

Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti**

Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*

Daniel Alonso Pérez-Corral¹, Nancy Yasmín García-González², Gabriel Gallegos-Morales², María Fernanda Ruiz-Cisneros¹, David I. Berlanga-Reyes¹ y Claudio Ríos-Velasco^{1§}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N Parque Industrial, C. P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua. (alonso.perez@estudiantes.ciad.mx; fernanda.ruiz@estudiantes.ciad.mx; dberlanga@ciad.mx). ²Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Calzada Antonio Narro 1923 Buenavista, C. P. 25315, Saltillo, Coahuila, México. (yas2903@gmail.com; gabgalmor@yahoo.com.mx). §Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Resumen

Los árboles de manzano *Malus domestica*, Borkh. son susceptibles al ataque de una gran diversidad de fitopatógenos, entre los que se encuentran los hongos causantes de enfermedades radicales, los cuales son controlados con fungicidas sintéticos. Sin embargo, debido a su aplicación indiscriminada, se ha reducido su efectividad y uso. Una alternativa para revertir esta problemática, es el control biológico, mediante la integración de microorganismos antagonísticos, por lo que el objetivo del estudio fue aislar actinomicetos nativos de suelos en huertos de manzano del estado de Chihuahua, México, con actividad antagonística a *Fusarium equiseti*. El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua durante 2013-2014. Para lo cual, se recolectaron muestras de suelo cercano a la rizosfera de árboles de manzano en huertos de cuatro municipios productores del estado de Chihuahua. Para el aislamiento de los actinomicetos, se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suelo en agua peptonada estéril y colocándolas por la técnica de difusión en placa, en diez medios de cultivo artificiales semi-selectivos. Las colonias de actinomicetos fueron aisladas y purificadas para posteriormente ser confrontadas *in vitro* contra el hongo fitopatógeno *F.*

Abstract

Apple trees *Malus domestica* Borkh are susceptible to attacks from a wide variety of pathogens, among which are the fungi that cause root diseases, which are controlled with synthetic fungicides. However, due to its indiscriminate application, its effectiveness and use has declined. An alternative to reverse this problem is biological control, through the integration of antagonistic microorganisms, so the aim of the study was to isolate native actinomycetes from apple orchards soils in the state of Chihuahua, Mexico, with antagonistic activity to *Fusarium equiseti*. The study was conducted at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), Unit Cuauhtémoc, Chihuahua during 2013-2014. For this purpose, soil samples near the rhizosphere from apple trees in orchards from four producing municipalities in the state of Chihuahua were collected. For isolation of actinomycetes, serial dilutions of the soil samples in sterile peptone water were made and then poured on a plate by the diffusion method, on ten semi-selective mediums, were made. Actinomycetes colonies were isolated and purified, and then be confronted *in vitro* against phytopathogenic fungus *F. equiseti*. 710 isolates were obtained, from which 222 had antagonistic activity to the phytopathogenic fungus at day 5 after confrontation and 69 retained antagonisms to

* Recibido: enero de 2015
Aceptado: abril de 2015

equiseti. Se obtuvieron 710 aislados, dentro de los cuales 222 presentaron actividad antagonista a este hongo fitopatógeno al día 5 post-confrontación y 69 conservaron el antagonismo al día 10 post-confrontación. La alta abundancia de aislados y la proporción que mostró antagonismo a *F. equiseti*, muestra el potencial y la oportunidad de evaluarlos *in vitro* e *in vivo* contra una gran diversidad de hongos y bacterias fitopatógenas del manzano, así como de otros cultivos de interés agrícola.

Palabras clave: *Malus domestica*, *Streptomyces* spp., antagonismo, hongos fitopatógenos, rizosfera.

Introducción

La fruticultura, es una de las principales actividades económicas en el estado de Chihuahua, en particular del manzano (*Malus domestica* Borkh.). La región manzanera está constituida por los municipios de Bachíniva, Cuauhtémoc, Guerrero y Namiquipa; conocida como la zona productora más importante de Latinoamérica (SIAP-SAGARPA, 2013). La producción de este frutal es inestable debido en parte, a la presencia de plagas insectiles y enfermedades, el costo de su manejo depende del grado de tecnificación de los huertos, representando 22.2% de los costos totales de producción en huertos con alta tecnificación y 10.6% con mediana tecnificación, donde el costo del manejo de enfermedades causadas por hongos y bacterias en huertos de alta tecnificación asciende al 57% (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002).

Por lo que, las enfermedades son de mayor interés, debido a la gran diversidad de fitopatógenos presentes en la rizosfera, principalmente hongos tales como *Fusarium* spp. (Tewoldemedhin *et al.*, 2011), *Phymatotrichopsis omnivora* (Samaniego-Gaxiola, 2007), *Armillaria* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp. (Serdani *et al.*, 2002), *Rosellinia necatrix* (ten Hoopen y Krauss, 2006), *Nectria* spp., y Oomicetos como *Phytophthora cactorum* (Hantula *et al.*, 2000), *Pythium* spp. (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa y Banhashemi, 2005), entre otros. Su control depende de la aplicación de fungicidas sintéticos como una herramienta usada comúnmente; sin embargo, su empleo se ha restringido debido a su poca eficiencia por un manejo inadecuado, a la inducción de resistencia en los hongos y Oomicetos blanco y no blanco, eliminación de microorganismos antagonistas nativos y afectación a la salud humana (Harris *et al.*, 2001).

day 10 post-confrontation. The high abundance of isolates and the proportion that showed antagonism to *F. equiseti*, shows the potential and the opportunity to evaluate them *in vitro* and *in vivo* against a wide variety of plant pathogenic fungi and bacteria from apple and other crops of agricultural interest.

