

Caracterización de microorganismos de suelo agrícola sobre el biocontrol de la roya de la frambuesa.

Álvarez Rosales R.¹, Reyes Nava L. A.¹, Miranda Isaías I.¹, Pliego Sandoval J. E.¹, Iñiguez Muños L. E.¹

¹Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva No. 883, Colonia Centro, 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Tel: +52 (341) 575 2222. luis.reyes@cusur.udg.mx

Palabras clave: aislamiento, endoglucanasa, antagonismo

Introducción.

La roya de la frambuesa es una enfermedad provocada por el hongo *Pucciniastrum americanum*. Esta enfermedad provoca principalmente una alta afectación en la producción de berries ya que no solo afecta a la planta y a su desarrollo, sino que también a los frutos que produce, que son la base de la producción primaria de los alimentos. La exportación de estas frutillas implica que vayan libres de enfermedades y plagas, es decir, que cumplan con los criterios de inocuidad que se exigen en cada país donde se exporta. El hongo (*Pucciniastrum americanum*) causante de esta enfermedad es una especie de fitopatógeno que se distribuye en áreas con climas muy fríos y tiene un ciclo heteroico y macrocíclico. Esta enfermedad ataca hojas, pedicelos, cálices y frutos. Este hongo se ubica en la clase Basidiomycetes, subclase Teliomycetes, Orden Uredinales y familia Melampsoraceae y debido a que en México la roya es una enfermedad de importancia en la frambuesa roja las estrategias de manejo para esta son muy importantes [1].

La frambuesa roja y otras bayas son apreciadas por su alto valor sensorial y sus compuestos nutricionales, ya que son ricas en compuestos fenólicos como antocianinas, ácido elágico y vitamina C [2]. Debido a que esta es una enfermedad que genera un daño fuerte de defoliación, la fruta pierde calidad por el proceso de estrés. Las hojas atacadas ya no se recuperan, así que la meta es que las nuevas hojas crezcan sin infección. Cuando afecta directamente la fruta se producen los mayores daños ya que se cubren de pústulas amarillo-anaranjadas quedando inservibles para el consumo.

Los microorganismos con potencial biocontrol sobre patógenos que afectan en la agricultura han adquirido una gran importancia gracias al aumento en las exigencias de las normas de producción de los alimentos y la propia exigencia de los consumidores, quienes a menudo buscan productos más sanos y libres de agroquímicos. La buena sostenibilidad de un ecosistema tomado para la agricultura tiene que ver con la poca dependencia de los agroquímicos ya que estos causan grandes daños al medio ambiente [3]. Dada la importancia de los microorganismos con potencial efectivo en el control biológico para el tratamiento de distintos patógenos, es importante ampliar los estudios hacia la selección de nuevas cepas y diferentes matrices de aislamiento. Debido a lo anterior, el objetivo principal de esta investigación es aislar y caracterizar diferentes microorganismos antagonistas (hongos y bacterias) obtenidos de suelo agrícola para control biológico del hongo causante de la roya.

Metodología

Se recolectaron tres muestras de suelo, dos con cultivos de berries y una sin cultivo. Las muestras frescas de suelo se obtuvieron en dos ranchos productores de berries: Rancho la Catarina y Rancho Green Gold ubicados en Cd. Guzmán en el estado de Jalisco. Se obtuvieron dos tipos de muestras: una muestra superficial para la preparación de medio de cultivo y otra muestra a una profundidad de 10 cm para el aislamiento de los microorganismos. De la primera se colectaron 500 g y de la segunda 50 g. Las muestras de hojas infectadas con roya, fueron obtenidas en un rancho productor de berries ubicado en Cd. Guzmán en el estado de Jalisco. Una vez obtenida la cantidad suficiente para los análisis, las muestras fueron transportadas en bolsas ziploc hacia el laboratorio para ser procesadas.

