extracto de BZMW18 con base en la escala de virulencia en plantas de chile cultivar Becán a 16 días después de la infección con la cepa BV 801 de *Xanthomonas vesicatoria*. PS= planta sana; PE= planta enferma; Q= producto químico.

5.7.3. Variables fisiológicas

Las variables fisiológicas PAR, NPQt, Phi2 y PhiNPQ, debido a la alta variabilidad entre repeticiones (homocedasticidad) en cada uno de los tratamientos no fue posible realizar algún análisis estadístico por lo que solo se presentan los valores medios obtenidos (**Cuadro 2**), a pesar de encontrar diferencias significativas entre tratamientos. La causa probable de tal variabilidad puede ser debido al tiempo que duraba en realizarse cada medición, y por la hora del día, debido a que cambia la intensidad de luz, temperatura y humedad, por lo que no fue posible estandarizar las medidas.

Cuadro 2. Promedio y error estándar de las variables fisiológicas PAR, NPQt, Phi2 y PhiNPQ.

TRATAMIENTOS	PAR	NPQt	PHI2	PhiNPQ
BZMW 18	44.12±6.81	1.88±0.29	0.52±0.02	0.30 ±0.03
BF	33.39±3.23	1.11±0.29	0.56±0.02	0.21±0.03
ED 64	36.28±3.94	1.08±0.20	0.57±0.02	0.22±0.03
ED 65	35.8±3.95	7.02±2.30	0.35±0.05	0.54±0.06
ED 66	38.39±2.83	13.00±7.56	0.34±0.06	0.55±0.08
ED 67	34.85±4.23	3.47±0.68	0.43±0.04	0.43±0.05
EZ 71	44.47±5.75	0.59±0.06	0.58±0.01	0.15±0.01
Q	36.54±4.51	0.66±0.17	0.6±0.01	0.15±0.02
PE	51.47±2.05	0.39±0.03	0.57±0.01	0.12±0.01
PS	37.98±2.45	1.10±0.14	0.56±0.01	0.22±0.02

BF= buffer de fosfatos; Q= químico; PE= planta enferma; PS= planta sana.

5.8. CONCLUSIÓN

En plantas donde se aplicaron extractos de actinomicetos disminuyeron significativamente la pérdida de área foliar y el número de hojas dañadas; así mismo la sintomatología que presentaron fue menor respecto a plantas tratadas con el ingrediente activo *kasugamicina*. Las plantas tratadas con los extractos de las ED64 y ED65, mostraron resultados similares a plantas sanas. Los extractos de actinomicetos, mostraron la capacidad de control biológico.

5.9. BIBLIOGRAFÍA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Bhavani, D. R., Adinarayana, G. (2003). Enfoque metodológico de superficie de respuesta para optimizar los parámetros nutricionales para la producción de neomicina por *Streptomyces marinensis* bajo fermentación en estado sólido *Process Biochemistry*. 38: 1565 – 1572.
- Azman, A.-S., Othman, I., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Goh, B.-H., y Lee, L.-H. (2016). Actividades antibacterianas, anticancerígenas y neuroprotectoras de actinobacterias raras de suelos de manglares. *Indian Journal of Microbiology*, 57 (2), 177-187.
- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Instituto Internacional de Micología CAB; Farnham House, Slough, Reino Unido.
- Boch, J., Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 efectores Family-Type III: descubrimiento y función. *Annu Rev. Phytopathol.* 48: 419–436.
- Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., Cottyn, B. (2016). Caracterización genética de cepas llamadas *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* conduce a una revisión taxonómica del complejo de especies *X. axonopodis*. *Plant Pathol.* 65: 729–806.
- Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H. K., y Thakur, D. (2018). Potencialidad antimicrobiana de actinobacterias aisladas de dos ecosistemas forestales microbiológicamente inexplorados del noreste de la India. *BMC Microbiology*, 18: 71.
- El-Hendawy, H. H., y Azab, E. A. (1999). Caracterización y perfil plasmídico de una cepa inhibitoria de *Erwinia herbicola* aislada de *Phaseolous vulgaris* en Egipto. *Microbiological Research*, 153 (4), 341–348.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2004). Estudios de optimización sobre la producción de neomicina por una cepa mutante de *Streptomyces marinensis* en fermentación en estado sólido. *Process Biochemistry*. 39: 529 – 534.
- Gerlach, R. y Hensel, M. (2007). Sistemas de secreción de proteínas y adhesinas: el arsenal molecular de los patógenos gramnegativos. *Revista Internacional de Microbiología Médica*, 297 (6), 401–415.

- Ibrahim, Y. y Al-Saleh, M. (2012). Primer informe de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.) en Arabia Saudita. *Plant Dis*, 96 (11): 1690.
- Jinhua, C., Yang, S. H., Palaniyandi, S. A., Han, J. S., Yoon, T-M., Kim, T-J., Suh, J. W. (2010) Azalomycin F complex is an antifungal substance produced by *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 isolated from agricultural soil. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53(5):545–552.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N. W. (2004). Reclasificación de las *Xanthomonas* asociadas con la enfermedad de manchas bacterianas de tomate y pimiento. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755–762.
- Lamichhane, J. R. (2014) Enfermedades *Xanthomonas* arboricola de frutales de hueso, almendros y nogales: progreso hacia la comprensión y el manejo. *Plant Dis*. 98, 1600-1610.
- Liu, X., Bolla, K., Ashforth, E. J., Zhuo, Y., Gao, H., Huang, P., Stanley, S. A., Hung, D. T., Zhang, L. (2012) Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. *Antonie Leeuw* 101:55–66.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., y Suh, J.-W. (2013) Efectos de las actinobacterias en la supresión de enfermedades de las plantas y la promoción del crecimiento. *Microbiología Aplicada y Biotecnología*, 97 (22), 9621-9636.
- Richard, D., Boyer, C., Lefeuvre, P., Canteros, B. I., Beni-Madhu, S., Portier, P. y Pruvost, O. (2017). Secuencias completas del genoma de seis cepas de *Xanthomonas* resistentes al cobre que causan la mancha bacteriana de plantas solas, que pertenecen a *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* y *X. vesicatoria*, utilizando la tecnología de lectura larga. *Anuncios del genoma*, 5 (8).
- Rodrigues, J. P., Peti, A. P. F., Figueiró, F. S., *et al.*, (2018). Aislamiento bioguiado, caracterización y optimización de medios para la producción de lisolipinas por actinomiceto como compuesto antimicrobiano contra *Xanthomonas citri subsp. citri*. *Informes de biología molecular*.
- Saha, D., Purkayastha, G. D., Ghosh, A., Isha, M., Saha, A. (2012). Aislamiento y caracterización de dos nuevas cepas de *Bacillus subtilis* de la rizosfera de la berenjena como posibles agentes de biocontrol. *J. Plant Pathol.* 94: 109-118.

Simoh, S., Quintana, N., Kim, H. K., Choi, Y. H. y Verpoorte, R. (1988). En *Biotecnología do Solo: Fundamentos e Perspectivas* (Eds. Siqueira, J. O. y Franco, A. A.).