Keywords: *Malus domestica*, *Streptomyces* spp., antagonism, phytopathogenic fungi, rhizosphere.

Introduction

Fruit picking is one of the main economic activities in the state of Chihuahua, in particular apple (*Malus domestica* Borkh.). The apple growing region is comprised by the municipalities of Bachíniva, Cuauhtémoc, Guerrero and Namiquipa; known as the most important producing area in Latin America (SIAP-SAGARPA, 2013). The production of this fruit is unstable due in part to the presence of insect pests and diseases, the management cost depends on the degree of mechanization that orchards have, representing 22.2% of total production costs in orchards with high mechanization and 10.6% with intermediate modernization, where the cost of managing diseases caused by fungi and bacteria in orchards highly mechanized rises to 57% (Jacobo Ramirez-Legarreta-Cuéllar, 2002).

Therefore, diseases are of interest due to the wide range of pathogens present in the rhizosphere, especially fungi such as *Fusarium* spp. (Tewoldemedhin *et al.*, 2011), *Phymatotrichopsis omnivora* (Samaniego-Gaxiola, 2007), *Armillaria* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp. (Serdani *et al.*, 2002), *Rosellinia necatrix* (ten Hoopen and Krauss, 2006), *Nectria* spp., and Oomycetes such as *Phytophthora cactorum* (Hantula *et al.*, 2000), *Pythium* spp. (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa and Banhashemi, 2005), among others. Control depends on the application of synthetic fungicides commonly used as a tool; however, its use has been restricted due to its low efficiency by inadequate handle, induction of resistance in fungi white and nonwhite Oomycetes, elimination of native antagonistic microorganisms and impact on human health (Harris *et al.*, 2001).

Therefore, the integration of antagonistic microorganisms present in the rhizosphere of agricultural systems is a viable alternative to the use of chemicals for crop protection (Berg *et al.*, 1996; Whipps, 2001). The most used antagonistic microorganisms are bacteria from the genus *Bacillus* spp. (Kumar *et al.*, 2012), fungi (*Trichoderma* spp.) (Bell *et al.*,

Por lo cual, la integración de microorganismos antagonísticos presentes en la rizosfera de sistemas agrícolas, es una alternativa viable al uso de productos químicos para la protección de cultivos (Berg *et al.*, 1996; Whipps, 2001). Los microorganismos antagonísticos más utilizados son bacterias del género *Bacillus* spp. (Kumar *et al.*, 2012), hongos (*Trichoderma* spp.) (Bell *et al.*, 1982) y actinomicetos (*Streptomyces* spp.) (Ezziyyani *et al.*, 2004). Estos últimos son un grupo de bacterias filamentosas Gram-positivas, con alto contenido de guanina-citosina en su genoma, se encuentran en diversos ecosistemas naturales y agroecosistemas, son heterótrofos y viven en materia orgánica en descomposición actuando como descomponedores (Goodfellow y Williams, 1983; Mayfield *et al.*, 1972; Juo y Franzluebbbers, 2003), además tienen la capacidad de producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas extracelulares (Kavitha *et al.*, 2010), los cuales pueden inhibir el crecimiento de algunos patógenos (Valois *et al.*, 1996; El-Tarabily *et al.*, 2000).

Además tienen la capacidad de colonizar la superficie radicular de las plantas, protegiéndola contra fitopatógenos del suelo (Crawford *et al.*, 1993), por lo que han sido reconocidos como antagonísticos potenciales de hongos fitopatógenos (El-Abyad *et al.*, 1993). Dado lo anterior, el objetivo del estudio fue aislar actinomicetos nativos en huertos de manzano del estado de Chihuahua, con potencial antagonístico a hongos fitopatógenos, permitiendo desarrollar información sobre la abundancia y distribución de actinomicetos antagonísticos.

Materiales y métodos

Ubicación del sitio experimental. Se recolectaron muestras de suelo (800 - 900 g) cercano a la rizosfera (10 - 15 cm de profundidad) de cinco árboles de manzano, ubicados en los cuatro puntos cardinales y el centro del área total de los huertos (Bagyaraj y Rangaswami, 2007), durante el periodo junio-julio de 2013 en cinco huertos de los municipios de Bachíniva, Cuauhtémoc, Guerrero y Namiquipa, del estado de Chihuahua, posteriormente se hicieron muestras compuestas de 250 g por huerto, obteniendo un total de 20 (Cuadro 1).

1982) and actinomycetes (*Streptomyces* spp.) (Ezziyyani *et al.*, 2004). The latter are a group of Gram-positive filamentous bacteria rich in guanine-cytosine in its genome, found in various natural ecosystems and agro-ecosystems, are heterotrophic and live on decaying organic matter acting as decomposers (Goodfellow and Williams, 1983; Mayfield *et al.*, 1972; and Franzluebbbers, 2003) also have the ability to produce a wide variety of antibiotics and extracellular enzymes (Kavitha *et al.*, 2010), inhibiting growth of some pathogens (Valois *et al.*, 1996; El-Tarabily *et al.*, 2000).