El aislamiento a partir de suelo agrícola se realizó en agar extracto de suelo, preparado de acuerdo a Subba, (1977) [4]. Para el aislamiento a partir de hojas infectadas con roya, el procedimiento fue el siguiente: en cajas Petri con agar nutritivo se cultivaron los microorganismos mediante la técnica de impronta a partir de las hojas de frambuesa infectadas con roya con la finalidad de aislar algún microorganismo que pudiera estar en competencia con la roya en su mismo ambiente nativo. Posteriormente, las cajas fueron llevadas a incubación a 30°C por un periodo de 3 a 5 días. A partir de los cultivos obtenidos se seleccionaron colonias

separadas de bacterias y hongos con características macroscópicas de interés (color, forma, etc.). Los hongos se cultivaron en medio PDA y las bacterias en medio agar nutritivo asignándoles un código dependiendo de la procedencia de las muestras: CC, muestra de suelo de rancho la Catarina con cultivo; CSC, muestra de suelo rancho la Catarina sin cultivo; GGC, rancho Green Gold con cultivo; y GGH, para el aislamiento a partir de hojas infectadas en el rancho Green Gold. Para bacterias se realizó tinción de Gram y tinción de endosporas, para hongos tinción con azul de lactofenol.

Las bacterias seleccionadas fueron a la prueba de actividad endoglucanasa en medio sólido suplementado con carboximetilcelulosa (CMC). Se sembró por microgota de 5µL de cada bacteria con una concentración de 1×10^6 UFC/mL sobre una caja Petri dividida en cuatro campos y suplementada con medio agar CMC. Para las muestras de hongo se determinó su actividad sembrando una gota de 5µL de muestra de hongo con una concentración de 1×10^6 esporas en el centro de una caja Petri suplementada también con agar CMC. En ambas pruebas las cajas sembradas se incubaron a 28°C por 48 horas y la actividad enzimática sobre el agar-CMC se basó en la formación de un halo transparente que fue revelado mediante la aplicación con rojo Congo al 0.2%. Posterior a esto se llevó a cabo la obtención del extracto microorganismo-roya, para lo cual, en un microtubo de 1.5mL se agregaron 100µL de microorganismos (bacterias y hongos) 1×10^6 UFC/mL y 1×10^6 esporas/mL; y se mezclaron con 0.1 g de polvillo de roya. Se completó el volumen a 1mL con agua estéril y se incubó con agitación orbital a 100 rpm, 28°C por 18 h. Después de la incubación, los microtubos fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 15min. Se colectó el sobrenadante y fueron guardados en congelación a -20 °C para su uso posterior.

Por último, para la determinación de antagonismo contra la roya se hizo lo siguiente: se tomaron 50 µL de sobrenadante, se colocaron sobre una caja Petri con agar nutritivo al 2% y se dispersaron con un hisopo estéril en toda la caja y se dejó secar. Inmediatamente después, la caja se dividió en 4 campos y en cada campo se colocaron 5 µL de 1×10^6 uredosporas/mL. Las cajas fueron incubadas durante 18 h a 28°C. Los resultados se observaron en el microscopio con el objetivo de 40X. El antagonismo fue medido como porcentaje de inhibición de germinación de las uredosporas.

Resultados y discusión

En la figura 1, se observan colonias diferentes de bacterias mezcladas, junto con hongos filamentosos que cubren la mayor parte del agar.



Figura 1. Aislamiento de microorganismos a partir de suelo agrícola sobre agar extracto de suelo.

El agar suelo mostro gran variedad de microorganismos aislados, algunos de estos mostraban características de antagonismo o competencia entre ellos. Algunas colonias de bacterias mostraban inhibición a hongos y a otras colonias de bacterias, e igualmente algunos hongos presentes en el agar suelo mostraban inhibición a otros microorganismos extendiéndose por todo el agar.