Yogeswari, S., Ramalakshmi, S., Neelavathy, R., Muthumary, J. (2012). Identificación y estudios comparativos de diferentes fracciones volátiles de *Monochaetia kansensis* por GCMS. *Glob J Pharmacol.* 6: 65–71.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* CON EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE FRIJOL EN CONDICIONES DE INVERNADERO

6.1. RESUMEN

Las plantas, sin importar si están en la naturaleza o en la agricultura, están continuamente expuestas a una gran cantidad de microorganismos. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el agente causante del tizón de halo en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es probablemente el patógeno bacteriano más importante del frijol, observándose en la mayoría de las regiones productoras de frijol en todo el mundo. Es altamente destructiva reduciendo el rendimiento hasta en un 45% y se produjeron pérdidas adicionales debido a la mala calidad de las vainas infectadas. Es indiscutible que se necesitan urgentemente nuevos productos, especialmente antibióticos, para detener y revertir la implacable propagación de agentes patógenos resistentes a los antibióticos. Con el objetivo de evaluar la capacidad de control biológico de los extractos provenientes de actinomicetos sobre el tizón del halo del frijol, se realizó un experimento bajo condiciones de invernadero. Se evaluaron tres extractos provenientes de fermentación sólida, un control positivo (planta enferma) y un control negativo (planta sana). Para la inoculación bacteriana se utilizó la cepa 1448A, asperjando 2 mL de suspensión bacteriana a una $DO_{600} = 2$, mediante aspersión foliar. A los 16 días de inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola*, se evaluaron las variables fitopatológicas: número de hojas con manchas, hojas defoliadas, número de manchas por hoja, además de evaluar el nivel de daño de las plantas mediante una escala cualitativa ordinal de severidad de siete niveles. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de hojas con manchas ($P = 0.00$), en la severidad de la planta ($P = 0.00$) y en el número de manchas por hoja ($P = 0.00$), en las plantas asperjadas con los extractos bioactivos de las cepas ED65, ED66 y ED67, en comparación al tratamiento donde solo se asperjó el inóculo de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (planta enferma). Los resultados de este experimento confirman y demuestran que los extractos de actinomicetos con actividad bactericida son una alternativa viable de control biológico.

6.2. ABSTRACT

Plants, regardless of whether they are in nature or in agriculture, are continuously exposed to a large number of microorganisms. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the causative

agent of halo blight in beans (*Phaseolus vulgaris* L.), is probably the most important bacterial pathogen in beans, being observed in most bean-producing regions worldwide. It is highly destructive reducing yield by up to 45% and additional losses occurred due to the poor quality of infected pods. It is indisputable that new products, especially antibiotics, are urgently needed to stop and reverse the relentless spread of antibiotic resistant pathogens. In order to evaluate the biological control capacity of the extracts from actinomycetes on the bean blight, an experiment was carried out under greenhouse conditions. Three extracts from solid fermentation, a positive control (diseased plant) and a negative control (healthy plant) were evaluated. For bacterial inoculation strain 1448A was used, sprinkling 2 mL of bacterial suspension at an $OD_{600} = 2$, by foliar spray. After 16 days of inoculation with *P. syringae* pv. *phaseolicola*, the phytopathological variables were evaluated: number of leaves with spots, defoliated leaves, number of spots per leaf, in addition to assessing the level of damage of the plants by means of a qualitative ordinal scale of severity of seven levels. The results showed a significant decrease in the number of leaves with spots ($P = 0.00$), in the severity of the plant ($P = 0.00$) and in the number of spots per leaf ($P = 0.00$), in the plants sprinkled with the Bioactive extracts of strains ED65, ED66 and ED67, in comparison to the treatment where only the inoculum of strain 1448A of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (diseased plant). The results of this experiment confirm and demonstrate that actinomycete extracts with bactericidal activity are a viable alternative for biological control.

6.3. INTRODUCCIÓN

El frijol común predomina entre las legumbres más producidas y consumidas en África, India, América Latina y México. Este último es el sitio donde se originaron 47 de las 52 especies clasificadas del género *Phaseolus* (Silva-Cristóbal *et al.*, 2010). La producción de frijoles en todo el mundo en 2017 fue de 31.405 millones de toneladas. Alrededor del 6.39% de la producción se realizó en India, seguido de Myanmar (5.46%), Brasil (3,03%), Estados Unidos (1,62%), China (1.32%), México (1,18%) (FAOSTAT, 2017).

Las plantas, sin importar si están en la naturaleza o en la agricultura, están continuamente expuestas a una gran cantidad de microbios (An *et al.*, 2017). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* es una especie bacteriana generalizada que comprende más de 60 patovares con un amplio intervalo de huéspedes (Young, 2010). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, el agente causante del tizón de halo, es probablemente el patógeno bacteriano más importante del frijol (Rico *et al.*, 2003), observándose en la mayoría de las regiones productoras de frijol en todo el mundo. Esta enfermedad es altamente destructiva reduciendo

el rendimiento hasta en un 45% y se produjeron pérdidas adicionales debido a la mala calidad de las vainas infectadas (Arnold *et al.*, 2011).

Se necesitan urgentemente nuevos productos, especialmente antibióticos, para detener y revertir la implacable propagación de agentes patógenos resistentes a los antibióticos (Talbot *et al.*, 2006). Las bacterias filamentosas que pertenecen al orden *Actinomycetales*, especialmente las cepas de *Micromonospora* y *Streptomyces*, tienen una capacidad única y comprobada para producir nuevos antibióticos (Bentley *et al.*, 2002; Watve *et al.*, 2001), de ahí el continuo interés en la detección de nuevos metabolitos bioactivos en dichos organismos (Berdy, 2005; Lazzarini *et al.*, 2000), ya que los actinomicetos producen metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (Takahashi y Omura, 2003; Blunt *et al.*, 2007). Ejemplo de esto es el estudio de Arora *et al.* (2018) quienes demostraron que la cepa de *Streptomyces sp.* (C-7), producía de manera natural el ácido nalidíxico, que exhibe una potente actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *P. aeruginosa*. Mientras que Al-Dhabi *et al.* (2019) encontraron que la cepa Al-Dhabi-97 de *Streptomyces sp.* mostró actividades antibacterianas pronunciadas contra patógenos Gram positivos y Gram negativos en medios de cultivo sólidos y líquidos suplementados con glucosa como la principal fuente de carbono.

6.4. HIPÓTESIS

La aplicación de extractos de actinomicetos con actividad antibacteriana promoverá un efecto bioprotector contra el tizón de halo en el cultivo de frijol, al disminuir la gravedad y cantidad de síntomas bajo condiciones de invernadero.

6.5. OBJETIVO

- Evaluar la capacidad de control biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* mediante extractos de actinomicetos, en plantas de frijol bajo condiciones de invernadero.

6.6. MATERIALES Y METODOS

Los experimentos de este capítulo se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología e Invernadero del IIAF de la UMSNH. Los materiales biológicos de este capítulo se obtuvieron del Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

6.6.1. Germinación

Se sembró frijol variedad azufrado en macetas de 2 L de capacidad que contenían una mezcla esterilizada (120°C a una presión interna de 103 kPa durante 6 h), de suelo, perlita y vermiculita, en proporción 2:1:1 (v/v).

6.6.2. Inoculo bacteriano de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

La cepa 1448A se cultivó en medio líquido KB, en agitación constante a 200 rpm, a 24°C durante 36 horas, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante cinco minutos y lavó dos veces con agua destilada estéril, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en agua estéril, ajustándose a una $DO_{600} = 2$ (2×10^7 UFC mL⁻¹).

6.6.3. Preparación del inóculo de actinomicetos

Las cepas de actinomicetos ED65, ED66 y ED67 se reactivaron en medio PDA-Y, durante siete días a 28°C. Se transfirieron dos discos de micelio de 7 mm de diámetro a matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 25 mL de medio de cultivo PDB-Y, incubados a 200 rpm, durante cinco días, a una temperatura de 28°C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min; los sedimentos resultantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril.