These also have the ability to colonize root surface of plants, protecting them against phytopathogens from the soil (Crawford *et al.*, 1993), reason why have been recognized as potential antagonists of phytopathogenic fungi (El-Abyad *et al.*, 1993). Given the above, the objective of the study was to isolate native actinomycetes from apple orchards in the state of Chihuahua, with antagonistic potential to fungal pathogens, developing information on the abundance and distribution of antagonistic actinomycetes.

Materials and methods

Location of the experimental site: soil samples (800 - 900 g) near the rhizosphere (10-15 cm deep) from five apple trees were collected, located in the four corners and center of the total area from orchards (Bagyaraj and Rangaswami, 2007) during the period June-July 2013 in five orchards from the municipalities Bachíniva, Cuauhtémoc, Guerrero and Namiquipa, in the state of Chihuahua, then composite samples of 250 g per orchard were made, obtaining a total of 20 (Table 1).

Isolation of actinomycetes: from the samples obtained, serial dilutions (1:10) were performed in test tubes with 9 ml sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl in distilled water), adding 1 g of soil (previously sieved) until dilutions 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} , of which 50 μ L were collected and seeded by duplicate through diffusion technique on Petri dishes of 90 mm diameter, containing one of the following artificial semi-selective culture mediums to isolate actinomycetes: Bennett's Agar (AB), Glycerol Nutrient Agar (ANG), Ashby's Glucose Agar (ASH), Peptone Agar (CPA), Czapek Dox Agar with 3% Glucose (CZAS), Glycine Glycerol Agar (GGA), Gauze's Medium No. 1 (GAU), GYM

Cuadro 1. Sitios de recolecta de muestras de suelo en huertos de manzano en el estado de Chihuahua, México, para el aislamiento de actinomicetos.**Table 1. Collection sites of soil samples in apple orchards in the state of Chihuahua, Mexico, for the isolation of actinomycetes.**

Municipio	Huerto	Tec.*	Coordenadas	Altitud (msnm)
Bachíniva	San Joaquín	Alta	28°50'26" N, 107°18'3" O	1966
	Rosy (SJ2)	Alta	28°50'33" N, 107°17'56" O	1966
	Bety (SJ3)	Alta	28°50'35" N, 107°17'57" O	1965
	Manuel (SJ4)	Alta	28°51'10" N, 107°15'39" O	1979
	La Ciénega	Media	28°46'51" N, 107°15'35" O	2017
Cuauhtémoc	Picacho Lote 7	Alta	28°29'21" N, 106°29'22" O	2024
	Picacho Lote 6	Alta	28°29'21" N, 106°39'22" O	2024
	Picacho Lote 1A	Media	28°29'21" N, 106°39'05" O	2026
	2 abajo (campo 2A)	Alta	28°26'49" N, 106°59'25" O	2136
	Campana (campo 4)	Alta	28°33'51" N, 106°54'23" O	1994
Guerrero	El Encino	Media	28°33'12" N, 107°27'19" O	2084
	El Tanque	Media	28°32'38" N, 107°27'37" O	2080
	Tres compadres	Media	28°32'30" N, 107°27'19" O	2080
	Ing. Gameros	Alta	28°32'0" N, 107°26'56" O	2085
	Las Margaritas (Los 56)	Media	28°33'16" N, 107°30'0" O	2019
Namiquipa	Carlos Márquez	Media	29°11'30" N, 107°25'21" O	1869
	Manuel Rivera	Media	29°8'54" N, 107°23'29" O	1868
	Reyes Nevarez 1	Media	29°10'39" N, 107°22'22" O	1890
	Reyes Nevarez 2	Alta	29°9'25" N, 107°23'27" O	1865
	Reyes Nevarez 3	Media	29°08'59" N, 107°23'30" O	1889

* Tec. (nivel de tecnificación)= media= riego rodado, calefacción, sin malla antigranizo, sin limitante para el uso de los recursos y asesoría técnica ocasional; alta= riego por microaspersión, calefacción, con malla antigranizo, sin limitante para el uso de insumos y con asesoría técnica permanente (Ramírez-Legarreta *et al.*, 2004).

Aislamiento de actinomicetos. De las muestras obtenidas se realizaron diluciones seriadas (1:10), en tubos de ensaye con 9 mL de agua peptonada estéril (0.1% de peptona y 0.85% de NaCl en agua destilada), agregando 1 g de suelo (previamente tamizado), hasta obtener las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , de las cuales se tomaron 50 μ L y se sembraron por duplicado mediante la técnica de difusión en cajas de Petri de 90 mm de diámetro, que contenían uno de los siguientes medios de cultivo artificiales semi-selectivos para el aislamiento de actinomicetos: Agar de Bennett (AB), Agar Nutritivo Glicerol (ANG), Ashby's Glucosa Agar (ASH), Czapek Peptona Agar (CPA), Czapek Dox Agar con 3% Glucosa (CZAS), Glicerol Glicina Agar (GGA), Gauze's Medio No. 1 (GAU), GYM *Streptomyces* Agar (GYM), Oatmeal Agar (OAT) y Agar Jugo de Vegetales V8 (V8) (Atlas, 2010). Posteriormente se incubaron a 28 °C durante 15-22 d, observando periódicamente las colonias típicas de los actinomicetos,

Streptomyces Agar (GYM), Oatmeal Agar (OAT) and V8 vegetable juice Agar (V8) (Atlas, 2010). Then incubated at 28 °C for 15-22 d; periodically observing the typical actinomycete colonies, which were isolated and purified on Potato Dextrose-Agar (PDA), and incubated at 28 °C for 10-12 d in a growth chamber (Precision Scientific).