De acuerdo a una investigación realizada por Contreras y Riaño, (2013) [5], a partir de muestras de suelo se pueden realizar aislamientos de microorganismos con potencial entomopatígeno para su uso en control biológico, ya que estos microorganismos compiten con otros en su medio natural y gracias a sus características benéficas para las plantas y el suelo, viven de manera simbiótica en estos, proporcionando nutrientes y control a diversos patógenos que los afectan.

En la figura 2. se puede observar el crecimiento bacteriano y fúngico que se obtuvo a partir de las hojas infectadas con roya.



Figura 2. Aislamiento de microorganismos a partir de hojas de frambuesa infectadas con roya. El aislado hecho a partir de hojas de frambuesa infectadas con roya mostro la predominancia de hongos sobre bacterias. Se pudo observar la competencia por espacio que se mostraba entre microorganismos, su color y su forma también fueron características llamativas dentro de los aislados. De acuerdo a una investigación realizada por Gómez- De La cruz (2017) [6], confirman que algunos microorganismos presentes en la misma hoja donde se encuentra la roya del café (*Hemileia vastatrix*) son capaces de ejercer biocontrol contra este hongo.

Se seleccionaron 7 cepas de bacterias y 5 de hongos de los aislados de agar de suelo y hojas de frambuesa infectadas con roya. Se tomaron en cuenta las características más visibles de antagonismo y las característica macroscópica y microscópica típica de cepas reportadas como antagonicas.

Las bacterias mostraron crecimiento formando puntos con morfologías diferentes, cada una de las colonias era apreciable a simple vista (Fig. 1). Los hongos que predominaron en los aislados de hojas de frambuesa, mostraron en su mayoría textura polvosa y textura afelpada (Fig. 2).

La tabla 1 se muestra la cantidad de microorganismos aislados y el código asignado de acuerdo a la fuente de aislamiento.

Tabla 1. Microorganismos aislados.

Fuente	Código de muestra	Tipo de m.o.	Código de aislado asignado
Suelo agrícola con cultivo (La Catarina)	CC	2 Bacterias, 1 hongo	CC1, CC3 CC2
Suelo agrícola sin cultivo (La Catarina)	CSC	1 Bacteria 1 hongo	CSC3 CSC4
Suelo agrícola con cultivo (Green Gold)	GGC	3 Bacterias, 1 hongo	GGC1, GGC4, GGC2 GGC3
Hojas de plantas infectadas (Green Gold)	GGH	1 Bacterias, 2 hongos	GGH5 GGH1, GGH2

En las figuras 3 y 4 se pueden observar las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos aislados en caja Petri, sobre agar nutritivo para bacterias y PDA para hongos.

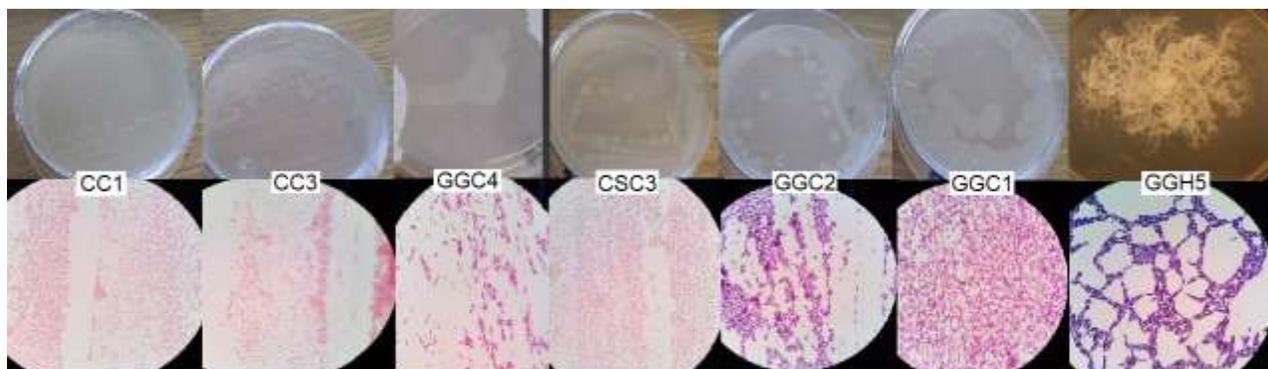


Figura 3. Características macro y microscópicas de bacterias seleccionadas y aisladas en caja Petri.

