

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA  
de *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila*,  
*Variovorax paradoxus* CONTRA EL HONGO  
FITOPATÓGENO *Fusarium* sp."

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO AGROQUÍMICO**

PRESENTA

**DANIEL MENDOZA JIMÉNEZ**

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ  
Codirector

Dr. FRANCISCO JAVIER DELGADO VIRGEN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA de  
*Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila*,  
*Variovorax paradoxus* CONTRA EL HONGO  
FITOPATÓGENO *Fusarium* sp."

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO AGROQUÍMICO**

PRESENTA

DANIEL MENDOZA JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ

Codirector

Dr. FRANCISCO JAVIER DELGADO VIRGEN

**SINODALES**

Dr. JOSÉ ANTONIO CERVANTES CHÁVEZ  
Director

Dr. FRANCISCO JAVIER DELGADO VIRGEN  
Codirector

M. en C. ROCÍO CRYSTABEL LÓPEZ GONZÁLEZ  
Sinodal

Dr. MIGUEL ÁNGEL RAMOS LÓPEZ  
Sinodal

Agradecimientos.

Con especial dedicatoria a mis papás que siempre me han apoyado en todas mis decisiones y han querido lo mejor para mí en todos los aspectos, a mis hermanos que siempre están ahí para ayudarme y apoyarme en especial a mi hermano que durante mi trabajo de tesis siempre estuvo al pendiente de mí y gran parte del tiempo me llevaba y recogía al laboratorio sin importar la pandemia.

Al Dr. Cervantes por la paciencia, conocimiento y esfuerzo que me brindó desde un inicio como alumno de servicio social y por la confianza de dejarme realizar este trabajo de tesis. Así también por seguirme dando la oportunidad de poder llevar este trabajo a otro nivel.

A todos los profesores del área agrícola por su participación en mi formación académica, en especial al Dr. Ramos por su ayuda en la parte estadística del trabajo y a la M en C. Rocío Crystabel por ser parte de mi grupo de trabajo.

A todos los compañeros de LAMIMO por su apoyo y cooperación.

A toda mi generación de Ingeniería Agroquímica 2016-2021 por su apoyo durante toda la carrera, en especial Guadalupe Licea por su amistad y por ser mi equipo durante toda la carrera.

A Laura Cecilia Gutiérrez y Clara Gutiérrez del Langebio, Irapuato por apoyarnos con la secuenciación de los ITS ribosomal 16 S.

Al Dr. Fidel Landeros por brindarme los conocimientos y herramientas necesarias para poder desarrollar los análisis filogenéticos de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	ix
<b>1 ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hongos microscópicos.....	1
1.2 Características morfológicas del género <i>Fusarium</i> sp. ....	1
1.3 Importancia del género <i>Fusarium</i> sp.....	3
1.4 Diversidad entre las especies de <i>Fusarium</i> sp.....	3
1.5 Identificación molecular.....	4
1.6 Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> sp.....	5
1.7 Control tradicional de enfermedades producidas por <i>Fusarium</i> sp en México.....	7
1.8 Control biológico.....	8
1.9 Microorganismos del suelo.....	9
1.9.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR).....	10
1.9.2 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal.....	11
1.9.3 Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal.....	13
1.9.4 <i>Pantoea</i> sp.....	15
1.9.5 <i>Pseudomonas</i> sp.....	15
1.9.6 <i>Variovorax</i> sp.....	16
<b>2 HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>

3	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	General .....	19
3.2	Objetivos Específicos .....	19
4	<b>METODOLOGÍA</b> .....	20
4.1	Crecimiento y conservación de las cepas de <i>Fusarium</i> sp.....	20
4.1.1	Crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> sp, y de bacterias PGPR.....	20
4.1.2	Conservación a -80°C de <i>Fusarium</i> sp.....	22
4.2	Identificación molecular de <i>Fusarium</i> sp. ....	22
4.2.1	Crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. para extracción de DNA genómico.....	22
4.2.2	Molienda con N <sub>2</sub> líquido .....	23
4.2.3	Extracción de DNA .....	23
4.2.4	Amplificación del marcador “Internal Transcribed Spacer” (ITS) por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
4.2.5	Amplificación del marcador “Translation elongation factor 1” ( <i>TEF 1</i> ) por PCR.....	25
4.2.6	Limpieza del producto de PCR.....	25
4.3	Caracterización fisiológica de las bacterias.....	25
4.3.1	Prueba de hemólisis.....	25
4.3.2	Susceptibilidad a los antibióticos.....	26
4.4	Prueba de compatibilidad entre las cepas bacterianas .....	26
4.5	Pruebas de antagonismo contra <i>Fusarium</i> sp. con las bacterias <i>P. mediterranea</i> (745 y 749), <i>P. antophila</i> (751) y <i>V. paradoxus</i> (752c). ....	27
4.6	Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp por efecto de los consorcios bacterianos.....	28
4.7	Ensayo dual entre los consorcios bacterianos y <i>Fusarium</i> sp.....	29