6.6.4. Fermentación sólida de actinomicetos

Se realizó de acuerdo con la metodología de Ellaiah *et al.* (2004), en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 10 g de sémola humedecida con 12 mL de PDB a pH 7. Se añadieron 2 mL de inóculo (equivalente a 1.2-5.6 mg p / p de masa celular seca), incubándose a 28° C durante 12 días. El extracto bioactivo se obtuvo añadiendo 25 mL de tampón fosfato (8.06 g de NaCl L⁻¹, 0.22 g de KCl L⁻¹, 1.15 g de Na₂HPO₄ L⁻¹, 0.2 g de KH₂HPO₄ L⁻¹) a pH 8.0 (Adinarayana *et al.*, 2003), colocándose en un agitador orbital a 200 rpm durante 1 h, y posteriormente 16 h a 4°C. El contenido de cada matraz se centrifugó a 13000 rpm, durante 20 minutos y finalmente se filtró con membrana de 0,22 µm (MILLEX®GP).

6.6.5. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental de bloques completamente al azar bajo condiciones de invernadero (**Cuadro 3**), donde se evaluaron los extractos bioactivos provenientes de tres cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana (ED65, ED66 y ED67) y dos controles: un control negativo (sin inocular la bacteria Psph), un control positivo al cual solo se le aplicó

el inóculo bacteriano (con Psph), resultando 5 tratamientos con seis repeticiones cada uno. La unidad experimental consistió de una planta de frijol contenido en una maceta.

Cuadro 3. Diseño de tratamientos de control biológico en frijol contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

TRATAMIENTO	EXTRACTO DE ACTINOMICETO
T1	PS, sin extracto sin Psph
T2	ED 65 con Psph
T3	ED 66 con Psph
T4	ED 67 con Psph
T5	PE sin extracto con Psph

PS: planta sana, PE: planta enferma

6.6.6. Inoculación de la cepa fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

A los 56 días después del trasplante (DDT) se asperjó 2 mL a cada planta de una suspensión de la cepa 1448A de *Pseudomonas syringae* a una $DO_{600} = 2$ (2×10^7 UFC mL⁻¹), a cada uno de los tratamientos correspondientes.

6.6.7. Aplicación del extracto bioactivo de actinomiceto

A las 18 horas después de infección (DDI) con la cepa 1448A de *P. syringae* se aplicaron 2 mL de extracto bioactivo de los actinomicetos, por planta obtenidos bajo fermentación sólida.

6.6.8. Variables evaluadas

6.6.8.1. Variables fitopatológicas

Las variables fitopatológicas se muestrearon a los 16 días después de la inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Se determinó el número de hojas con manchas cloróticas o necróticas, el número de hojas defoliadas, el número de manchas por hoja y el nivel de severidad presentado por la planta, a través de una escala cualitativa de severidad Candelas-Delgado (2017).

6.6.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables de crecimiento, fisiológicas y algunas fitopatologías se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un

95% de confianza, estos se realizaron en el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II. El nivel de severidad de la enfermedad se sometió a un análisis no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis y para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se empleó un intervalo de confianza del 95% de la mediana.

6.7. RESULTADOS

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P = 0.00$) en el número de hojas con manchas necróticas a los 56 días después de siembra, en los tratamientos donde se aplicó el extracto de ED65, ED66 y ED67, disminuyendo al menos en un 62% (5 hojas) la presencia de síntomas en comparación con plantas donde solo se asperjó el inoculo de la cepa 1448A (**Figura 35**). Plantas inoculadas con el extracto de ED66 obtuvieron la menor cantidad de hojas necróticas siendo estadísticamente igual al control negativo (planta sana). Existe una disminución en la presencia de hojas con manchas necróticas debido a los compuestos bioactivos que posee el extracto de actinomicetos (Azman *et al.*, 2016), lo cual evita que *Pseudomonas syringae* se propague, pueda ingresar a la planta y se multiplique dentro del apoplasto (Xin y Él, 2013), y aparezcan los síntomas del tizón de halo del frijol (Meng y Zhang, 2013).

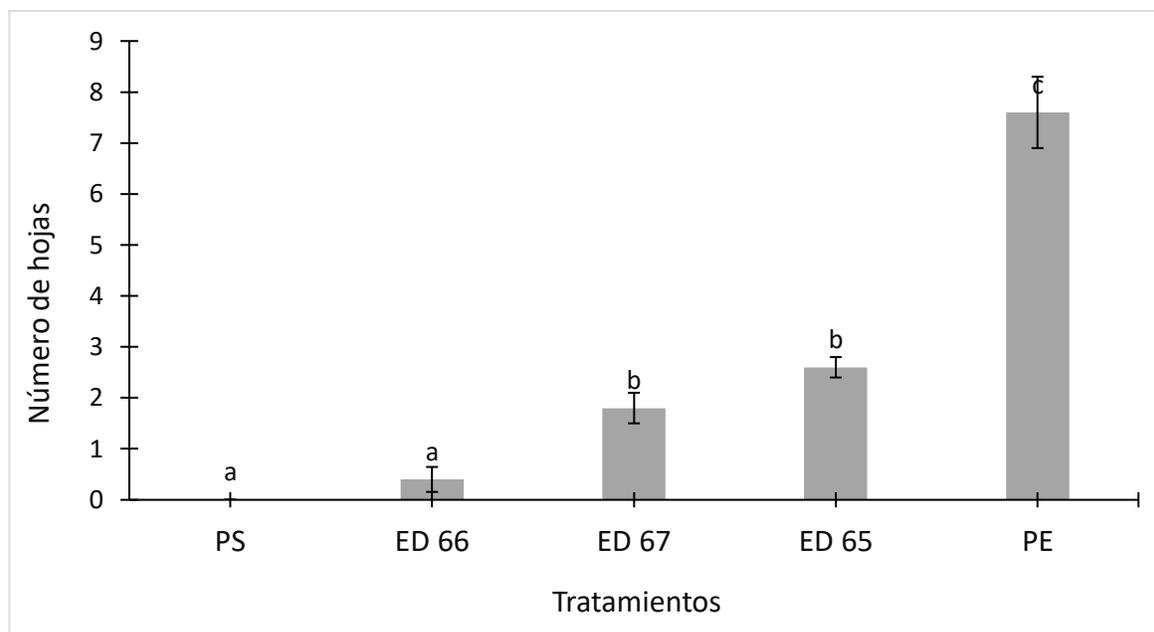


Figura 35. Número de hojas con manchas necróticas 16 días después de la inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Respecto al número de manchas por hoja, el análisis mostró diferencias significativas ($P = 0.00$) entre tratamientos. Se encontró un menor número de manchas por hoja a los 56 días después de siembra en las plantas donde se aplicó el extracto de ED65, ED66 y ED67, disminuyendo significativamente ($P = 0.00$); al menos en un 75% (5 hojas) la presencia de síntomas en comparación al control positivo, donde solo se asperjó el inóculo de la cepa 1448A (**Figura 36**). Las plantas con el extracto de ED66 obtuvieron la menor cantidad de hojas siendo estadísticamente igual al control negativo (planta sana). Existe una disminución en daños debido a la actividad antibacteriana que poseen los extractos de actinomicetos, lo cual ha sido registrado en aislamientos de *Streptomyces* como: *S. virginiae* (virginiamicina); *S.nojiriensis* (estreptotricina); *S. zaomycticus* (zaomicina) y *S. parvulus* (borrelidin) de acuerdo a Miyashiro *et al.*, 1983; Olano *et al.*, 2004; Pulsawat *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013.

