

ANTIFÚNGICOS DE ORIGEN NATURAL FRENTE A LOS DE SÍNTESIS QUÍMICA PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN *Chenopodium quinoa* "QUINUA"

Antifungals of natural origin from the chemical synthesis of control against phytopathogenic fungi of *Chenopodium quinoa* "QUINUA"

Dina Heidi Horna Inga¹
Carlos Alberto Sialer Guerrero²
Marianella Elizabeth Incio Granthon³
Adita Amalia Hernández Centurión⁴
Jorge Luis Leiva Piedra⁵

Fecha de recepción: 21 junio 2014

Fecha de aceptación: 23 junio 2014

Resumen

Los hongos fitopatógenos son responsables de muchas enfermedades en cultivos de importancia económica, como la quinua, los cuales son tratados con diversos compuestos fungicidas, tóxicos y acumulables tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Por ello es necesario la utilización de microorganismos nativos, como los **actinomicetos**, productores de compuestos bioactivos que controlan biológicamente a los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*, que causan en el cultivo de la quinua serias enfermedades a nivel radicular y de tallo.

En el presente trabajo, se seleccionó por su actividad antagónica frente a los mencionados hongos fitopatógenos a 43 cepas de actinomicetos, que fueron previamente aisladas y caracterizadas en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Señor de Sipán, y luego se les evaluó comparativamente frente a los fungicidas de síntesis química. Siendo el 48.8% efectivas frente a *Fusarium sp.*, el 16.2% frente a *Rhizoctonia sp.* y 34.8% efectivas frente a ambos. Además según el potencial de su actividad antagónica *in vivo*, se determinó que las mejores cepas antagónicas frente a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.* fueron las cepas Q043, Q033, Q002 y Q074, Q113, Q067, respectivamente. La cepa de *Streptomyces* Q113 presentó la mayor actividad antagónica *in vitro* e incluso comparada con la acción fungicida de los compuestos comerciales de síntesis química Infinito (Bayer) y Opera (BASF) y

¹ Adscrito al Parque Científico Tecnológico, Doctor, Universidad Señor de Sipán, Lambayeque, Pimentel, Perú, dinahorna@crece.uss.edu.pe.

² Adscrito al Parque Científico Tecnológico, Doctor, Universidad Señor de Sipán, Lambayeque, Pimentel, Perú, carlossialer@crece.uss.edu.pe.

³ Adscrito a la escuela de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior, Licenciada en Biología, Universidad Señor de Sipán, Lambayeque, Pimentel, Perú, marianellainciouss@gmail.com

⁴ Adscrito a la escuela de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior, Licenciada en Biología, Universidad Señor de Sipán, Lambayeque, Pimentel, Perú, ahernandezs@gmail.com

⁵ Adscrito al Parque Científico Tecnológico, Ingeniero Agrónomo, Universidad Señor de Sipán, Lambayeque, Pimentel, Perú, jorgeleiva@crece.uss.edu.pe.

de acción semejante a la de Amistar Top (Syngenta). De este modo se comprobó que las cepas de actinomicetos seleccionados son agentes muy prometedores para el control biológico de *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.* en quinua.

Palabras claves: Antifúngicos, Actinomicetos, fitopatógenos, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, quinua.

Abstract

The phytopathogenic fungi are responsible for many diseases in economically important crops, such as quinoa, which have been treated with various compounds fungicides, toxic and cumulative for both humans and for the environment. Therefore the use of native microorganisms, including actinomycetes, producers of bioactive compounds to biologically control plant pathogenic fungi *Fusarium sp* and *Rhizoctonia sp.*, they cause serious illness to the root level and stem quinoa.

In this paper, we were able to select for their antagonistic activity against the phytopathogens fungi, 43 actinomycetes strains that were previously isolated and characterized in the laboratory of Agrobiotechnology of Señor de Sipán University, and then were evaluated comparatively against chemical fungicides. Being 48.8% effective against *Fusarium sp.*, 16.2% against *Rhizoctonia sp.* and 34.8% effective against both. Also according to the potential of its antagonistic activity *in vivo*, we determined that the best antagonistic strains against *Fusarium sp.* and *Rhizoctonia sp.* were the Q043, Q033, Q002 and Q074, Q113, Q067, respectively strains. *Streptomyces* Q113 showed the highest antagonistic activity strain *in vitro* and even compared with the fungicidal action of the compounds of chemical synthesis commercial Infinite (Bayer) and Opera (BASF) and similar in the Top Amistar (Syngenta) action. Thus it was found that selected strains of Actinomycetes are promising agents for the biological control of *Fusarium sp.* and *Rhizoctonia sp.* of quinoa.

Key words: Antifungic, Actinomycetes, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, quinua

1. Introducción

Uno de los motivos de la degradación de tierras agrícolas en nuestra región, por lo cual se vienen perdiendo exponencialmente, es la incorporación de diversos compuestos agroquímicos aplicados para el control de enfermedades y plagas, como fungicidas y pesticidas, cuya composición en base a compuestos organoclorados, con contenidos de sodio, flúor, boro, cobre, arsénico, etc. Sugieren por incorporarse en la cadena trófica, ser uno de los motivos principales de la aparición de diversas enfermedades en los seres humanos, como cáncer, alteraciones genéticas, neurodegenerativas, cardíacas, renales, hepáticas, esterilidad e intoxicaciones que pueden causar la muerte inmediata, así mismo causar efectos negativos sobre otros seres vivos y el medio ambiente.

Actualmente el Ministerio de Agricultura de Perú, recomienda para los cultivos de quinua atacados por hongos fitopatógenos el uso de diversos fungicidas de síntesis química como Homai BASF (Thiophanate methyl + Thiram), Revus® Syngenta (Mandipropamida), Acrobat® SC BASF-Nufarm (Dimethomorph); siendo el primero el único fungicida recomendado para su uso en semillas para el control de *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y los demás para otros tipos de hongos fitopatógenos, pero todos difícilmente biodegradables, bioacumulables y contaminantes del medio ambiente, muy tóxicos para animales acuáticos y otros seres vivos. (Taylor *et al.*, 201; EPA)^{1,2}. Investigaciones previas han demostrado que los biocidas de síntesis química, son capaces de matar insectos benéficos del suelo y microorganismos simbióticos de la rizósfera (Bartlett *et al.*, 2002)³. Así mismo su eficacia se ve disminuida en el tiempo por la frecuencia y sobredosificación en su uso, debido a la evolución de patógenos resistentes (Rosenberger y Meyer, 1981)⁴

Por lo tanto el control biológico, como el uso de antifúngicos de origen natural, son una alternativa ambientalmente saludable al uso de fungicidas de síntesis química. Los Actinomicetos, son microorganismos considerados de gran importancia entre otros, por su capacidad de producir diversos e interesantes compuestos bioactivos con actividad antibacteriana, antifúngica, plaguicida, herbicida y otros compuestos de interés industrial, etc., (Berdy, 2005)⁵. Además son potencialmente capaces de colonizar diversos nichos ecológicos incluyendo hábitats marinos (Harvey, 2000)⁶, con alta o baja disponibilidad de materia orgánica e incluso en donde las condiciones ambientales, podrían ser consideradas adversas para otros seres vivos (Leveav y Bovix, 2000; Doroshenko *et al.*, 2005)^{7,8}.