Morphological identification of isolates: the identification was performed according to Shirling and Gottlieb (1966), incubating the selected actinomycetes in PDA, ISP2, ISP3 and ISP4 at 28 °C for 7 days to promote sporulation structures growth and identify them by their macroscopic features such as: colony color, pigment production and mycelium characteristics, and through their microscopic characteristics like the presence of spores and arrangement of sporulation structures, to do so Gram stains were performed and examined in a compound microscope (Carl Zeiss), with magnifying power up to 1 000 X.

las cuales fueron asiladas y purificadas en Papa-Dextrosa-Agar (PDA), e incubadas a 28 °C por 10-12 d en una cámara de crecimiento (Precision Scientific).

Identificación morfológica de aislados. La identificación se realizó de acuerdo a Shirling y Gottlieb (1966), incubando los actinomicetos seleccionados en PDA, ISP2, ISP3 e ISP4 a 28 °C durante 7 d para promover el crecimiento de estructuras de esporulación y ser identificados mediante sus características macroscópicas tales como: color de la colonia, producción de pigmentos y características de micelio, y mediante sus características microscópicas como la presencia de esporas y arreglo de estructuras de esporulación, para lo cual se realizaron tinciones de Gram y fueron examinados en un microscopio compuesto (Carl Zeiss), con un aumento de 1 000 X.

Confrontaciones *in vitro*. Los actinomicetos aislados se confrontaron *in vitro* contra el fitopatógeno *F. equiseti*, del cepario de CIAD, A. C. previamente identificado. Cabe señalar que se eligió a esta especie debido a su rápido crecimiento en el medio Czapek-Dox-Agar (CDA). Cada antagonista se sembró de acuerdo a la metodología descrita por Castillo-Fabela *et al.* (2001) con modificaciones, mediante obtención de explantes de la colonia con sacabocados de 5 mm de diámetro y colocación en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri conteniendo CDA (Sigma Aldrich, México), incubándose por 10 d a 28 °C. En el último día de incubación se colocó un papel filtro de 6 mm de diámetro impregnado con conidias y micelio del fitopatógeno en el centro de la caja de Petri e incubándose nuevamente a las mismas condiciones.

Como testigo, se sembró el hongo fitopatógeno, colocando un papel filtro impregnado con conidias y micelio en el centro de la caja de Petri con CDA. El crecimiento radial de la colonia de *F. equiseti* confrontado ante cada actinomiceto y del testigo fue medido diariamente. El mismo día en que el testigo llenó la caja de Petri, se registró y determinó la capacidad antagonística en las confrontadas con los actinomicetos, para lo cual se utilizó una escala subjetiva arbitraria propuesta para tal fin (Figura 1).

Resultados y discusión

Aislamiento de actinomicetos. Mediante el uso de los 10 medios de cultivo, se obtuvieron 710 aislados de actinomicetos. Los medios con los cuales se aisló el mayor

In vitro confrontations: actinomycetes isolates were compared *in vitro* against the phytopathogen *F. equiseti*, from the strain collection of CIAD, A. C. previously identified. Note that this species was chosen because of its rapid growth in Czapek-Dox-Agar (CDA). Each antagonist was seeded according to the methodology described by Castillo-Fabela *et al.* (2001) with modifications, obtaining explants from the colony by punch of 5 mm in diameter and placed in the four corners of the Petri dish containing CDA (Sigma Aldrich, Mexico) and incubated for 10 d at 28 °C. On the last day of incubation a filter paper 6 mm in diameter impregnated with conidia and mycelium from the pathogen was placed in the center of the Petri dish and incubated again at the same conditions.

As control the phytopathogenic fungus was seeded by placing an impregnated paper filter with conidia and mycelium in the center of the Petri dish with CDA. Radial growth of *F. equiseti* confronted against every actinomycete and the control was measured daily. The same day that control filled the Petri dish, was recorded and determined the antagonistic capacity in confronted against actinomycetes, for which an arbitrary subjective scale proposed for this purpose was used (Figure 1).

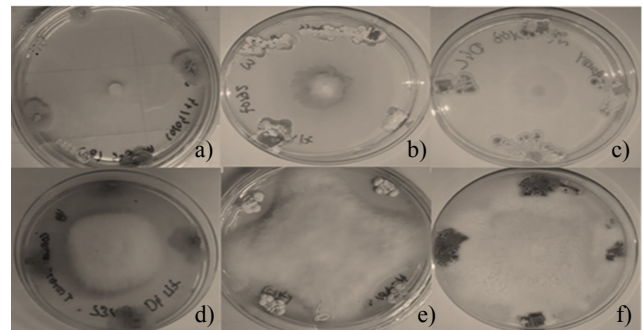


Figura 1. Escala usada para la medición de la capacidad antagonística de actinomicetos aislados de rizosfera *in vitro* contra *Fusarium equiseti*: a) tipo 1- crecimiento nulo del hongo (0%); b) tipo 2- crecimiento radial (1% a 25%); c) tipo 3 - crecimiento radial (26% a 50%); d) tipo 4 - crecimiento radial mayor a 50%; sin sobrecrecer al actinomiceto; e) tipo 5- presencia de halo; y f) tipo 6 - sobre-crecimiento al 100% actinomiceto por parte del hongo (sin antagonismo).