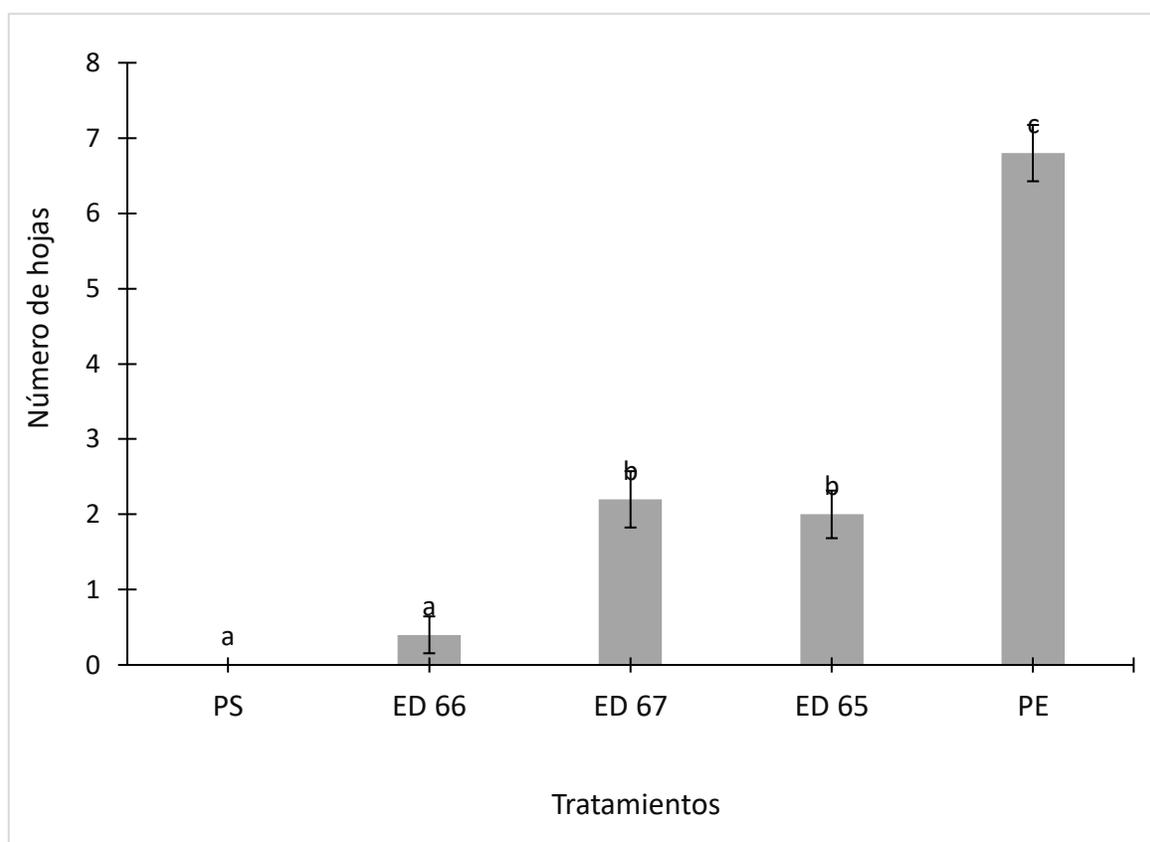


Figura 36. Número de manchas por hoja 16 días después de la inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Para la variable de hojas defoliadas el análisis mostró diferencia ($P = 0.00$), entre los tratamientos (**Figura 37**). No se observó una disminución en la defoliación por la aplicación

de los extractos de actinomicetos, las plantas tratadas con el extracto ED66 presentó la misma defoliación que las plantas sin extractos. Por el contrario, las plantas tratadas con los extractos ED65 y ED67 mostraron una mayor defoliación. Esto es debido posiblemente a un efecto fitotóxico por parte de los extractos de actinomicetos, los cuales pueden generar un desprendimiento foliar, como se encontró en ensayos previos (Figura 21), donde se notó un efecto fitotóxico sobre las plantas de chile asperjadas con el extracto ED64, el cual generó defoliación.

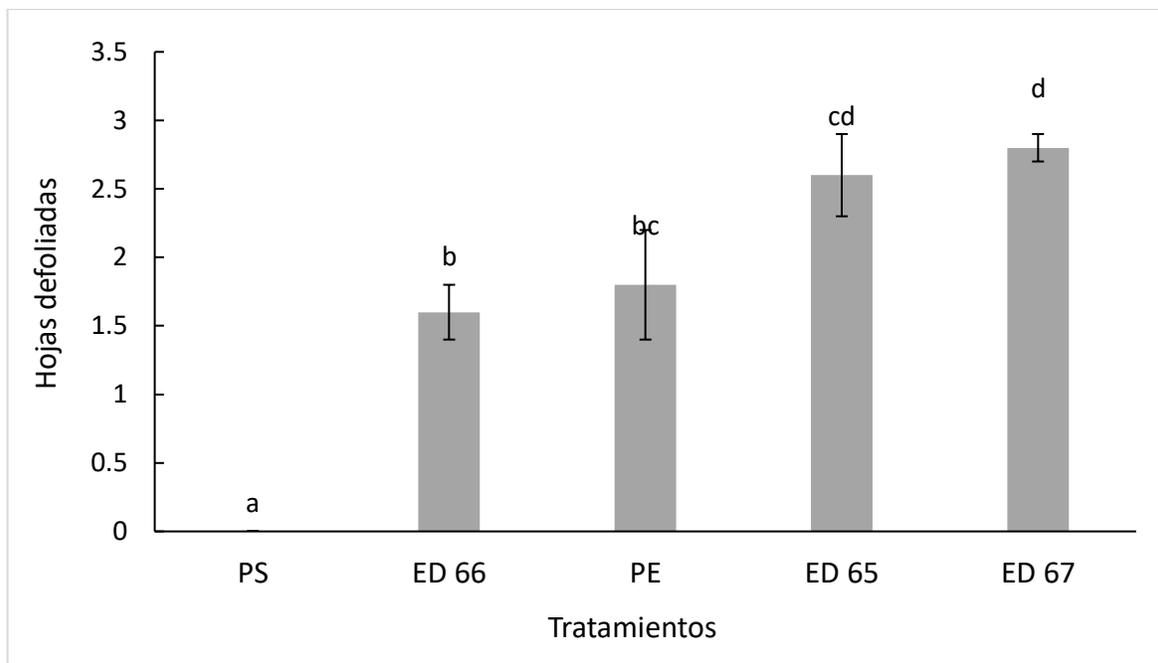


Figura 37. Número de hojas defoliadas 16 días después de la inoculación con *P. syringae* pv. *phaseolicola* en plantas de frijol. PE= planta enferma; PS= planta sana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($P < 0.05$). La línea sobre las barras (I) es el error estándar.