Con la finalidad de proteger a la semilla y a la planta sobre todo en su etapa de germinación, en este trabajo hemos determinado y seleccionado por su actividad antagónica sobre dos hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* y *Fusarium*, tanto *in vitro* (Franco, 1999; Ara *et al.*, 2012)^{9,10} como *in vivo*, a una colección de microorganismos reconocidos fenotípicamente y genotípicamente como Actinomicetos, los cuales fueron

aislados desde suelos eriazos del campo experimental de la Universidad Señor de Sipán, ubicados en la región Lambayeque.

2. Material y métodos

2.1. Hongos patógenos y condiciones de cultivo.

Los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia sp.* y *Fusarium sp.* fueron aislados en el Laboratorio de Agrobiotecnología de PACTUSS (Parque Científico Tecnológico de la Universidad Señor de Sipán), los cuales, luego de comprobar su capacidad infectiva sobre plántulas de quinua, se mantuvieron en Agar Sabouraud y se almacenaron a 4 °C.

2.2. Reconstitución de cepas de Actinomicetos.

A partir del banco de cepas de actinomicetos del Laboratorio de Agrobiotecnología de PACTUSS, se realizó la reconstitución de **141 cepas de actinomicetos**, las cuales fueron identificadas microscópica, macroscópica, bioquímica y molecularmente por Dina Horna y colaboradores (2013) en el proyecto "Caracterización de actinomicetos desde suelos eriazos de la región Lambayeque productores de compuestos bioactivos contra fitopatógenos de *Chenopodium quinoa*", subvencionado por el CONCYTEC.

Para la reconstitución se tomaron 30 ml. de medio avena líquido (avena comercial en hojuelas y sacarosa, pH 6.8), y por cada cepa de actinomiceto se inocularon con 100 µl de las esporas conservadas en 1 ml. de glicerol al 50%.

2.3. Selección de actinomicetos con actividad antagónica *in vitro* contra hongos fitopatógenos.

El efecto antagónico y la producción antibiótica de los actinomicetos aislados se evaluó por triplicado utilizando una versión ligeramente modificada del método del cultivo dual (Landa *et al.*, 1997)¹². Donde en una placa se sembró un inóculo de $1,3 \times 10^7$ UFC/g de cada hongo fitopatógeno en un extremo y en el otro extremo se colocó un inóculo de $1,3 \times 10^7$ UFC/g de cada actinomiceto, además se sembró una placa control para cada hongo fitopatógeno. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 3, 5 y 7 días a 30° C. Los halos de inhibición de los compuestos bioactivos producidos por los actinomicetos contra los hongos fitopatógenos se midieron en mm. Teniendo en cuenta el radio de mayor distancia se usó la fórmula siguiente para calcular el efecto inhibitorio:

$$IR (\%) = (D_c - D_t / D_c) \times 100$$

Donde IR= rango de inhibición (%); D_c= diámetro de control negativo (mm) y D_t= diámetro de tratamiento o control positivo.

2.4. Extracción de los compuestos bioactivos de Actinomicetos.

Se inocularon esporas de los Actinomicetos seleccionados por su actividad antagónica *in vitro* a 30 ml de medio R5A (Fernández y col., 1998)¹⁶, medio líquido utilizado para la producción y aislamiento de compuestos bioactivos. Los matraces fueron incubados a 30°C a 250 rpm en agitación por 7 días. Posteriormente los compuestos fueron extraídos con acetato de etilo, luego se realizó la evaporación del solvente y finalmente el extracto seco se resuspendió en metanol.

2.5. Evaluación y comparación de la actividad antagónica *in vitro* de los compuestos bioactivos de Actinomicetos con los antifúngicos de síntesis química.

Para la evaluación y comparación de la actividad antagónica, se colocaron 20 µl de los compuestos bioactivos extraídos de las cepas seleccionadas con mayor actividad antifúngica y de los fungicidas químicos comerciales más utilizados como Amistar-Top (Syngenta), Infinito® 687.5 SC (Bayer CropScience AG) y Opera (BASF), en las dosis recomendadas en las fichas técnicas para cada compuesto, con la finalidad de evaluar comparativamente el espectro de acción y grado de competitividad frente a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*

2.6. Evaluación de la actividad antagónica *in vivo* de los compuestos bioactivos extraídos de Actinomicetos.

Para la evaluación de la actividad antagónica *in vivo* sobre plántulas de quinua, se esterilizó tierra de cultivo y humus de lombriz en una proporción 2:1 respectivamente en una autoclave a 121 °C por 30 minutos; después se desinfectaron las semillas de quinua var. Pasankalla con hipoclorito de sodio al 3% por 5 min., luego fueron secadas y sembradas en el sustrato esterilizado.

Para determinar la concentración de UFC de *Fusarium sp.*; se tomó a partir de una suspensión de esporas con agua destilada estéril y Tween 20, y se realizó el conteo de las esporas en una cámara de Neubauer; determinándose la concentración a usar de [UFC] = 5×10^4 esporas/ml de *Fusarium sp.* Para el caso de *Rhizoctonia sp.*, a la placa donde se había sembrado el hongo se le agregó 1 ml de agua destilada estéril y con la ayuda de un escarpelo estéril se hizo un raspado suave para desprender las unidades infectivas (micelios), esta operación se repitió 2 veces; siendo los 2 ml obtenidos diluidos en 100 ml de agua destilada estéril.