Figure 1. Scale used to measure the antagonistic capacity of actinomycetes isolated from rhizosphere *in vitro* against *Fusarium equiseti*: a) type 1- null fungal growth (0%); b) type 2- radial growth (1% to 25%); c) type 3 - radial growth (26% to 50%); d) type 4- radial growth greater than 50%; without overgrowing the actinomycete; e) type 5- halo presence; f) type 6 - over-growth at 100% actinomycete by the fungus (without antagonism).

número de actinomicetos fueron: V8, GUA y GYM, con 19.4, 18.9 y 14.2% respectivamente, del total obtenido. El medio del cual se aisló la menor cantidad de actinomicetos fue OAT con 0.9% del total (Cuadro 2). El medio OAT (ISP3) es reconocido por parte del ISP (International Streptomyces Project) como uno de los más efectivos para la caracterización de actinomicetos (Shirling y Gottlieb, 1966), sin embargo, no resultó efectivo para el aislamiento en este estudio. Las diferencias encontradas en el número de actinomicetos aislados, con relación a los diferentes medios se debe generalmente al contenido de nutrientes en cada uno de ellos y a los requerimientos por parte de los microorganismos (Buyer, 1995; Tsoraeva y Zhurbenko, 2000; Vieira y Nahas, 2005). Sin embargo, los actinomicetos presentan versatilidad nutricional (Prosser y Palleroni, 1978; Srinivasan *et al.*, 1991) y en la mayoría de los casos al usar medios formulados se encuentran diferencias cuantitativas en los aislados, inclusive de la misma muestra de suelo (Goodfellow y Williams, 1983).

Cabe mencionar, que en todos los municipios evaluados se encontró una gran cantidad de actinomicetos, no dependiendo del nivel de tecnificación de los huertos; sin embargo, es importante señalar que en algunos huertos muestreados, se realizan aplicaciones de materia orgánica, lo cual favorece el establecimiento de estos microorganismos (Kamal *et al.*, 2010), o debido al tipo de suelo presente (Vruggink, 1976; Crawford *et al.*, 1993). El municipio con el mayor número de aislados de actinomicetos fue Namiquipa con 214 (30.1%), seguido de Bachíniva con 201 (28.3%), Guerrero con 158 (22.3%) y Cuauhtémoc con 137 (19.3%). Al respecto Xue *et al.* (2013) reportan una gran cantidad de actinomicetos aislados de rizósfera de diferentes cultivos agrícolas, considerándola como una gran fuente y reservorio de estos microorganismos.

Identificación morfológica de aislados. La mayoría de los aislados presentaron micelio aéreo en colonias adheridas al medio de crecimiento con bordes irregulares, de consistencia suave y compacta, con diferentes pigmentaciones como diferentes tonalidades de café, amarillo y violeta, principalmente. En cuanto a la morfología microscópica observada mediante tinción de Gram corresponde a bacterias filamentosas Gram positivas, presentando cadenas de esporas, en forma recta, flexible, bucles abiertos y espiral (Shirling y Gottlieb, 1966) (Figura 2). La mayoría de los aislados presentaron características morfológicas correspondientes al género *Streptomyces*. Al respecto Mayfield *et al.* (1972) mencionan que 90% de los actinomicetos aislados de una gran diversidad de hábitats pertenecen al género *Streptomyces*.

Results and discussion

Isolation of Actinomycetes. Using the 10 culture medium, isolated 710 actinomycetes. The mediums through which the highest numbers of actinomycetes were isolated were: V8, GUA and GYM, with 19.4, 18.9 and 14.2% respectively of the total obtained. The medium that isolated less actinomycete was OAT with 0.9% of the total (Table 2). OAT mediums (ISP3) is recognized by the ISP (International Streptomyces Project) as one of the most effective for the characterization of actinomycetes (Shirling and Gottlieb, 1966), however, it was not effective for the isolation in this study. The differences found in the number of actinomycetes isolated in relation to the different medium are usually due to nutrient content in each and requirements by microorganisms (Buyer, 1995; Tsoraeva and Zhurbenko, 2000; Vieira and Nahas, 2005). However, actinomycetes present nutritional versatility (Prosser and Palleroni 1978; Srinivasan *et al.*, 1991) and in most cases when using formulated mediums there are quantitative differences in the isolates, even in the same soil sample (Goodfellow and Williams, 1983).

It is worth mentioning that in all municipalities evaluated, a large number of actinomycetes were found, despite the level of mechanization from the orchards; however, it is important to note that in some sampled orchards, farmers apply organic matter, favoring the establishment of these microorganisms (Kamal *et al.*, 2010), or due to soil type (Vruggink, 1976; Crawford *et al.*, 1993). The municipality with the largest number of actinomycetes isolates was Namiquipa with 214 (30.1%), followed by Bachíniva with 201 (28.3%), Guerrero 158 (22.3%) and Cuauhtemoc with 137 (19.3%). Xue *et al.* (2013) report a large number of actinomycetes isolated from rhizosphere in different crops, considering it as a source and reservoir of these microorganisms.