Para la comparación visual en base a la escala de virulencia, el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas (Estadístico = 22.0906, valor-P = 0,0002). Después de la infección de *P. syringae* los extractos bioactivos de las cepas de actinomicetos ED 65, ED 66 y ED 67 presentaron un nivel de severidad menor que el control positivo donde solo se asperjo el inoculo de la cepa 1448A (**Figura 38**), donde el extracto ED66 presentó un nivel de severidad 0 (sana, no inoculada con 1448A), mismo nivel que el tratamiento planta sana. Mientras que la aplicación del extracto ED67 presentó un nivel de severidad 1 (halos: manchas cloróticas o necróticas muy pequeñas) y el extracto ED65 un nivel de severidad 2 (manchas cloróticas con necrosis en el centro). Se manifestó síntomas

de la enfermedad únicamente en las hojas viejas y maduras (**Figura 39-40**), a pesar de haber asperjado por completo la planta, debido a que son más susceptibles que las hojas jóvenes. Se requiere de condiciones ambientales adecuadas, como temperatura y humedad, para obtener un mayor crecimiento epifito de la bacteria *P. syringae* (Hirano y Upper, 2000), multiplicación agresiva dentro del apoplasto (Xin *et al.*, 2016), y temperatura no mayor a (Smirnova *et al.*, 2001), situación que no se tuvo, y por tanto, no se obtuvo un crecimiento agresivo de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

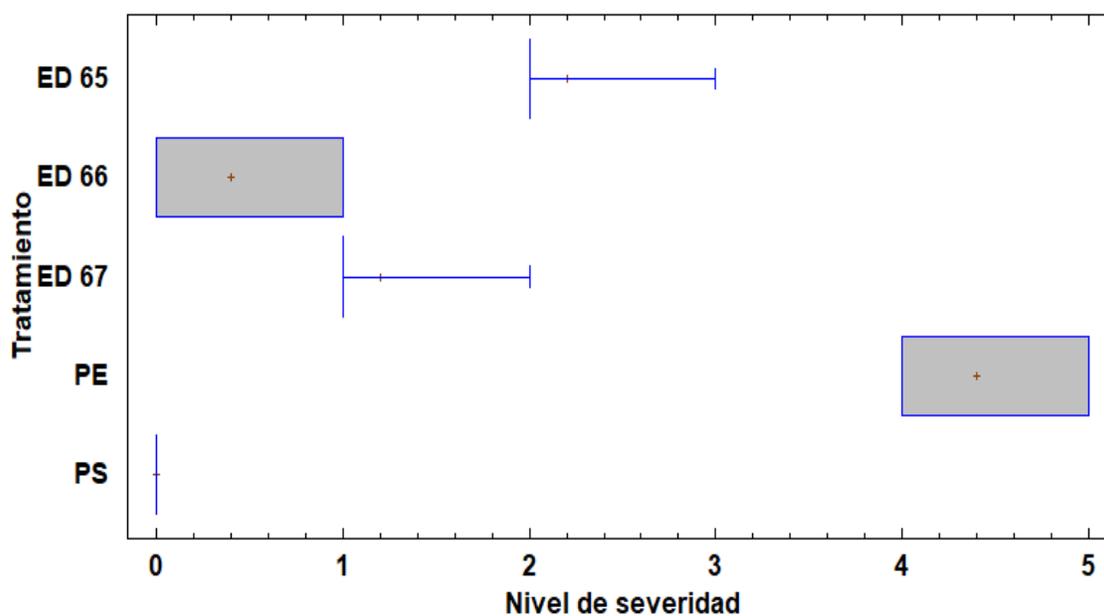


Figura 38. Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de frijol a 16 después de la inoculación de *P. syringae*. PE= Planta enferma; PS= Planta sana.

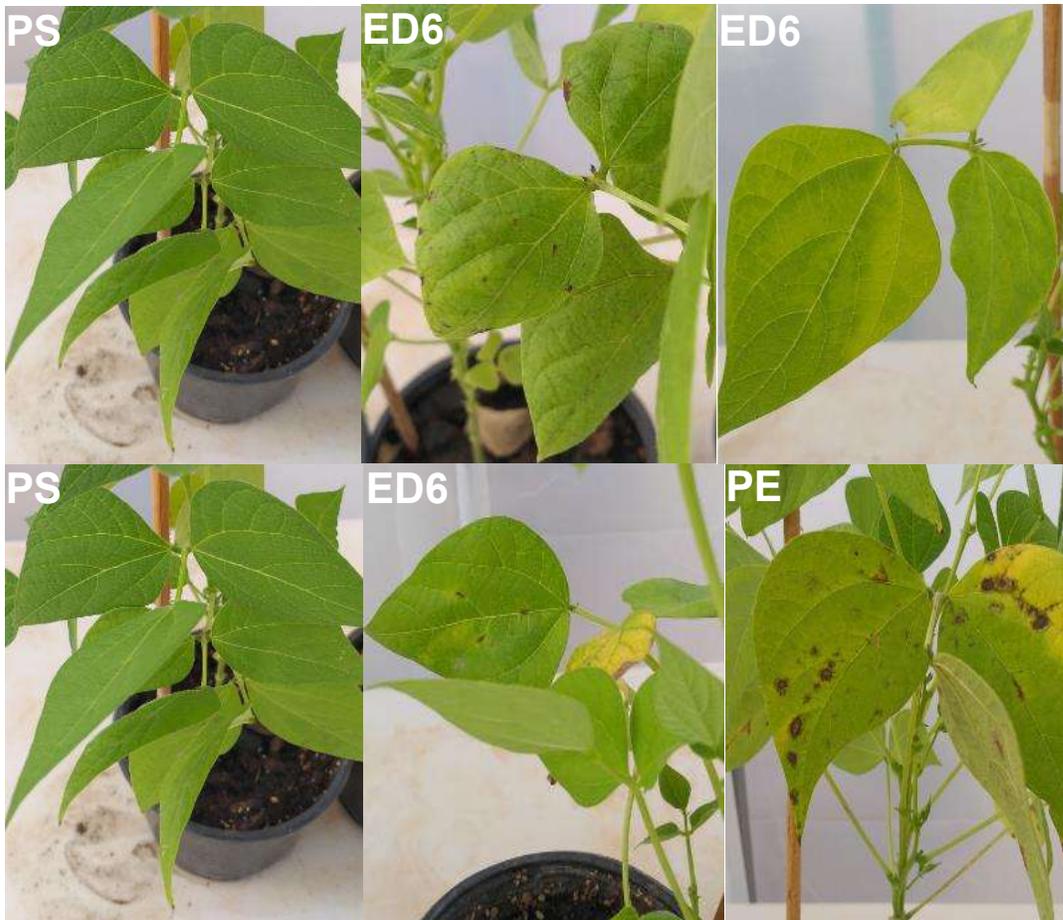


Figura 39. Nivel de severidad obtenido por los extractos de ED67, ED66 y ED65 después de la infección con la cepa 1448A de *P. syringae* pv. *phaesolicola*. PS= planta sana; PE= planta enferma.



Figura 40. Nivel de severidad obtenido por los extractos de ED67, ED66 y ED65 con base en la escala de virulencia en frijol a 16 días después de la infección con la cepa 1448A de *P. syringae*. PS= planta sana; PE= planta enferma.

6.8. CONCLUSIÓN

En plantas donde se aplicaron extractos de actinomicetos disminuyeron significativamente el número de hojas dañadas; la presencia de manchas por hoja, y el número de hojas defoliadas, así mismo la sintomatología que presentaron fue menor respecto al control planta enferma. Las plantas tratadas con el extracto ED66, mostró resultados similares a la planta sana en cuanto a número de hojas dañadas. Los extractos de actinomicetos, mostraron la capacidad de control biológico, a pesar de tener daños por fitotoxicidad.

6.9. BIBLIOGRAFÍA

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Bhavani, D. R., Adinarayana, G. (2003). Enfoque metodológico de superficie de respuesta para optimizar los parámetros nutricionales para la producción de neomicina por *Streptomyces marinensis* bajo fermentación en estado sólido *Process Biochemistry*. 38: 1565 – 1572.
- An, C., Wang, C. y Mou, Z. (2017). El complejo Arabidopsis Elongator es necesario para la resistencia no hostil contra los patógenos bacterianos *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121. *Nuevo fitólogo*, 214 (3), 1245-1259.
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W. y Mansfield, J. W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: de 'has bean' a supermodelo. *Mol. Plant Pathol.* 12: 617-627.
- Arora, N., Kumar, S., Satti, N. K., Ali, A., Gupta, P. y Katoch, M. (2018). Una cepa de *Streptomyces* sp. aislado del suelo rizosférico de *Crataegus oxyantha* produciendo ácido nalidíxico, un antibiótico sintético. *Revista de Microbiología Aplicada*, 124 (6), 1393–1400.
- Azman, A.-S., Othman, I., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Goh, B.-H., y Lee, L.-H. (2016). Actividades antibacterianas, anticancerígenas y neuroprotectoras de actinobacterias raras de suelos de manglares. *Indian Journal of Microbiology*, 57 (2), 177-187.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thompson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., et al. (2002). Secuencia completa del genoma del modelo actinomiceto *Streptomyces coelicolor* A3 (2) *Nature*. 417: 141-147.