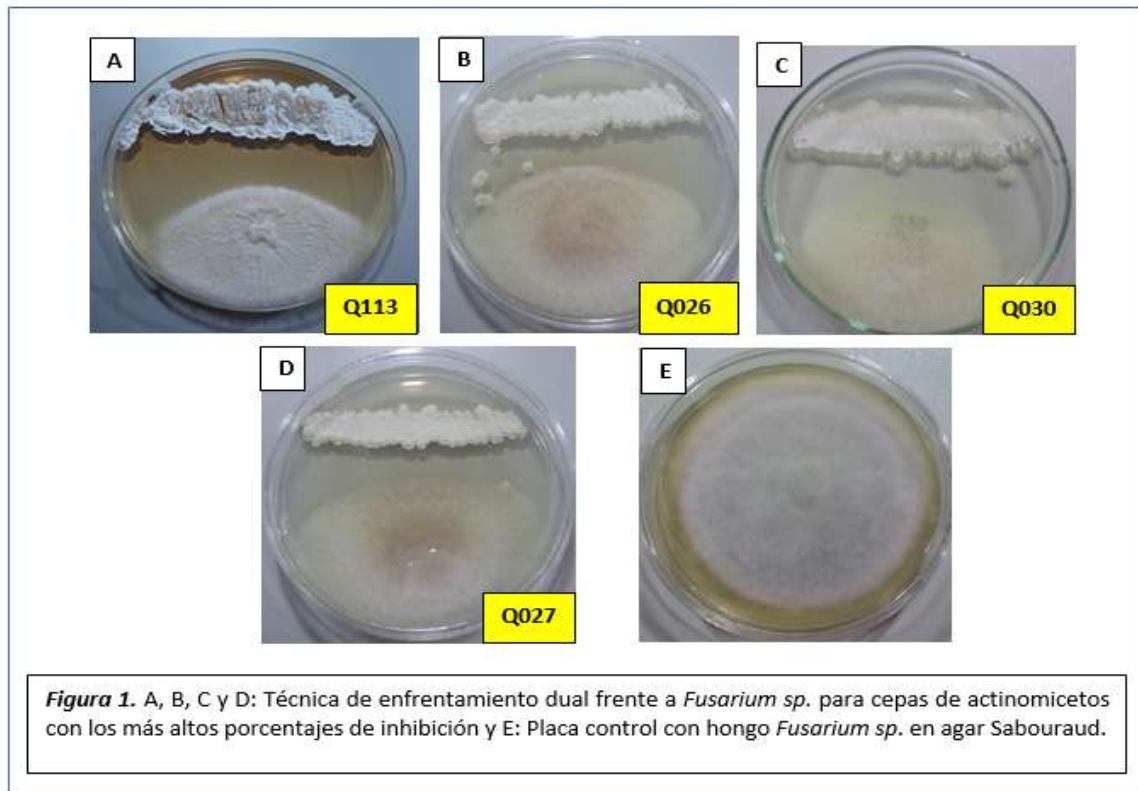
Después de 10 días de germinación de las semillas de quinua, se aplicó las suspensiones de los hongos en estudio a cada planta; inoculándose 5 ml de la suspensión, en la región donde previamente se generó una lesión (a 1 cm del cuello del tallo) con la ayuda de un bisturí. De inmediato se procedió a aplicar el tratamiento, asperjándose 1ml del compuesto bioactivo extraído de los Actinomicetos seleccionados; así mismo se aplicó como agente control los fungicidas químicos comerciales Amistar-Top (Syngenta), Infinito® 687.5 SC

(Bayer CropScience AG) y Opera (BASF) a una dosis recomendada por cada casa comercial. Esto se realizó en 10 plantas por tratamiento, y luego de 15 días se evaluó la actividad antagonista *in vivo*.

3. Resultados

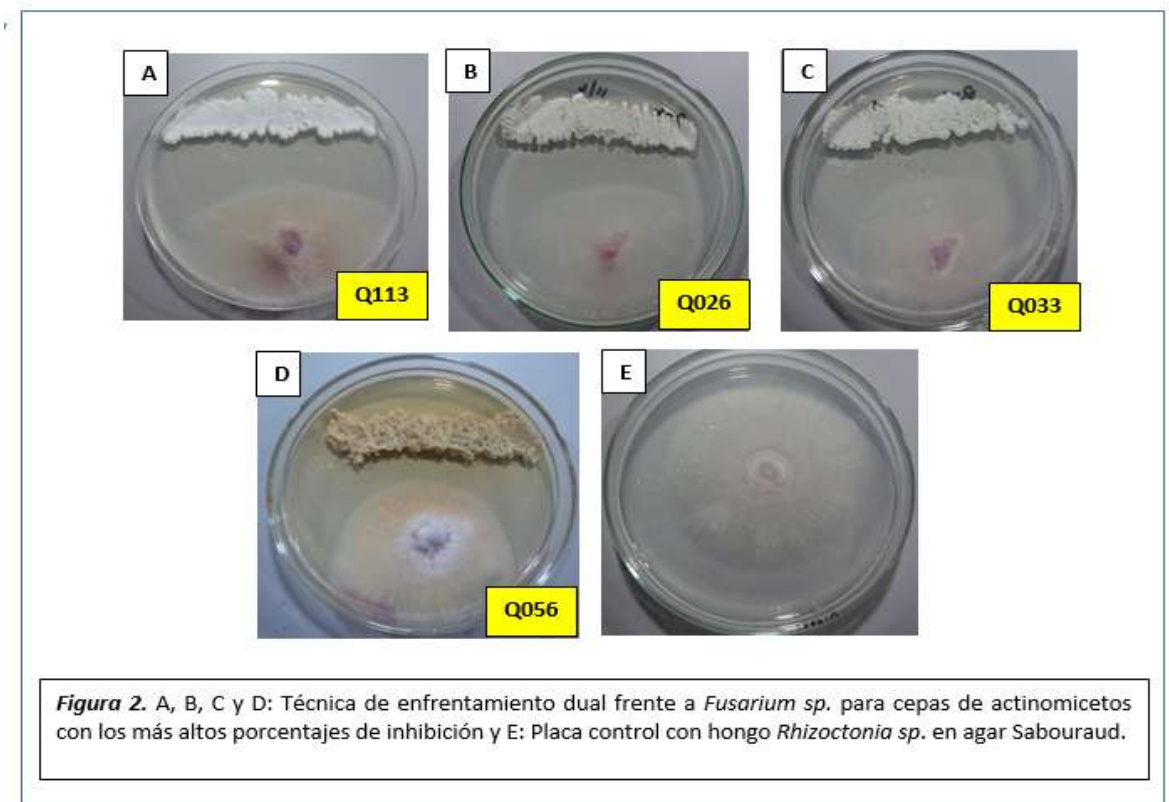
3.1. Ensayo de actividad antifúngica *in vitro*

De las 43 cepas de Actinomicetos, 19 cepas presentaron antagonismo sólo frente a *Fusarium*, 6 sólo frente a *Rhizoctonia* y 15 cepas para ambos hongos fitopatógenos. Siendo las cepas de actinomicetos: Q113, Q026, Q030 y Q027 las que mostraron mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium sp*, presentando valores de: 85%, 65.19%, 64.80% y 63.84%; respectivamente, comparado con el crecimiento de *Fusarium sp* sin la influencia de ningún agente antagonista (Figura 1).