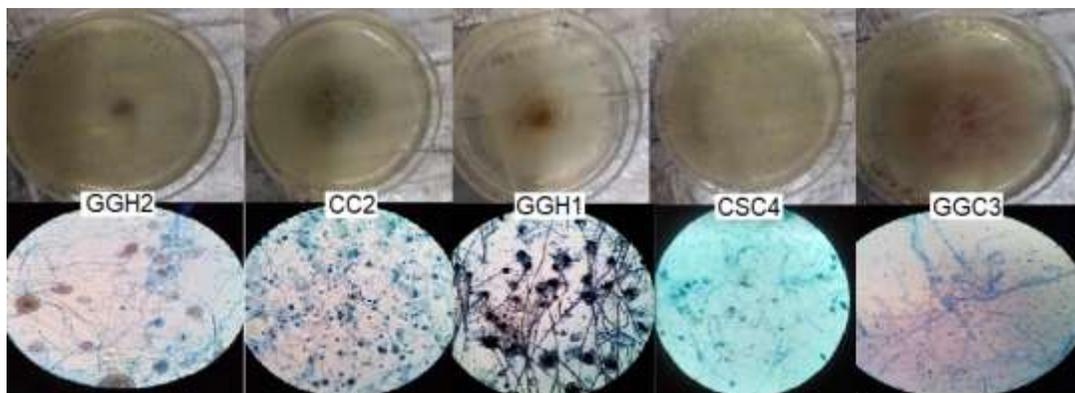


Figura 4. Características macro y microscópicas de hongos aislados en caja Petri.

Las bacterias en su mayoría mostraron una consistencia mucosa, forma de bacilos y Gram positivas. Los hongos aislados mostraron una textura polvosa y algodonosa, la mayoría de estos hongos cuentan con esporangios y micelio en forma de ramificaciones extendiéndose por toda la caja Petri. La mayoría de los microorganismos aislados sometidos a la prueba de endoglucanasa mostraron actividad positiva, presentando la aparición de un halo transparente alrededor del microorganismo sembrado en la caja Petri (Figura 5).