- Bérdy, J. (2005). Metabolitos microbianos bioactivos. *J. Antibiot.* 58: 1–26.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2007). Productos marinos naturales. *Nat. Pinchar. Rep.* 24: 31-86.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2004). Estudios de optimización sobre la producción de neomicina por una cepa mutante de *Streptomyces marinensis* en fermentación en estado sólido. *Process Biochemistry.* 39: 529 – 534.
- FAO Estadísticas de Frijol Seco. [(consultado el 17 de diciembre de 2019)]; Disponible en línea: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Hirano, S. S. y Upper, C. D. (2000). Bacterias en el ecosistema de la hoja con énfasis en *Pseudomonas syringae* --- un patógeno, núcleo de hielo y epífita. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 624-653.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F. (2000). Géneros raros de actinomicetos como productores potenciales de nuevos antibióticos. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 388–405.
- Meng, X. y Zhang, S. (2013). MAPK en cascada en la señalización de resistencia a enfermedades de plantas. *Annu Rev Phytopathol.* 51: 245–66.
- Miyashiro, S., Ando, T., Hirayama, K., Kida, T., Shibai, H., Murai, A., Shio, T., Udaka, S. (1983). Nuevos antibióticos del grupo de estreptotricina, AN-201 I y II. *J Antibiot.* 36:1638-1643.
- Olano, C., Wilkinson, B., Sánchez, C., Moss, S. J., Sheridan, R., Math, V., Weston, A. J., Braña, A. F., Martin, C. J., Oliynyk, M., Méndez, C., Leadlay, P. F., Salas, J. A. (2004). Biosíntesis del inhibidor de la angiogénesis borrelidina por *Streptomyces parvulus* Tü4055: análisis de conglomerados y asignación de funciones. *Chem Biol.* 11: 87–97.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Nihira, T. (2007). Caracterización del grupo de genes biosintéticos para la producción de virginiamicina M, un antibiótico de estreptogramina tipo A, en *Streptomyces virginiae*. *Gene.* 393: 31-42.
- Rico, A., López, R., Asensio, C., Aizpún, M. T., Asensio, S., Manzanera, M. C. y Murillo, J. (2003). Cepas no toxigénicas de *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* es una

- causa principal de aureola del frijol en España y escapa a los métodos de detección actuales. *Phytopathology* 93: 1553-1559.
- Silva-Cristóbal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J., Bello-Pérez, L. A. (2010). Composición química, digestibilidad de carbohidratos y capacidad antioxidante de las variedades mexicanas de frijoles negros, garbanzos y lentejas cocidas [Composición química, digestibilidad de carbohidratos, y capacidad antioxidante de variedades mexicanas cocidas de frijol negro, garbanzo, y lenteja] *CyTA J. Food.* 8: 7–14.
- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K.,... Ullrich, M. (2001). Expresión termorregulada de factores de virulencia en bacterias asociadas a plantas. *Archivos de microbiología*, 176 (6), 393–399.
- Takahashi, Y. y Omura, S. (2003). Aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos para la detección de nuevos compuestos bioactivos. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49 (3), 141-154.
- Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J. G. (2006). Bad Bugs Need Drugs: una actualización sobre la línea de desarrollo del grupo de trabajo de disponibilidad de antimicrobianos de la sociedad de enfermedades infecciosas de América. *Clin. Infectar. Dis.* 42: 657–668.
- Wang, D. S., Xue, Q. H., Zhu, W. J., Zhao, J., Duan, J. L., Shen, G. H. (2013). La irradiación por microondas es una herramienta útil para mejorar el aislamiento de actinomicetos del suelo. *Microbiología*. 82: 102-110.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. (2001). Cuántos antibióticos produce el género *Streptomyces*. *Arco. Microbiol.* 176: 386–390.
- Xin, X. F., Él, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000: un patógeno modelo para sondear la susceptibilidad a enfermedades y la señalización hormonal en plantas. *Annu Rev Phytopathol.* 51: 473–98.
- Xin, X. F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, AC, Yao, J., Boutrot, F., ... He, SY (2016). Las bacterias establecen un espacio vital acuoso en plantas cruciales para la virulencia. *Nature*, 539 (7630), 524-529.
- Young, J. M. (2010). Taxonomía de *Pseudomonas syringae*. *J. Plant Pathol.* 92: S1.5-S1.14.

VII. DISCUSION GENERAL

Los actinomicetos son un grupo de bacterias del suelo con amplio potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de enfermedades de plantas (Franco-Correa, 2008). La búsqueda de nuevas cepas con actividad antimicrobiana contra agentes fitopatógenos ha tomado un mayor interés principalmente por la gran diversidad de antibióticos, compuestos bioactivos y enzimas extracelulares que inhiben el crecimiento y desarrollo de muchos agentes fitopatógenos de importancia económica (Evangelista-Martínez, 2011), entre ellos *Xanthomonas vesicatoria* agente causal de la mancha foliar bacteriana (Constantin *et al.*, 2016). Los resultados mostrados en el primer capítulo de éste trabajo, permitieron comprobar la hipótesis de que diferentes cepas de actinomicetos tienen capacidad para inhibir el crecimiento de diferentes bacterias fitopatógenas en condiciones *in vitro*. Donde el 91% de las cepas de actinomicetos evaluadas presentaron actividad antimicrobiana contra al menos una bacteria fitopatógena en confrontación dual, destacando la cepa ED 65 que inhibió el crecimiento de *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaesolicola*, *Dickeya dadantii*, y *Erwinia amylovora*, en un porcentaje mínimo del 71%. Estos resultados confirman que los actinomicetos especialmente el género *Streptomyces* tiene cualidades para el biocontrol de patógenos, debido a su intensa actividad antagonista a través de la producción de varios metabolitos (Xiao, 2002).

Con base en lo anterior los actinomicetos son potencialmente aplicables como agentes de control biológico de enfermedades de plantas, ya que los microorganismos antagonistas como los actinomicetos exhiben varios mecanismos que incluyen la producción de antibióticos, enzimas que degradan la pared celular y parasitismo e inducción de resistencia del huésped (Palaniyandi *et al.*, 2013). Sin embargo, para realizar una aplicación de extractos de actinomicetos *in planta*, es necesario realizar ensayos de confrontación *in vitro*, con la finalidad de determinar si existe la producción y extracción de compuestos activos, y si el tipo de actividad es bactericida, bacteriostático o ambos. En este sentido los resultados del capítulo dos de esta tesis mostraron que los extractos de cepas de actinomicetos obtenidos bajo fermentación líquida y semisólida no presentan actividad bactericida, debido a que la producción de metabolitos secundarios es un proceso influenciado por varios factores físico-químicos que incluyen el suministro de nutrientes, la oxigenación, la temperatura y el pH (Olano *et al.*, 2008), y correlacionada con la etapa de esporulación la cual requiere de ciertas condiciones para activarse (Jones y Elliot, 2017), condiciones que

no se logró bajo fermentación líquida y semisólida, que le permitieran completar su ciclo de vida. Se presentó actividad bactericida en todas las bacterias fitopatógenas únicamente bajo la fermentación sólida. Estos resultados corroboran y reafirman los obtenidos por Ellaiah *et al.* (2004) quienes mostraron que la fermentación sólida condujo a una mayor producción de neomicina que bajo fermentación líquida o sumergida, mediante una cepa de *Streptomyces marinensis*, mientras que Castilho *et al.* (2000) encontraron que la producción de lipasa por *Penicillium restrictum* resultó económicamente más ventajosa en fermentación sólida que en fermentación líquida.