Morphological identification of isolates: most isolates showed aerial mycelium in colonies attached to the growing medium with irregular edges, smooth and compact consistency, with different pigmentations as different hues of brown, yellow and violet, primarily. Regarding the microscopic morphology observed through Gram stain corresponds to filamentous Gram positive, presenting spore chains, shaped straight, flexible, open loops and spiral (Shirling and Gottlieb, 1966) (Figure 2). Most isolates showed morphological characteristics corresponding to the genus *Streptomyces*. Mayfield *et al.* (1972) mention that 90% of actinomycetes isolated from a wide variety of habitats belonging to the genus *Streptomyces*.

Confrontaciones *in vitro*. De los 710 actinomicetos aislados, 222 mostraron actividad antagonística *in vitro* contra *Fusarium equiseti*, aislados en su mayoría con los medios GAU y V8. La capacidad antagonística de los aislados se monitoreó hasta los 10 d post-confrontación y se encontró que solo 69 de las 222 conservaron su capacidad antagonística (Cuadro 2), esto se debió posiblemente a que los hongos poseen diversos mecanismos de defensa hacia los microorganismos antagonistas (Duffy *et al.*, 2003), tales como activación metabólica en la producción de sustancias reductoras, enzimas implicadas en la compactación de activos, hidroxilación de compuestos hidrocarburos, detoxificación de volátiles, así como biosíntesis de melaninas, que actúan como esponjas para atrapar radicales libres (Kinderlerer, 1993; Levy *et al.*, 1992; Osbourn *et al.*, 1996; Schoonbeek *et al.*, 2002).

En cuanto a la capacidad antagonística *in vitro* contra *F. equiseti* de los diferentes aislados de actinomicetos, 14 inhibieron por completo el crecimiento de *F. equiseti* al décimo día pos-confrontación (Cuadros 2 y 3), posiblemente por la acción fungistática o fungicida debido a la producción de sustancias biocidas o antibióticos que se difunden a través del medio de cultivo (Fonseca-Ardila *et al.*, 2011). Al respecto, diversos autores manifiestan que los actinomicetos son una alternativa con gran potencial para ser usados como agentes de control biológico de *Fusarium* spp. (Gopalakrishnan *et al.*, 2011), incluyendo a *F. equiseti*, y otros hongos fitopatógenos (Crawford *et al.*, 1993; Al-Askar *et al.*, 2011; Dávila Medina *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013; Evangelista-Martinez, 2014).

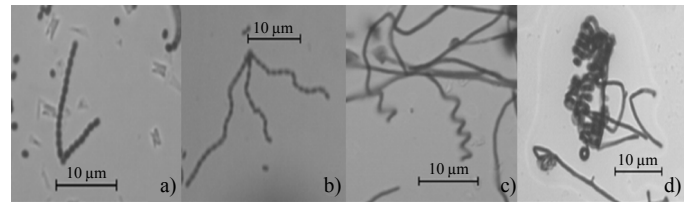


Figura 2. Morfología microscópica de aislados de actinomicetos: a) Cadena de esporas recta; b) Cadena de esporas flexible; c) Cadena de esporas en bucle abierto; y d) Cadena de esporas en espiral; aumento 1 000 X.

Figure 2. Microscopic morphology from isolated actinomycetes: a) straight spore chain; b) flexible chain spores; c) spore chain in open loop; and d) spiral spore chain; magnification 1 000 X.

In vitro confrontations: from the 710 actinomycetes isolated, 222 showed antagonistic activity *in vitro* against *Fusarium equiseti*, isolated mostly with GAU and V8. The antagonistic capacity from isolates were monitored until day 10 post-confrontation and found that only 69 of the 222 retained their antagonistic capacity (Table 2), this was possibly due to fungi possess various defense mechanisms to the antagonistic microorganisms (Duffy *et al.*, 2003), such as metabolic activation in the production of reducing substances, enzymes involved in compaction actives, hydroxylation of hydrocarbon compounds, volatile detoxification and melanin biosynthesis, which act like a sponge to trap free radicals (Kinderlerer, 1993; Levy *et al.*, 1992; Osbourn *et al.*, 1996; Schoonbeek *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Actinomicetos aislados de suelos en huertos de manzano del estado de Chihuahua.

Table 2. Actinomycetes isolated from soil in apple orchards in the state of Chihuahua.

Medio de cultivo	Total de aislados	Con capacidad antagonística a los 5 días	Con capacidad antagonística a los 10 días	Con inhibición total del crecimiento del fitopatógeno
OAT*	6 (0.9) [×]	-	-	^
ANG	44 (6.2)	17	1	^
AB	57 (8.0)	27	3	^
CPA	55 (7.7)	14	4	^
ASH	58 (8.2)	14	4	^
GGA	68 (9.6)	19	4	^
CZAS	49 (6.9)	22	18	^
GYM	101 (14.2)	18	5	1
V8	138 (19.4)	40	11	1
GAU	134 (18.9)	51	19	12
Total	710 (100)	222	69	14

*agar de Bennett (AB); agar nutritivo glicerol (ANG); Ashby's glucosa agar (ASH); Czapek peptona agar (CPA); Czapek dox agar con 3% glucosa (CZAS); glicerol glicina agar (GGA); Gauze's medio Núm. 1 (GAU); GYM *Streptomyces* agar (GYM); oatmeal agar (OA) y agar jugo de vegetales V8 (V8). [×]Porcentaje de aislados encontrados. [^]Crecimiento nulo de *Fusarium equiseti*.