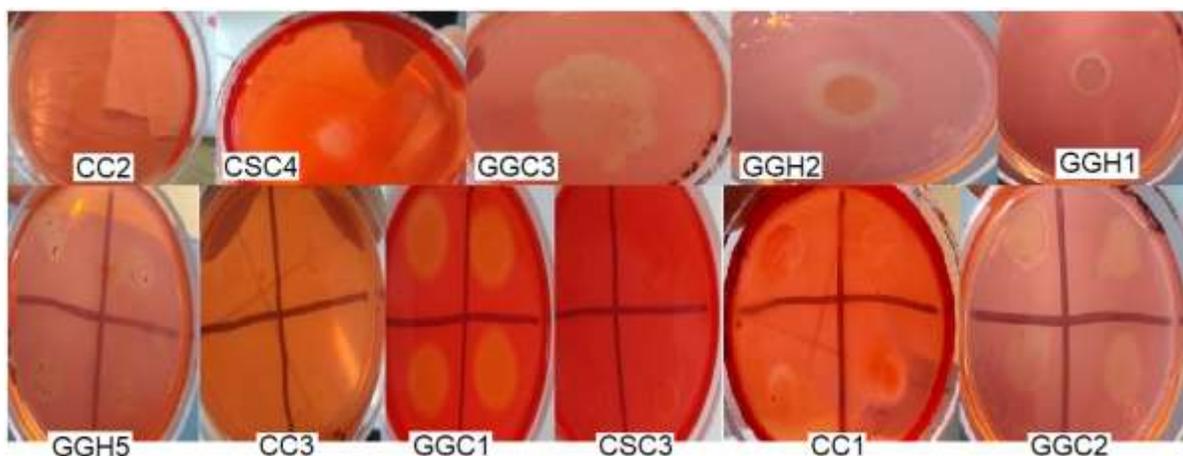


Figura 5. Prueba cualitativa de actividad endoglucanasa en cajas Petri con agar carboximetilcelulosa.

La actividad endoglucanasa hidroliza la celulosa y por consecuencia se produce la decoloración del complejo formando un halo visible alrededor de la microgota con el microorganismo utilizado [7]. No obstante, a pesar de que algunos microorganismos no presentaron halo de hidrólisis, crecieron en el medio agar CMC. El hecho de que crecieran en el medio de cultivo con CMC como única fuente de carbono significa que son capaces de utilizarlo como sustrato, lo que representa actividad positiva en la actividad endoglucanasa. Estos resultados son similares con lo reportado por Pérez-Valiente, (2013) [8] donde se encontraron bacterias degradadoras de varios tipos de celulosa productoras de celulasas endógenas las cuales no muestran un halo decolorado, pero si crecimiento debido a la poca actividad que producen y bacterias con actividad exógena las cuales muestran crecimiento y un halo de revelación positiva debido a su mejor actividad en hidrólisis de celulosa en las pruebas *in vitro*.

Para las pruebas de antagonismo contra la roya, se seleccionaron las cepas de microorganismos que tuvieron mejor actividad endoglucanasa (GGH5, GGH2, GGC2, GGC1 y GGH1). La figura 6 muestra los controles positivos de germinación de las uredosporas de la roya y la figura 7 muestra el efecto de los extractos obtenidos de las cepas probadas sobre la germinación de la roya.

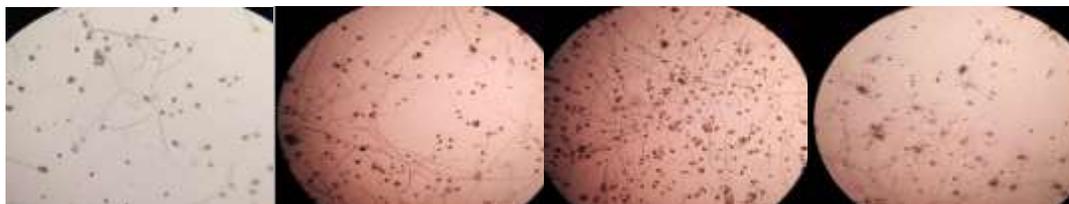


Figura 6. controles positivos de germinación de uredosporas de roya.



Figura 7. Pruebas de antagonismo de bacterias y hongos para inhibir germinación de uredosporas de roya vistas a microscopio 40x.

Como se puede observar en las figuras 6 y 7, hay una gran diferencia entre los controles de roya donde no se aplicó ningún extracto de microorganismo con respecto a las pruebas donde sí se utilizaron los extractos. Prácticamente todos los aislados probados mostraron efecto de inhibición de la germinación de las uredosporas de la roya. La figura 8 muestra de forma más específica el efecto que presentaron cada una de las cepas probadas en porcentaje de uredosporas germinadas.