Del mismo modo las cepas de actinomicetos: Q113, Q026, Q033 y Q056 mostraron mayor porcentaje de inhibición frente a *Rhizoctonia sp.*, presentando valores de: 88%, 65.50%, 64.20% y 63.20% respectivamente, teniendo como blanco el crecimiento de *Rhizoctonia sp.* sin la influencia de ningún agente antagonista (Figura 2).

En el ANOVA para el estudio del efecto inhibitorio en porcentaje, se evaluaron 14 cepas de Actinomicetos frente al crecimiento de *Fusarium sp.*, donde se observa que entre los tratamientos hubo una diferencia altamente significativa; con valores de CV= 0.85 y $R^2= 99.4\%$, valores de confiabilidad aceptables para pruebas en laboratorio. Así mismo en la prueba de TUKEY (0,05) que se utilizó para determinar en este estudio el comportamiento de inhibición de los tratamientos frente a *Fusarium sp.*, el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición *in vitro* fue aquel en donde se utilizó la cepa Q113, con un porcentaje de inhibición del 85%; seguido de la cepa Q026 con un 75% de inhibición; también se puede observar en dicha prueba que entre los tratamientos donde se utilizó la cepas Q030, Q027, Q043 y Q067; no hubo diferencia significativa, mostrando porcentajes de inhibición de 66.5%, 65.9%, 65.5% y 65.3% respectivamente; similar efecto se muestra entre los tratamientos donde se utilizaron las cepas Q019, Q107, Q004, Q057; en las que no hubo diferencia estadística significativa. El tratamiento que mostró el % de inhibición más bajo fue la cepa Q029 con un 27.25% de inhibición a *Fusarium sp.*



En el ANOVA para el estudio del efecto inhibitorio en porcentaje, se seleccionaron 12 cepas de Actinomicetos frente al crecimiento de *Rhizoctonia sp.*, se observa que entre los tratamientos si hubo una diferencia altamente significativa; con valores de CV= 1.63 y $R^2= 97.9\%$, valores de confiabilidad aceptables para

pruebas en laboratorio. Así mismo en la prueba de TUKEY (0,05) que se utilizó para determinar en este estudio, el comportamiento de inhibición de los tratamientos frente a *Rhizoctonia sp.*, el tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición *in vitro* fue aquel en donde se utilizó la cepa Q113, con un porcentaje de inhibición del 88%; también se puede observar en dicha prueba que entre los tratamientos donde se utilizó la cepas Q026, Q033, Q056, Q019; no hubo diferencia significativa, mostrando porcentajes de inhibición de 65.5%,64.2%, 63.90% y 63.20% respectivamente; similar efecto se muestra entre los tratamientos donde se utilizaron las cepas Q104, Q071. El tratamiento que mostró el % de inhibición más bajo fue la cepa Q105 con un 20% de inhibición a *Rhizoctonia sp.*

Cuando se comparó el efecto inhibitorio de las cepas de Actinomicetos frente a los dos hongos fitopatógenos, las cepas Q113, Q019, Q026, Q033 y Q074, resultaron ser las mejores cepas antagonistas, capaces de inhibir a los dos hongos a la vez. Estas cepas producen diversos compuestos bioactivos, los cuales se difunde por el medio inhibiendo el crecimiento del hongo fitopatógeno. Siendo la cepa Q113, de amplio espectro capaz de inhibir *in vitro* tanto a *Fusarium sp.* como a *Rhizoctonia sp.* con un 88% y 85% respectivamente. Igualmente pero en menor grado las cepas Q026, Q033, Q019 y Q074 son capaces de inhibir ambos hongos fitopatógenos en estudio (Figura 3).

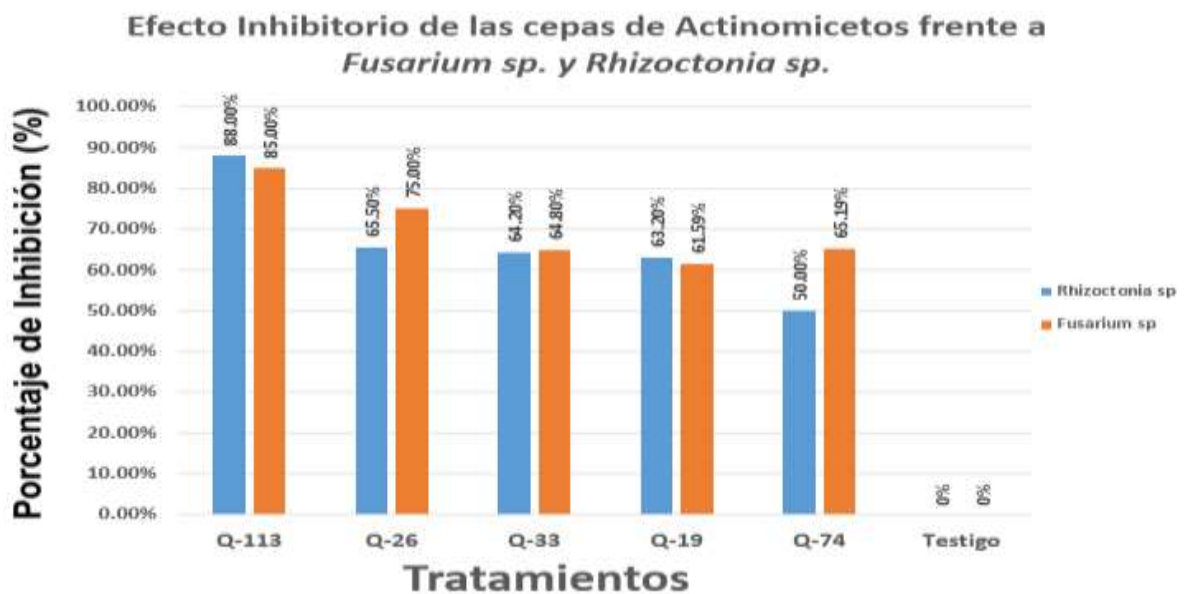


Figura 3. Cuadro comparativo de la actividad antagonica *in vitro* de las cepas de actinomicetos frente a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*