Cuadro 3. Aislados de actinomicetos nativos agrupados de acuerdo a su capacidad antagonista.
Table 3. Isolates of native actinomycetes, grouped according to their antagonistic capacity.

Medios de cultivo	Capacidad antagonista*						Total
	1	2	3	4	5	6	
OAT*	-	-	-	-	-	6	6
ANG	-	2	2	13	-	27	44
CPA	-	2	-	12	-	41	55
ASH	-	3	5	6	-	44	58
GGA	-	3	5	11	-	49	68
AB	-	3	5	19	-	30	57
CZAS	-	3	11	8	-	27	49
GYM	1	2	8	7	-	83	101
V8	1	6	10	23	-	98	138
GAU	12	3	16	20	-	83	134
Total	14	27	62	119	0	488	710

*agar de Bennett (AB); agar nutritivo glicerol (ANG); Ashby's glucosa agar (ASH); Czapek peptona agar (CPA); Czapek dox agar con 3% glucosa (CZAS); glicerol glicina agar (GGA); Gauze's medio Núm. 1 (GAU); GYM *Streptomyces* agar (GYM); oatmeal agar (OA) y agar jugo de vegetales V8 (V8). *Capacidad antagonista de actinomicetos contra *F. equiseti*: 1) Crecimiento nulo del hongo (0%); 2) Crecimiento radial (1% - 25%); 3) Crecimiento radial (26% - 50%); 4) Crecimiento radial mayor a 50%, sin sobrecrecer al actinomiceto; 5) Presencia de halo; y 6) Sobre-crecimiento del actinomiceto al 100% por parte del hongo (sin antagonismo).

Conclusiones

El estudio mostró una gran cantidad de actinomicetos nativos presentes en los diferentes suelos de huertos de manzano en el estado de Chihuahua, así como la capacidad antagonista de más del 31 % de los aislados encontrados al ser confrontados *in vitro* contra *F. equiseti*, por lo que, pueden ser usados como agentes de control biológico de *Fusarium* spp. y de una gran diversidad de hongos fitopatógenos de interés agrícola.

Literatura citada

- Al-Askar, A. A., Khair, A. W. M., y Rashad, Y. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS28 against some phytopathogenic fungi. African J. Agric. Res. 6(12):2835-2842.
- Atlas, R. M. 2010. Handbook of microbiological media. Fourth Edition: CRC Press.
- Bagyaraj, D. J. and Rangaswami, G. 2007. Agricultural microbiology: PHI Learning.
- Bell, D.; Wells, H. and Markham, C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72(4):379-382.
- Berg, G.; Marten, P. and Ballin, G. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. Microbiol. Res. 151(1):19-27.

As for the *in vitro* antagonistic capacity against *F. equiseti* from the different isolates of the actinomycete, 14 completely inhibited the growth of *F. equiseti* at tenth day post-confrontation (Tables 2 and 3), possibly by the fungistatic or fungicidal action due the production of antibiotics or biocides diffusing through the medium (Fonseca-Ardila *et al.*, 2011). In this regard, several authors state that actinomycetes are an alternative with great potential as biological control of *Fusarium* spp. (Gopalakrishnan *et al.*, 2011), including *F. equiseti*, and other phytopathogenic fungi (Crawford *et al.*, 1993; Al-Askar *et al.*, 2011; Davila Medina *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013; Evangelista-Martinez, 2014).

Conclusions

The study showed a great amount of native actinomycetes present in different soils from apple orchards in the state of Chihuahua, thus the antagonistic capacity of more than 31% of isolates found by being confronted *in vitro* against *F. equiseti*, so these can be used as biological control agents of *Fusarium* spp., and a wide variety of phytopathogenic fungi of agricultural interest.