4.8	Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. por efecto de los compuestos volátiles producidos por consorcios bacterianos.....	30
4.9	Obtención de conidios.....	30
4.9.1	Cuantificación de conidios en la cámara de Neubauer. ....	31
4.10	Efecto del sobrenadante de cultivo libre de células de los consorcios bacterianos sobre la producción de biomasa de <i>Fusarium</i> sp.....	31
4.11	Extracción de los metabolitos secundarios secretados al medio por las bacterias y evaluación de su efecto en la germinación de conidios.....	32
4.11.1	Extracción de metabolitos secundarios secretados por los consorcios bacterianos al medio de cultivo.....	32
4.11.2	Evaluación de los efectos de los metabolitos en contra de la germinación de conidios de <i>Fusarium</i> sp.....	34
4.11.3	Tinción de los conidios expuestos a metabolitos secundarios con azul de tripano.....	34
4.12	Efecto de los consorcios bacterianos en la promoción del crecimiento en planta de pimiento ( <i>C. annuum</i> ). ....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
5.1	Identificación molecular de las cepas de <i>Fusarium</i> sp. ....	36
5.2	Análisis fisiológico de las bacterias .....	41
5.2.1	Prueba de hemólisis para las bacterias <i>P. mediterranea</i> , <i>P. antophila</i> , y <i>V. paradoxus</i> .....	42
5.2.2	Sensibilidad a antibióticos .....	43
5.2.3	Caracterización bioquímica de <i>P. mediterranea</i> , <i>P. antophila</i> , <i>V. paradoxus</i> .....	46
5.2.3.1	Solubilización de fosfatos .....	47
5.2.3.2	Producción de sideróforos .....	48
5.2.3.3	Determinación de ácido indol acético.....	49