3.2. Evaluación y comparación de la actividad antagónica *in vitro* de compuestos bioactivos extraídos de Actinomicetos y fungicidas comerciales sobre *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*

Los compuestos bioactivos extraídos con acetato de etilo de las cepas antagónicas seleccionadas, y los fungicidas de síntesis química se enfrentaron a los hongos fitopatógenos, siendo el extracto de la cepa **Q113**, identificada como perteneciente al género *Streptomyces sp.* con mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*, e incluso mayor efecto inhibitorio cuando se le comparó con los fungicidas químicos comerciales Amistar-Top (Syngenta), Infinito (Bayer) y Opera,. Los cuales se enfrentaron para comparar su actividad antagónica y determinar su espectro de acción *in vitro* contra *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*, donde se evidenció que tanto para *Fusarium sp.* como para *Rhizoctonia sp.*, fueron efectivos tanto el compuesto bioactivo de la cepa Q113 como el fungicida Amistar-Top; más no se evidenció efecto inhibitorio con los fungicidas Infinito y Opera. (Figura 4).

Cabe resaltar que tanto los compuestos bioactivos extraídos como los cultivos líquidos de las cepas Q002, Q019, Q026, Q033, Q074 y Q113 presentaron efecto antagónico frente a los dos hongos fitopatógenos.

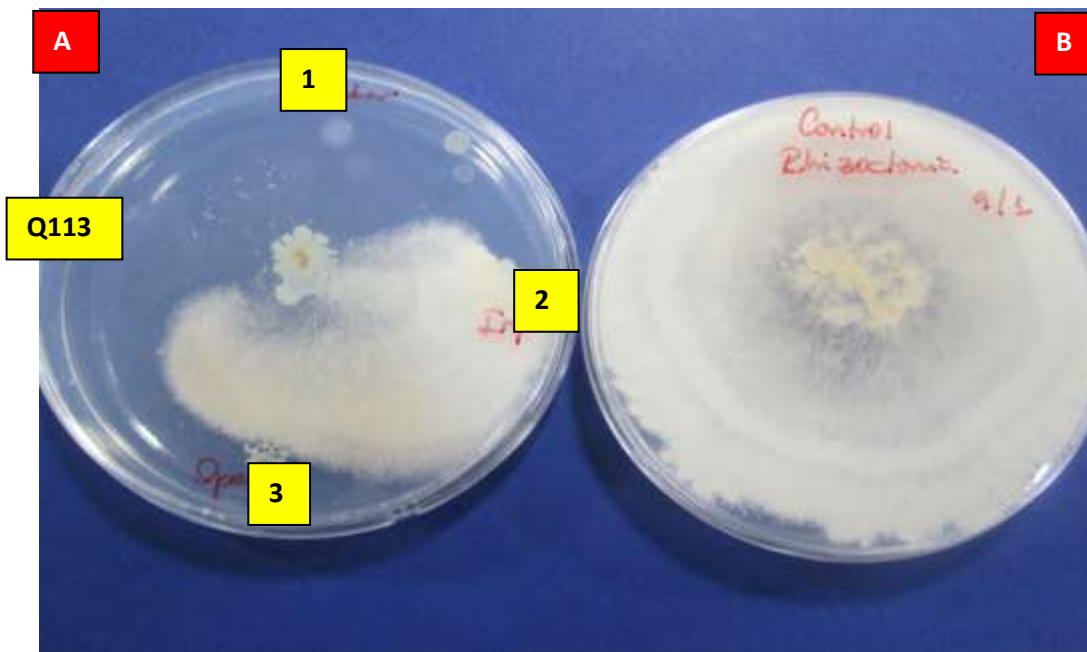


Figura 4. A) Comparación del efecto antagónico bioactivo de la cepa Q113 y de los fungicidas químicos comerciales 1. Amistar-Top (Syngenta), 2. Infinito (Bayer) y 3. Opera (BASF); frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia sp.* B) Placa control de *Rhizoctonia sp.*

3.3. Evaluación de la actividad antagónica *in vivo* de los compuestos bioactivos de Actinomicetos sobre *Fusarium* y *Rhizoctonia*.

Según los resultados del ensayo *in vitro*, 14 cepas de actinomicetos fueron seleccionados para el ensayo *in vivo*, por su capacidad de inhibir a los hongos fitopatógenos en estudio. En la Figura 5, se muestra que el compuesto bioactivo que mostró un mayor control al hongo fitopatógeno *Fusarium sp.* fue la cepa Q043 con un control del 100%, observándose que ninguna de las plántulas de quinua tratadas mostraron signos y síntomas de la enfermedad (Figura 6); mientras que los tratamientos donde se usaron los compuestos bioactivos de las cepas Q033, Q002 y Q074 mostraron porcentajes de control entre el 60-70%; los tratamientos que mostraron los porcentajes de control intermedio fueron donde se usaron los compuestos bioactivos de las cepas Q019, Q067 y Q113, con 50% de control, así mismo la cepa Q026 fue incapaz de mostrar algún tipo de biocontrol; en dicho tratamiento se observó que la incidencia de *Fusarium sp.* en las plántulas de quinua fue del 100% pues todas las plantas sin excepción mostraron los signos y síntomas de la enfermedad, como pudrición del tallo y epinastia respectivamente, resultados que no se corresponden con los obtenidos *in vitro*.



Figura 6. Evaluación de la actividad antagónica *in vivo* en plántulas de quinua a 25 días de su germinación. A) Plántulas de quinua infectadas con *Fusarium sp.* sin la aplicación de compuestos bioactivos (control positivo), B) Plántulas no infectadas con esporas de *Fusarium sp.* sin compuestos bioactivos (control negativo) y C) Plántulas de quinua infectadas con *Fusarium sp.* y tratadas con el compuesto bioactivo de la cepa Q043

En la Figura 7, donde se muestra que la cepa que mostró un mayor control al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia sp.* fue la cepa Q074 con un control del 100%, observándose que las plántulas de quinua que fueron tratadas con el compuesto bioactivo de esta cepa, ninguna mostró signos y síntomas de la enfermedad (Figura 8); seguido de los tratamientos donde se usaron los compuestos bioactivos de las cepas Q002, Q067 y Q113, los cuales mostraron porcentajes de control del 60- 70%; los tratamientos que mostraron los porcentajes de control intermedio fueron los de las cepas Q026 y Q043, con un porcentaje de control del 50%, así mismo las cepas Q019 y Q033 fueron incapaces de mostrar algún tipo de biocontrol; en dichos

tratamientos se observó que la incidencia de *Rhizoctonia sp.* en las plántulas de quinua fue del 100%, pues todas las plantas sin excepción mostraron los signos y síntomas de la enfermedad como pudrición del tallo y marchitamiento.