Se buscó identificar si en el extracto de ED65 existen uno o más compuestos con actividad bactericida contra *Xanthomonas vesicatoria*, para lo cual se realizó una bioautografía directa combinada con cromatografía en capa fina (TLC), un método de detección rápido y sensible para la detección de compuestos antimicrobianos, utilizando sistemas de disolventes de baja, mediana y alta polaridad. Se generó movilidad y separación de compuestos con los distintos sistemas de disolventes. La bioautografía permitió identificar más de un compuesto activo, obteniendo mayor movilidad de los compuestos activos con un sistema de disolventes de polaridad media a alta, logrando con los sistemas Metanol: Agua 6: 4; Metanol: Acetona 9: 1; y Metanol: Agua: Acetona 6:2:2 separar y movilizar al menos un compuesto activo.

Para corroborar lo observado *in vitro* se debe realizar ensayos *in planta*, para lo cual se necesita tener bien caracterizada la enfermedad bajo las condiciones de experimentación, por tanto, en el capítulo cuatro se generó una escala cualitativa de severidad, ya que determinar la gravedad de la enfermedad en las plantas es fundamental en muchos aspectos, principalmente en estudios de patología vegetal. Siendo la evaluación visual el método que se usa más ampliamente para evaluar la gravedad de una enfermedad, ya que, por medio de esta, es posible estimar de forma visual el área enferma o una sintomatología específica en una hoja u otro órgano vegetal respecto a una planta sana.

En el capítulo cinco se encontró que los extractos provenientes de las cepas ED64, ED65 y ED66, presentaron una pérdida en área foliar y peso seco menor a la obtenida por el ingrediente activo kasugamicina, donde el grado de defoliación y fitotoxicidad fueron las variables de mayor influencia, ya que, a pesar de presentar el mismo número de hojas en algunos tratamientos, la fitotoxicidad retardo el crecimiento, el tamaño de la hoja y, por tanto, el peso seco, lo cual se corrobora con el estudio de El-Hendawy *et al.* (1999), donde inocularon hojas de tomate con *Xanthomonas*, y obtuvieron como resultó una reducción

significativa en el peso fresco y seco de las plantas de melón como resultado de la inoculación con el patógeno bacteriano. Después de la inoculación de *Xanthomonas vesicatoria*, las plantas inoculadas presentaron síntomas de la enfermedad, donde se obtuvo una hoja con manchas cloróticas con la aplicación de los extractos ED64 y ED65, mientras que el ingrediente activo Kasagamicina (5 hojas) presentó 2 hojas con manchas cloróticas menos que el control planta enferma (7 hojas). El extracto de BZMW18, a pesar de no presentar actividad *in vitro* antes de la aplicación logró obtener la misma cantidad de hojas con manchas cloróticas que el control químico. El buffer de fosfatos no influyó en la manifestación de los síntomas del agente causal *Xanthomonas vesicatoria*. Situación similar encontró Ibrahim y Al-Saleh, (2012) al inocular plantas de pimiento de cuatro semanas de edad (10^8 UFC / ml), y rociar agua destilada estéril como tratamiento de control negativo. Situación similar se obtuvo contra *Pseudomonas syringae* en el capítulo seis donde la aplicación de extractos bioactivos genera una disminución en el número de manchas por hojas y el número de hojas con síntomas en plantas de frijol. Siendo resultados relevantes que reafirman lo encontrado por Rodríguez *et al.* (2018), quienes encontraron que el extracto de la cepa Caat 1-54 de *Streptomyces sp.* fue eficaz en la prevención de lesiones del cítrico cuando se pulveriza en árboles de vivero de naranja dulce antes de la aplicación del inóculo *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, donde el número de lesiones del cítrico/cm² en las hojas de los árboles tratados con el extracto Caat 1-54 fue significativamente menor (80–93%) que en los árboles rociados con agua o DMSO.

VIII. CONCLUSIÓN GENERAL

Se encontró actividad bactericida en 41 cepas de actinomicetos al ser evaluadas frente a cuatro especies de bacterias fitopatógenas. Solo los extractos provenientes de fermentación sólida lograron inhibir el crecimiento de las bacterias fitopatógenas en distinta proporción. El actinomiceto ED 65 presentó el mayor porcentaje de inhibición en las cuatro especies de bacterias fitopatógenas en estudio, mostrando valores muy similares a los obtenidos por el antibiótico "sulfato de gentamicina". Cada cepa de actinomiceto mostró respuesta distinta de una bacteria a otra.

Los extractos de actinomicetos con actividad bactericida son una alternativa viable de control biológico del tizón de halo en frijol azufrado, generando disminución en el número de manchas necróticas por hoja y el número de hojas con manchas necróticas. Encontrando un mayor control con el extracto ED 66, donde se redujo a cero el número de hojas con manchas

necróticas. Mientras que en plantas de Chile se obtiene una disminución en el número de manchas cloróticas y necróticas en comparación al químico Kasumin®. Obteniendo los mejores resultados con el extracto de ED 65, donde no se presentan manchas necróticas, ni hojas defoliadas. Se encontró correlación de los resultados obtenidos *in vitro* a los de *in planta*, las cepas que generaron mayor porcentaje de inhibición en crecimiento *in vitro* obtuvieron mayor control biológico *in planta*.

IX. PERSPECTIVAS

Ante los resultados encontrados en este trabajo, es necesaria la evaluación de los extractos de actinomicetos en condiciones de campo donde la interacción de múltiples factores bióticos y abióticos pudiera afectar el biocontrol de esta enfermedad. Además de evaluar *in vitro* la promoción de crecimiento de las cepas en estudio, y de existir evaluar esta promoción bajo condiciones de invernadero y campo, donde se requiere de un manejo integrado.

La aplicación de extractos de actinomicetos en el control biológico de la mancha bacteriana de Chile constituye una herramienta importante en el desarrollo de nuevas estrategias de manejo dentro de la agricultura sustentable, pero hace falta identificar los compuestos activos, en la mayoría de las cepas, debido a que el efecto antimicrobiano está en función de las cepas fitopatógena, la condición de manejo y la especie vegetal evaluada.

Asimismo, se sugiere la evaluación de los extractos de las cepas de actinomicetos restantes, en condiciones *in planta*. Además, es necesaria la identificación de las especies de actinomicetos con mayor actividad.

X. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

Alexander, M. (1997). Introducción a la microbiología del suelo; Krieger Publishing Company: Malabar, India. pag. 467.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43

Behal, V. (2000). Productos bioactivos de *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* 47, 113157.

- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., Sessitsch, A. (2014). Potencial metabólico de las bacterias endofíticas. *Curr. Opin. Biotecnología*. 27, 30–37.
- Castilho, L. R., Polato, C. M. S., Baruque, E. A., Sant'Anna, G. L., Freire, D. M. G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4, 239–247.
- Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., Cottyn, B. (2016). Caracterización genética de cepas llamadas *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* conduce a una revisión taxonómica del complejo de especies *X. axonopodis*. *Plant Pathol.* 65: 729–806.
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., Adinarayana, K. (2004). Estudios de optimización sobre la producción de neomicina por una cepa mutante de *Streptomyces marinensis* en fermentación en estado sólido. *Process Biochemistry*. 39: 529 – 534.
- Elliot, M. A., Buttner, M. J., Nodwell, J. R. (2008). Desarrollo multicelular en *Streptomyces*. En: Whitworth D, editor. *Mixobacterias: multicelularidad y diferenciación*. ASM Press. pp. 419–439.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 1639-1647
- Franco-Correa, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR de actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral, Universidad de Granada 261 p.
- Hopwood, D. (2007). *Streptomyces* en Nature and Medicine: The Antibiotic Makers ; Oxford University Press: Oxford, Reino Unido. pag. 260.
- Gupta, R., Saxena, R. K., Chaturvedi, P., Virdi, J. S. (1995). Producción de quitinasa por *Streptomyces viridificans*: su potencial en la lisis de la pared celular fúngica. *J. Appl. Bacteriol* 1995, 78 , 378–383.
- Kannan, V., Bastas, K., Devi, R. (2015). "Impacto científico y económico de las bacterias fitopatógenas ", en *Enfoques sostenibles para controlar las bacterias patógenas de las plantas*, eds Kannan RV, 369–392.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012) Top 10 bacterias patógenas de plantas en patología molecular de plantas. *Mol. Plant Pathol.* 13 614–629.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., y Suh, J.-W. (2013) Efectos de las actinobacterias en la supresión de enfermedades de las plantas y la promoción del crecimiento. *Microbiología Aplicada y Biotecnología*, 97 (22), 9621-9636.
- Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., Araújo, J. M. (2012). Antibióticos producidos por *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* 16: 466–471.
- Rodrigues, J. P., Peti, A. P. F., Figueiró, F. S., et al., (2018). Aislamiento bioguiado, caracterización y optimización de medios para la producción de lisolipinas por actinomiceto como compuesto antimicrobiano contra *Xanthomonas citri subsp. citri*. *Informes de biología molecular*.
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., Hutchings, M. I. (2012). *Streptomyces* como simbioses: ¿Un tema emergente y generalizado? *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 862–876.
- Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., Nadeem, M., Irfan, M., Qureshi, F. A. (2013). Producción de avermectina B1b a partir de *Streptomyces avermitilis* 41445 por fermentación sumergida por lotes. *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 7198.
- Strange, R. N. y Scott, P. R. (2005). Enfermedades de las plantas: una amenaza para la seguridad alimentaria mundial. *Revisión anual de fitopatología*, 43 (1), 83-116.
- Sousa, S. C., Soares, F. A. C., Garrido, S. M. (2008). Caracterización de estreptomicetos con potencial para promover el crecimiento de las plantas y el biocontrol. *Sci. Agricola.* 65, 50–55.
- Tanaka, Y., Omura, S. (1993). Compuestos agroactivos de origen microbiano. *Annu Rev. Microbiol.* 47, 57–87.
- Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M., Takeuchi, T. (1965). Un nuevo antibiótico, la kasugamicina. *J. Antibiot.* 18, 101-103.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D. y Stefani, E. (2018). Fomento del crecimiento de las plantas y actividad de control biológico de *Streptomyces spp.* como endófitos. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 19 (4), 952.

Xiao, K., Kinkel, L. L., Samac, D. A. (2002). Control biológico de pudriciones de raíz de *Phytophthora* en alfalfa y soja con *Streptomyces*. Biol. Controlar. 23, 285–295.

XI. ANEXOS

- Constancia de trabajos desarrollados en esta tesis presentados en foros y congresos

Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agroprecuarias 2018

La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a través de los Programas Institucionales de Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas otorga la presente

CONSTANCIA A:

JUAN CARLOS RICO AGUILAR, EVANGELINA QUINONES AGUILAR, GABRIEL RINCÓN ENRIQUEZ, JOSÉ LUCIANO MORALES GARCÍA, NURIA GÓMEZ DORANTES, LUIS LÓPEZ PÉREZ

POR SU PARTICIPACIÓN
CON EL TRABAJO:

ANÁLISIS DE METABOLITOS PROVENIENTES DE ACTINOMICETOS PARA EL CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

EN EL 9º FORO ACADÉMICO DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPRECURIARIAS
realizado los días 12 y 13 de diciembre del 2018

Rosa Elva Norma del Río Torres
DRA. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES
COORDINADORA GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Esperanza Melendez Herrera
DRA. ESPERANZA MELENDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Liliana Márquez Benavides
DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias



La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la Coordinación General de Estudios de Posgrado a través de los Programas Institucionales de Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas otorga la presente:

CONSTANCIA A:

Juan Carlos Rico Aguilar, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez, Nuria Gómez Dorantes, Jose Luciano Morales García, Luis López Pérez

POR SU PARTICIPACIÓN

En 10º Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias, los días 27 y 28 de noviembre del 2019, en la ciudad de Morelia, Michoacán.

CON LA PONENCIA TITULADA

CONTROL BIOLÓGICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS POR ACTINOMICETOS



DR. LUIS FELIPE MENDOZA CUENCA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

DRA. ESPERANZA MELENDEZ HERRERA
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS





**SOCIEDAD MEXICANA
DE FITOPATOLOGÍA A.C.**

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Juan Carlos Rico-Aguilar, Cecilia Guízar-González, Gabriel Rincón-Enríquez, José Luciano Morales-García, Nuria Gómez-Dorantes, Luis López-Pérez, Evangelina E. Quiñones-Aguilar

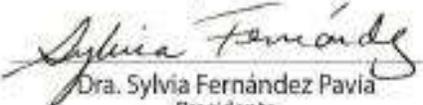
Por su participación con la presentación oral:

**CONTROL BIOLÓGICO DE BACTERIAS
FITOPATÓGENAS MEDIANTE ACTINOMICETOS
EN CONDICIONES *IN VITRO***

**XXI Congreso Internacional
& XLVI Congreso Nacional**

del 24 al 28 de agosto 2019

Morelia, Michoacán


Dra. Sylvia Fernández Pavia
Presidente

Mesa Directiva 2018 - 2020



- Publicación de un artículo científico

Rico-Aguilar, J. C., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., Guizar-Gonzalez, C., Morales-García, J. L., Gómez-Dorantes, N. López-Pérez, L. (2019). Escala de severidad cualitativa de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán. *Biotechnología y Sustentabilidad*. 4 (1). 47-54. ISSN 2448-7562.

Disponible en: <<http://revistas.uaz.edu.mx/index.php/bioteconologiaysust/article/view/680>>.

Biotechnología y Sustentabilidad

Revista de la Red Nacional de Cuerpos Académicos
«Biotechnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable»

Año 4 / Número 1 / Diciembre 2019

ISSN: 2448-7562

Desarrollo de síntomas en plantas de chile cultivar Becán, infectadas con la cepa Bv801 de *Xanthomonas vesicatoria*. A, planta sana; B - G, plantas con nivel creciente de la enfermedad. Autor: Juan Carlos Rico Aguilar.

- Escala no paramétrica para cuantificar síntomas del tizón de halo en plantas de frijol.

Hoja de los cotiledones	Hoja trifoliada	Descripción	Valor en una escala cualitativa ordinal	
		Sanas (no inoculada con 1448A)	0	
		Halos; manchas cloróticas o necróticas muy pequeñas	1	
		Manchas cloróticas con necrosis en el centro	2	
		Punto necrótico más grande pero aún se distingue el halo	3	
		Necrosis extendida	4	
		Puntos necróticos unidos a otros	5	
		Muerte total	6	<hr/>