5.2.3.4 Actividad quitinolítica .....	50
5.3 Prueba de compatibilidad entre las cepas bacterianas .....	51
5.3.1 Prueba de hemólisis para la detección de $\beta$ -hemólisis en el medio de cultivo libre de células proveniente del consorcio bacteriano. ....	52
5.4 Efecto antagónico de las bacterias <i>P. mediterranea</i> (745 y 749), <i>P. antophila</i> (751) y <i>V. paradoxus</i> (752c) contra <i>Fusarium</i> sp. ....	52
5.5 Evaluación de la capacidad antagonista de los consorcios bacterianos.....	58
5.6 Observación de los cambios morfológicos ocasionados a <i>Fusarium</i> sp debido a la actividad antagónica de los consorcios bacterianos, y la cuantificación de la producción de conidios. ....	62
5.7 Ensayo dual entre los consorcios y <i>Fusarium</i> sp.....	65
5.8 Efecto de los compuestos volátiles en la inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp.....	68
5.9 Inhibición de la producción de biomasa en cultivo sumergido de <i>Fusarium</i> sp. efecto de extracto libre de células de los consorcios bacterianos. ....	72
5.10 Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos de los consorcios bacterianos contra <i>Fusarium</i> sp.....	74
5.11 Observación de los conidios tratadas con los metabolitos obtenidos con azul de tripano.....	80
5.12 Efecto de los consorcios bacterianos en la promoción del crecimiento en planta de pimiento ( <i>C. annuum</i> ). ....	81
<b>6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>7 REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Colección de cepas de <i>Fusarium</i> sp. ....	21
Tabla 2. Colección de bacterias.....	22
Tabla 3. Componentes del ensayo de biomasa.....	32
Tabla 4. Diámetro del halo de inhibición en mm .....	44
Tabla 5. Prueba de Kyrby-Bauer.....	45
Tabla 6. Caracterización bioquímica de las bacterias.....	46
Tabla 7. Inhibición de <i>Fusarium</i> sp. por las bacterias.....	57
Tabla 8. Inhibición de <i>Fusarium</i> sp. por los consorcios bacterianos.....	62
Tabla 9. Reducción en la producción de conidios de <i>Fusarium</i> sp.....	63
Tabla 10. Inhibición de <i>Fusarium</i> sp. en un ensayo dual.....	68
Tabla 11. Inhibición de <i>Fusarium</i> sp. por el extracto libre de células.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de reproducción de <i>Fusarium</i> sp.....	2
Figura 2. Colonias representativas del género <i>Fusarium</i> sp.....	3
Figura 3. Mapa del locus EF-1 $\alpha$ .....	5
Figura 4. Sintomatología relacionada a la marchitez en planta de chile.....	7
Figura 5. Atracción, adhesión y colonización bacteriana.....	11
Figura 6. Esquema para el ensayo dual.....	29
Figura 7. Secciones para el ensayo de los compuestos volátiles.....	30
Figura 8. Amplificación del marcador “Internal Transcribed Spacer”.....	38
Figura 9. Amplificación del marcador “Elongation Factor” (TEF-1 $\alpha$ ).....	38
Figura 10. Árbol para la identificación de <i>Fusarium incarnatum</i> (F132).....	39
Figura 11. Árbol para la identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> (Fox B).....	41
Figura 12. Árbol para la identificación de <i>Fusarium equiseti</i> (F70).....	41
Figura 13. Prueba de hemólisis en agar sangre.....	42
Figura 14. Prueba de Kirby-Bauer.....	45
Figura 15. Medio Pikovskaya.....	48
Figura 16. Detección de sideróforos en medio Fe-CAS.....	49
Figura 17. Producción de ácido indol acético.....	50
Figura 18. Detección de $\beta$ -hemólisis en el extracto libre de células.....	52

Figura 19. Inhibición de las bacterias a <i>F. equiseti</i> (F70).....	55
Figura 20. Inhibición de las bacterias a <i>F. incarnatum</i> (F132).....	56
Figura 21. Inhibición de las bacterias a <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	56
Figura 22. Inhibición de las bacterias a <i>F. oxysporum</i> (FC3).....	57
Figura 23. Inhibición de los consorcios a <i>F. equiseti</i> (F70).....	60
Figura 24. Inhibición de los consorcios a <i>F. incarnatum</i> (F132).....	60
Figura 25. Inhibición de los consorcios a <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	61
Figura 26. Inhibición de los consorcios a <i>F. oxysporum</i> (FC3).....	61
Figura 27. Cambios al desarrollo micelial en <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	64
Figura 28. Formación de tumores en <i>F. incarnatum</i> (F132).....	65
Figura 29. Ensanchamiento de conidio.....	65
Figura 30. Difusión de metabolitos en contra <i>F. equiseti</i> (F70).....	66
Figura 31. Difusión de metabolitos en contra <i>F. incarnatum</i> (F132).....	66
Figura 32. Difusión de metabolitos en contra <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	67
Figura 33. Difusión de metabolitos en contra <i>F. oxysporum</i> (FC3).....	67
Figura 34. Efecto de los compuestos volátiles a <i>F. equiseti</i> (F70).....	70
Figura 35. Efecto de los compuestos volátiles a <i>F. incarnatum</i> (F132).....	70
Figura 36. Efecto de los compuestos volátiles a <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	71
Figura 37. Efecto de los compuestos volátiles a <i>F. oxysporum</i> (FC3).....	71
Figura 38. Crecimiento de <i>F. equiseti</i> en cultivo libre de células.....	72