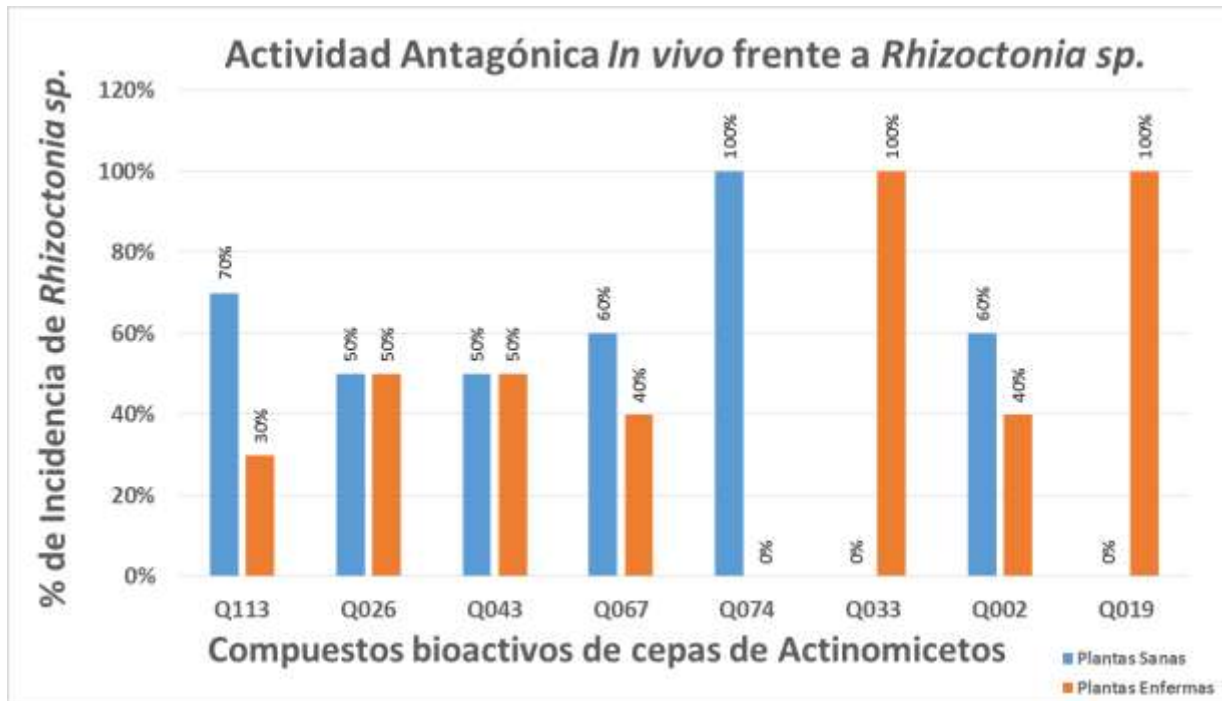


Figura 7. Evaluación antagónica in vivo de compuestos bioactivos extraídos de Actinomicetos en plántulas de quinua infectadas con *Rhizoctonia sp.*. Fueron determinados a los 25 días de la germinación de la planta y a los 15 días de la infectación.

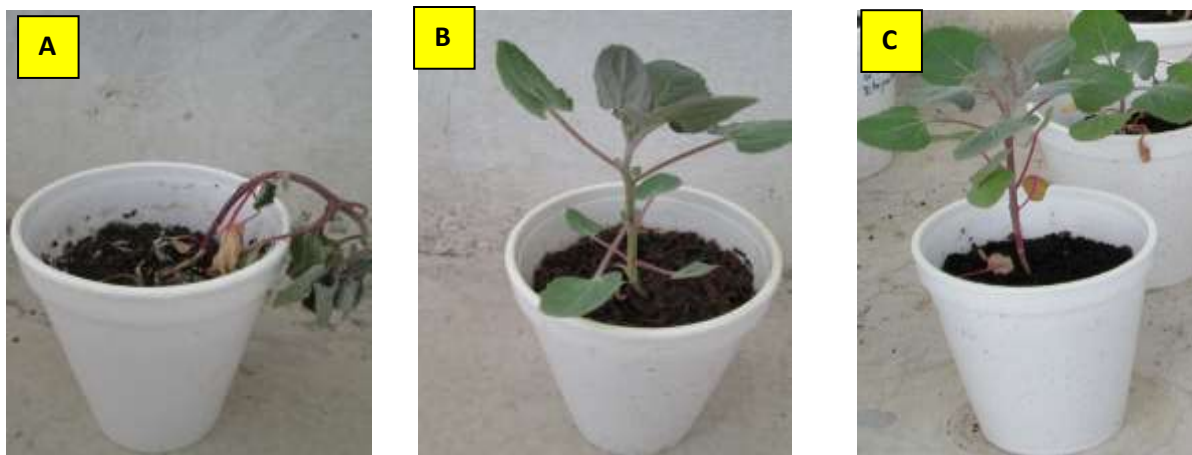


Figura 8. Evaluación de la actividad antagónica in vivo en plántulas de quinua a 25 días de su germinación. A) Plántulas de quinua infectadas con *Rhizoctonia sp.* sin la aplicación de compuestos bioactivos (control positivo), B) Plántulas no infectadas con esporas de *Rhizoctonia sp.* sin compuestos bioactivos (control negativo) y C) Plántulas de quinua infectadas con *Rhizoctonia sp.* y tratadas con el compuesto bioactivo de la cepa Q074.

4. Discusión

La quinua por su constitución química y biológica, rica en nutrientes, es atacada por diversas enfermedades y plagas, es decir constituye un alimento nutritivo para muchos organismos desde los más simples como bacterias y hongos hasta los más complejos. Por ello el control biológico es una alternativa efectiva al uso de pesticidas y antifúngicos de síntesis química, los cuales a menudo son acumulados en la planta y son letales para organismos benéficos, animales y el ser humano.