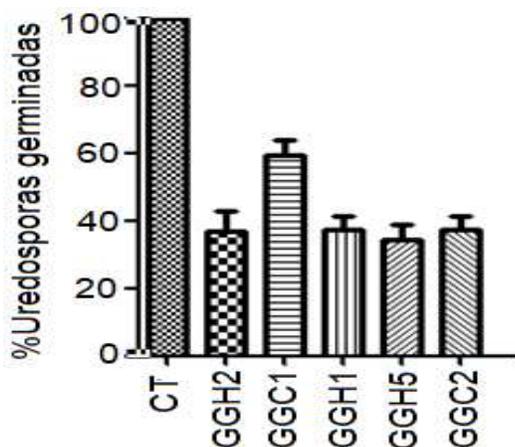


Figura 8. Porcentaje de uredosporas germinadas en pruebas de antagonismo de los microorganismos aislados contra la roya. CT, control sin extracto microorganismo-roya; GGH2, GGC1, GGH1, GGH5 y GGC2, extractos microorganismo-roya de los aislados ($P < 0.05$).

La germinación de uredosporas se vio reducida por los diferentes extractos de los microorganismos aislados de suelo y hojas de frambuesa infectadas con roya. Las pruebas *in vitro* realizadas mostraron que GGH2, GGH1, GGH5 y GGC2, presentaron inhibición de aproximadamente el 60% sobre la germinación de las uredosporas de la roya, mientras que, GGC1 solo presentó el 40% de inhibición. Si bien la germinación de las uredosporas no se eliminó por completo, estas cepas presentan alto potencial para ser utilizadas en el control biológico de la roya. Investigaciones han demostrado el uso de hongos como *Trichoderma sp.* *Chlorolota* sobre la reducción de la enfermedad de la roya en frambuesa bajo condiciones de malla sombra en campo e invernadero [2].

Conclusiones

Se aislaron diferentes cepas de bacterias y hongos con alto potencial de control biológico contra *P. Americanum*, hongo causante de la roya, enfermedad que afecta tanto a la planta como a los frutos. Las cepas GGH5, GGH2, GGC2, GGC1 y GGH1 fueron las que presentaron mejor actividad endoglucanasa y actividad biocontrol sobre el crecimiento de uredosporas del hongo *P. Americanum* que son la forma de reproducción de este hongo. Aunque no hubo inhibición completa de la germinación de las uredosporas los extractos demostraron tener potencial antagonista contra la roya ya que, en contraste con los controles utilizados, la germinación fue menor. Por lo tanto, estos aislados presentan alto potencial de ser utilizados como una alternativa amigable con el ambiente para el control biológico de la roya.

Referencias

- 1.Rebollar-alviter, A., & Leyva-mir, S. G. (2001). Identificación y Biología del Agente Causal de la Roya de la Frambuesa Roja (*Rubus idaeus* L.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 168–174.
- 2.Cortez, F. A. M., Chan-Cupul, W., Nava, M. T. B., Hernández-Ortega, H. A., Manzo-Sánchez, G., & Velasco, E. G. (2019). Biological control of late leaf rust disease [pucciniastrum americanum (Farl.) arthur] in raspberry (*rubus idaeus* l.) using two biological products: bacillus subtilis (fungizard®) and larrea tridentata botanic extract (cleancrop®) under screenhouse condit. *Idesia*, 37(1), 125–133. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019005000504>
- 3.Fernández, X., & Ortega, A. (2013). Uso de biocontroladores, una tendencia al alza. <https://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2013/05/29/Uso-de-biocontroladores-una-tendencia-al-alza.aspx>
4. Subba Rao N. S., 1977, *Soil Microorganisms and Plant Growth*, p-251., Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
5. Contreras, L. Y. S., & Riaño, A. L. R. (2013). Aislamiento de microorganismos para control biológico de moniliophthora roreri. *Acta Agronomica*, 62(4), 370–37
6. Gómez-De La Cruz, I., Pérez-Portilla, E., Escamilla-Prado, E., Martínez-Bolaños, M., Carrión-Villarnovo, G. L. L., & Hernández-Leal, T. I. (2017). Selección in vitro de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 172–183. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-1>
7. Gaitán, D., & Lara, C. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
8. Pérez-Valiente R. A. (2013). screening efectivo de actividad celulolítica microbiana. 1–45.