End of the English version



- Buyer, J. S. 1995. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. Appl. Environ. Microbiol. 61(5):1839-1842.
- Castillo-Fabela, E.; Gallegos-Morales, G.; Hernández-Castillo, F. D.; Cepeda-Siller, M. y Zamora-Villa, V. M. 2001. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Rev. Mex. Fitopatol. 19(2):204.
- Crawford, D. L.; Lynch, J. M.; Whipps, J. M. and Ousley, M. A. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59(11):3899-3905.
- Dávila Medina, M. D.; Gallegos Morales, G.; Hernández Castillo, F. D.; Ochoa Fuente, Y. M. y Flores Olivas, A. 2013. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Rev. Mex. Cienc. Agric. 4(8):1187-1196.
- Duffy, B.; Schouten, A. and Raaijmakers, J. M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology. 41:501-538.
- El-Abady, M. S.; El-Sayed, M. A.; El-Shanshoury, A. R. and El-Sabbagh, S. M. 1993. Towards the biological-control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant Soil. 149(2):185-195.
- El-Tarabily, K. A.; Soliman, M. H.; Nassar, A. H.; Al-Hassani, H. A.; Sivasithamparan, K.; McKenna, F. and Hardy, G. E. S. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathology. 49(5):573-583.
- Evangelista-Martínez, Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World J. Microbiol. Biotechnol. 30(5):1639-1647.
- Ezziyyani, M.; Sánchez, C. P.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Castillo, M. E. C. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales Biol. 26:69-78.
- Fonseca-Ardila, Y. A.; Castellanos-Suárez, D. E. and León-Sicard, T. E. 2011. Efecto antagonístico *in vitro* de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 64(2):6111-6119.
- Goodfellow, M. and Williams, S. 1983. Ecology of actinomycetes. Annual Reviews in Microbiology. 37:189-216.
- Gopalakrishnan, S.; Pande, S.; Sharma, M.; Humayun, P.; Kiran, B. K.; Sandeep, D. and Rupela, O. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. Crop Protection. 30(8):1070-1078.
- Hantula, J.; Lilja, A.; Nuorteva, H.; Parikka, P. and Werres, S. 2000. Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. Mycol. Res. 104(9):1062-1068.
- Harris, C. A.; Renfrew, M. J. and Woolridge, M. W. 2001. Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments. Food Additives and Contaminants, 18(12):1124-1129.
- Juo, A. S. R. and Franzluebbers, K. 2003. Tropical soils: properties and management for sustainable agriculture: Oxford University Press, USA.
- Kamal, S.; Prasad, R. and Varma, A. 2010. Soil microbial diversity in relation to heavy metals Soil Heavy Metals. Springer Berlin Heidelberg. 19:31-63.
- Kavitha, A.; Vijayalakshmi, M.; Sudhakar, P. and Narasimha, G. 2010. Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. Afr. J. Microbiol. Res. 4(1):27-32.
- Kinderlerer, J. L. 1993. Fungal strategies for detoxification of medium chain fatty acids. International Biodeterioration Biodegradation. 32(1-3):213-224.
- Kumar, P.; Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol. Res. 167(8):493-499.
- Levy, E.; Eyal, Z.; Chet, I. and Hochman, A. 1992. Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 40(3):63-171.
- Mayfield, C. I.; Williams, S. T.; Ruddick, S. M. and Hatfield, H. L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. Soil Biol. Biochem. 4(1):79-91.
- Mostowfizadeh-Ghahamfarsa, R. and Banihashemi, Z. 2005. Identification of soil *Pythium* species in Fars province of Iran. Iranian J. Sci. Technol. Trans. a-Sci. 29(A1):79-87.
- Osborn, A. E.; Bowyer, P. and Daniels, M. J. 1996. Saponin detoxification by plant pathogenic fungi. In: Waller, G. R. and Yamasaki, K. (Eds.). Saponins Used in Traditional and Modern Medicine. 404:547-555.
- Prosser, B. I. T. and Palleroni, N. J. 1978. Nutritional characterization of some selected actinomycetes. Int. J. System. Bacteriol. 28(4):516-522.
- Ramírez-Legarreta, M. R. y Jacobo-Cuéllar, J. L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. Rev. Mex. Fitopatol. 20(2):168-173.
- Ramírez-Legarreta, M. R.; Jacobo-Cuéllar, J. L.; Ávila-Marioni, M. R. y Parra-Quezada, R. Á. 2004. Eficiencia del uso de plaguicidas en huertos de manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. Rev. Mex. Fitopatol. 22(3):403-413.
- Samaniego-Gaxiola, J. 2007. Research perspectives on *Phymatotrichopsis omnivora* and the disease it causes. Agric. Téc. Méx. 33(3):309-318.
- Schoonbeek, H. J.; Raaijmakers, J. M. and De Waard, M. A. 2002. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. Molecular Plant-Microbe Interactions, 15(11):1165-1172.
- Serdani, M.; Kang, J. C.; Andersen, B. and Crous, P. W. 2002. Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. Mycol. Res. 106:561-569.
- Shirling, E. t. and Gottlieb, D. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. System. Bacteriol. 16(3):313-340.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) 2013. Producción agrícola por estado. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>.

- Srinivasan, M. C.; Laxman, R. S. and Deshpande, M. V. 1991. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes - an overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7(2):171-184.
- ten Hoopen, G. M. and Krauss, U. 2006. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: a review. *Crop Protection.* 25(2):89-107.
- Tewoldemedhin, Y. T.; Mazzola, M.; Botha, W. J.; Spies, C. F. J. and McLeod, A. 2011. Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 130(2):215-229.
- Tsoraeva, A. and Zhurbenko, R. 2000. Development and characterization of a mixed nutrient base for the culture of a wide range of microorganisms. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42(4):155-162.
- Valois, D.; Fayad, K.; Barasubiye, T.; Garon, M.; Dery, C.; Brzezinski, R. and Beaulieu, C. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5):1630-1635.
- Vieira, F. C. S. and Nahas, E. 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiol. Res.* 160(2):197-202.
- Vruggink, H. 1976. Influence of agricultural crops on the actinomycetes flora in soil. *Plant Soil.* 44(3):639-654.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487-511.
- Xue, L.; Xue, Q.; Chen, Q.; Lin, C.; Shen, G. and Zhao, J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Protection.* 43:231-240.