En la actualidad es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos respetuosos del medio ambiente y que sean efectivos para ser usados en controles fitosanitarios. Aunque diferentes microorganismos han sido utilizados como agentes de control, los biocidas producidos por bacterias aisladas desde el suelo, constituyen el grupo de compuestos más importante para la inhibición del crecimiento de fitopatógenos, en los que, la aparición de resistencias evolutivamente es constante (Rubio-Reque *et al* 2008)¹³.

El presente trabajo está basado en un screening (escrutinio) de compuestos bioactivos antagónicos de microorganismos, a través de un proceso de dereplicación de extractos de Actinomicetos de suelos eriazos con origen marino, al igual que los trabajos realizados por Goodfellow y Williams, 1983¹⁴; Stach y Bull, 2005¹⁵.

La dereplicación en búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos en 141 cepas de actinomicetos, se enfocó en la evaluación antagónica de las 43 cepas seleccionadas por su actividad antifúngica, en donde el mayor número de cepas 40 (93%) pertenecen al género más grande y mayormente estudiado de los actinomicetos, *Streptomyces*, y tan sólo 3 (7%) estarían agrupadas entre géneros de actinomicetos no muy frecuentes *Prauseria* y *Nocardiosis*. Al igual que lo demostraran los estudios realizados por Smith *et al.*, 1990¹⁶; Yuan y Crawford, 1995¹⁷; Doumbou *et al.*, 2001¹⁸; Boruwa *et al.*, 2004¹⁹ y Ezra *et al.*, 2004²⁰.

Nosotros al germinar quinua hemos aislado e identificado hongos fitopatógenos del genero *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Estas cepas nos permitieron efectuar la evaluación antagónica de nuestros aislamientos *in vitro*. Los cuales han demostrado que 30.5% de las cepas de actinomicetos originalmente aislados (141), han sido capaces de inhibir ya sea como fungistáticos o fungicidas a estos hongos fitopatógenos causantes de la podredumbre radicular y del tallo, de cultivos como la quinua. Ambas especies distribuidas en los suelos indistintamente a la presencia o no de su hospedero, sobreviven largos periodos de tiempo, existiendo trabajos como el de Dřímalková y Veverka en 2004²¹ que demuestran el grado de infectividad de los fitopatógenos y la sensibilidad de las plantas de quinua frente a ellos.

Desconocemos aún la función exacta de los nuevos fungicidas; ya que la verdadera función ecológica de estos compuestos bioactivos es difícil de determinar, pero se asume que tienen un rol defensivo ya que según nuestros resultados podemos asumir que algunas cepas producen compuestos con actividad biológica de amplio espectro como de espectro definido y otras son capaces de usar a *Fusarium* y *Rhizoctonia* como sustrato.

Existen fungicidas recomendados actualmente por el Ministerio de Agricultura para el control de *Rhizoctonia* y *Fusarium*, como Benzomyl (Benomilo), Rhizolex-T (tolclofos metil y thiram), y Homai WP (thiram y tiofanate-metil) cuyos principios activos interfieren en el metabolismo de los seres vivos y son potencialmente mutágenos, cancerígenos, irritantes, etc. por lo que su uso es controlado y a veces restringido por la normativa de la UE y Norteamericana. Información recogida en campo, han demostrado que en la región nor oriental de Perú, los fungicidas químicos comerciales más utilizados son Amistar-Top (Syngenta), Infinito® 687.5 SC (Bayer CropScience AG) y Opera (BASF). Todos clasificados y agrupados por su constitución química como organoclorados al igual que Homai WP, y con radicales químicos como el cianuro (Howell *et al.*, 2013)²² y fluor. Cabe resaltar, que recientemente publicaciones científicas los vienen relacionando también con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson (Ascherio *et al.*, 2006)²³ y Alzheimer (Richardson *et al.*, 2014)²⁴ e incluso endometriosis (Upson *et al.*, 2013)²⁵.

Una de nuestras cepas la Q113, al comparar su espectro de acción fungicida *in vitro* mostró ser superior a la de Opera e Infinito; y con una eficiencia y eficacia antifúngica comparable a la de Amistar-Top, el cual lleva en su composición química cianuro. Estos datos resaltan el potencial que tienen los microorganismos de producir moléculas bioactivas alternativas, con reducido impacto sobre la salud humana y ambiental, y por su origen capaces de evolucionar en la naturaleza, variando su estructura molecular como alternativa para superar los factores de resistencia monogénicas o poligénicas, verticales o horizontales, que desarrollan los patógenos con su constante variabilidad.

Hemos evidenciado además luego de experimentar pruebas *in vivo* sobre plántulas de quinua, que el comportamiento y grado de acción esperado varía, así como la actividad fungicida. Es decir, algunos extractos de cepas como la Q026, Q019 y Q033 que mostraron actividad *in vitro* frente a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.* respectivamente, no mostraron actividad *in vivo*. Esto podría ser debido a que los compuestos biocidas extraídos con acetato de etilo, podrían ser inestables a las condiciones ambientales, y necesitarían en su formulación el acompañamiento de aditivos u otros estabilizadores. Mientras que para el caso de las cepas Q045, Q057, Q094 y Q099 sus cultivos líquidos probados *in vivo* directamente tuvieron efecto

fungicida. Resultados relacionados con los de Xue *et al.*, 2013²⁶ quien ensayando con 4 cepas de *Streptomyces*, no encontró correlación entre los ensayos *in vivo* con la bioeficacia del control biológico.

En otros casos, los cultivos líquidos de algunas cepas como las cepas Q079 y Q007, probados mediante la técnica dual *in vitro* presentaron halos de inhibición con efecto antagónico reducido, pero al experimentar con su cultivo líquido, es decir sin extraer el compuesto con acetato de etilo, se observa mejor halo de inhibición. Esto explica la hidrofilia de algunos compuestos bioactivos que además se producen tan solo en suspensión líquida, es decir que por su composición química no se pueden extraer mediante compuestos orgánicos como el acetato de etilo, tal y como ocurre con algunos compuestos β -lactámicos (Núñez *et al.*, 2003)²⁷. Debiéndose resaltar que algunos compuestos bioactivos extraídos mantuvieron un espectro de acción en ambas condiciones es decir, las cepas Q043, Q002, Q033, Q074 fueron efectivas tanto *in vitro* como *in vivo* para *Fusarium sp.* y los compuestos bioactivos de las cepas Q074, Q113, Q002, Q067 lo mismo para *Rhizoctonia sp.*

Se espera por lo tanto complementar este estudio con los resultados de los cromatogramas de los compuestos bioactivos de las distintas cepas, mediante el análisis de la composición y espectros de absorción de los compuestos producidos, como una huella química de sus metabolomas. Estimamos que esta estrategia nos orientará y dará pistas a la hora de identificar otras cepas que pudieran estar produciendo el mismo metabolito secundario, mediante un estudio más profundo a través de la Espectrometría de masas, recomendadas por la complejidad genética y fenotípica del complejo ciclo vital de los actinomicetos

5. Conclusiones

De las 141 cepas de Actinomicetos, 43 fueron seleccionadas por su actividad antagónica frente a hongos fitopatógenos, efecto evidenciado tanto por sus extractos orgánicos como por sus cultivos líquidos, probados tanto *in vitro* como *in vivo*. Se demostró que la cepa Q113 es tan efectiva en su acción *in vitro* sobre *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*, como el fungicida de síntesis química comercial Amistar Top (Syngenta), el cual es considerado tóxico por contener cianuro en su formulación.

Los resultados de antagonismo fungicida *in vitro* difieren de los de *in vivo*, aún así, se pudo observar que las mejores cepas antagonistas frente a plantas de quinua infectadas con *Fusarium sp.* fueron las cepas Q043, Q033 y Q002 y frente a plantas infectadas con *Rhizoctonia sp.* fueron las cepas Q074, Q113 y Q067.

6. Referencias

- (1) **Taylor, M.J., Melton, L.M, Sharpa, E.A. and Watson, J.E. (2013).** Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of multiple pesticide residues involved in suspected poisoning of non-target vertebrate wildlife, livestock and pets. *Analytical Methods*,5, 248-259
- (2) **Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA):** <http://www.epa.gov/espanol/>
- (3) **Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002)** The strobilurin fungicides. *Pest Manage. Sci.* 58: 649–662.
- (4) **Rosenberger DA, Meyer FW (1981).** Post-harvest fungicides for apples: development of resistance to benomyl vinclozolin and iprodione. *Plant Dis.* 65: 1010–1013.
- (5) **Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58, 1-26.
- (6) **Harvey A. (2000).** Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discov Today.* 5:294-300
- (7) **Leveav J, Bovix, M. (2000).** *Microbiología Industrial.* 1ª edición. Ed. Acribia. S.A. España.
- (8) **Doroshenko, E., Zenova G., Zvyagintsev, D., Sudnitsyn, I. (2005).** Spore Germination and Mycelial Growth of Streptomycetes at Different Humidity Levels ,*Microbiology.* 74, No. 6: 690–694.
- (9) **Franco-Correa M. (1999).** Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Microbiología, Departamento de química, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.
- (10) **Ara, I., Bukhari, N., Perveen, K., Bakir, M.(2012).** Antifungal activity of some actinomycetes isolated from Riyadh soil, Saudi Arabia: An evaluation for their ability to control *Alternaria* caused tomato blight in green house pot trial *African Journal of Agricultural Research.* Vol. 7(13), 2042-2050.
- (11) **Landa, B., Hervas A, Bethiol W, Jimenez-Diaz R. (1997).** Antagonistic activity of bacteria from chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Phytoparasitica.* 25:305-318.
- (12) **Fernández, E., Weissbach,U., Reillo, C.S., Braña, A.F.- Méndez, C., Rohr, J., y Salas, J.A. (1988).** Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in tranfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* 180: 4929-4937.
- (13) **Rubio-Reque, G., Baltodano-Sánchez, F., Abanto-Campos, L., Wilson-Krugg,J., Muñoz-Ríos,M. (2008).** Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Rebiol- UNT.* 28,Nº2.
- (14) **Goodfellow, M., y Williams, S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- (15) **Stach, J.E., y Bull, A.T. (2005).** Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87: 3-9.
- (16) **Smith J., Putnam A, y Nair M 1990.** In Vitro Control of *Fusarium* Diseases of *Asparagus officinalis* L. with a *Streptomyces* or Its Polyene Antibiotic, Faeriefungin.

Natural Products Chemistry Laboratory, Department of Horticulture, Michigan State University, J. Agric. Food Chem. 38, 7729-7733.

- (17) **Yuan, W.M. and Crawford, D.L. (1995).** Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied and Environmental Microbiology. Vol 61. Nº8:3119–3128.
- (18) **Doumbou, C.L., Salove, M., Crawford, D., Beaulieu, C. (2001).** Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection. 82, 85-102.
- (19) **Boruwa, J; Kalita, A.; Barua, A; Borah, A.; S. Mazumder, B; Thakur; Gogoib and Borab T.C. (2004).** Synthesis, absolute stereochemistry and molecular design of the new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 14:3571–3574.
- (20) **Ezra, D., Castillo, U. F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B, Condrón, M.A., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, Weber, B. and Yaver, D. (2004).** Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU- 110) endophytic on *Monstera* sp. Microbiology. 150, 785–793.
- (21) **Drimalkova, M. and Veverka, K. (2004).** Seedlings Damping-off *Chenopodium quinoa* Will. Plant Protect. Sci. Vol. 40, No. 1: 5–10
- (22) **Howell, C.C., Semple, K.T., Bending, G.D. (2014).** Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil. Chemosphere, Volume 95, 370-378.
- (23) **Ascherio .A, Chen H., Weisskopf M.G., O'Reilly E, McCullough M.L., Calle E., Schwarzschild M.A. y Thun M.J (2006).** Pesticide exposure and risk for Parkinson's Annals of Neurology disease Volume 60, Issue 2. 197–203pp.
- (24) **Richardson J.R.; Roy A., Shalat S.L.; Von Stein R.T.; Hossain M.M.; Buckley B.; Gearing M.; Levey A; Dwight C. German (2014).** Elevated Serum Pesticide Levels and Risk for Alzheimer Disease *JAMA Neurol.*
- (25) **Upson K., De Roos A.J., Thompson M.L., Sathyanarayana S., Scholes D., Dana Boyd Barr D., y Holt V. (2013).** Organochlorine Pesticides and Risk of Endometriosis: Findings from a Population-Based Case–Control Study. Environ Health Perspect.
- (26) **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.
- (27) **Núñez, L.E., Méndez, C., Braña, A.F., Blanco, G., Salas, J.A. (2003).** The Biosynthetic Gene Cluster for the β -Lactam Carbapenem Thienamycin in *Streptomyces cattleya* Chemistry & Biology, Volume 10, Issue 4, 301-311, 1 April 2003