Figura 39. Distribución de los metabolitos secundarios extraídos.....	76
Figura 40. Inhibición de los metabolitos a <i>F. equiseti</i> (F70).....	77
Figura 41. Inhibición de los metabolitos a <i>F. incarnatum</i> (F132).....	78
Figura 42. Inhibición de los metabolitos a <i>F. oxysporum</i> (Fox B).....	79
Figura 43. Inhibición de los metabolitos a <i>F. oxysporum</i> (FC3).....	80
Figura 44. Tinción de conidios con azul de tripano.....	81
Figura 45. Promoción del crecimiento vegetal en <i>C. annuum</i> .....	84
Figura 46. Efecto en la zona radicular de <i>C. annuum</i> .....	84

## RESUMEN

En los últimos años el principal método para el manejo tanto de plagas como enfermedades en los cultivos ha sido el control químico; pero debido al alza de la contaminación ambiental que ha impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, se ha comenzado a sustituir por el control biológico. La búsqueda de alternativas ha dejado abierto un amplio panorama de investigación con respecto al uso de metabolitos secundarios provenientes de las bacterias del suelo, constituyendo hoy en día una alternativa promisoría para contrarrestar el efecto negativo de algunos microorganismos fitopatógenos. Además, estos microorganismos pueden ser utilizados en consorcios para que interactúe de una manera más eficiente con una planta huésped. Hoy en día las investigaciones se han orientado al estudio de aquellas funciones que llevan a cabo los pequeños consorcios microbianos en la promoción del crecimiento vegetal y la salud de las plantas contra diversos agentes fitopatógenos, como lo es *Fusarium* sp., ya que éste tiene una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su ocurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, aire y agua además que es uno de los hongos fitopatógenos que recientemente muestra una alta incidencia en campo y llega a devastar cultivos en interés agronómico. La sintomatología de la enfermedad causada por *Fusarium* sp. en la planta de chile y jitomate ocurren al inicio de la floración, poco después de la formación de los primeros frutos. Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un sólo lado de la planta. En el presente protocolo de investigación se evaluó y demostró la efectividad antagónica de *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila*, *Variovorax paradoxus* alcanzando un 86% en la inhibición del crecimiento, así como de los consorcios que se formaron entre sí se logró obtener una inhibición del 91% del crecimiento.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 Hongos microscópicos.

El reino Fungi está representado por un diverso grupo de organismos que abarca un estimado de 1.5 a 5 millones de especies, entre las que se encuentran los hongos filamentosos y levaduriformes; dentro de éstos tenemos aquellos catalogados como patógenos de plantas o fitopatógenos. Los hongos microscópicos son generalmente organismos heterótrofos, se alimentan de materia orgánica en descomposición (saprobios) o de materia viva (parásitos), éstos se han adaptado a diversos nichos ecológicos que les han permitido prosperar en casi todos los hábitats del planeta (del Carmen Orozco, 2015). En México, la diversidad fúngica se calcula entre las 120,000 y 140,000 especies, de las que menos de 10% han sido estudiadas. Actualmente se han descrito aproximadamente 4,000 especies de hongos macroscópicos y 2,000 de hongos microscópicos. Lo anterior demuestra que el estudio de este grupo de organismos en nuestro país está en su fase inicial, y coloca en una situación crítica el conocimiento sobre las especies microscópicas (Gamboa, 2008). Dentro del grupo de hongos microscópicos, podemos encontrar al género *Fusarium* sp., considerado el más importante de los hongos micotoxigénicos, el cual, ha tenido una historia taxonómica confusa e inestable. Entre los factores que han contribuido, están la falta de caracteres morfológicos claros que separen a las especies, lo que ha dado lugar a conceptos de especies demasiado amplios (Geiser, 2004).

### 1.2 Características morfológicas del género *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* sp. comprende un gran grupo de hongos fitopatógenos, los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Parra Rivero, 2020). Las especies de *Fusarium* sp. tienen varias características morfológicas que ayudan a su identificación y una de las características más destacadas es el desarrollo de conidios macro y micro de diferentes formas y tamaños, que son esporas que se originan por reproducción asexual (Fig. 1). Otras estructuras que forman son las llamadas clamidosporas que aseguran la supervivencia del patógeno en el suelo y en la planta durante muchos años, lo que hace que la gestión y el control de las

enfermedades causadas por las especies de *Fusarium* sp. sean muy difíciles de atender. También se identifican con base a la tasa de crecimiento en medios de cultivo y las pigmentaciones que producen (Hami et al., 2021).

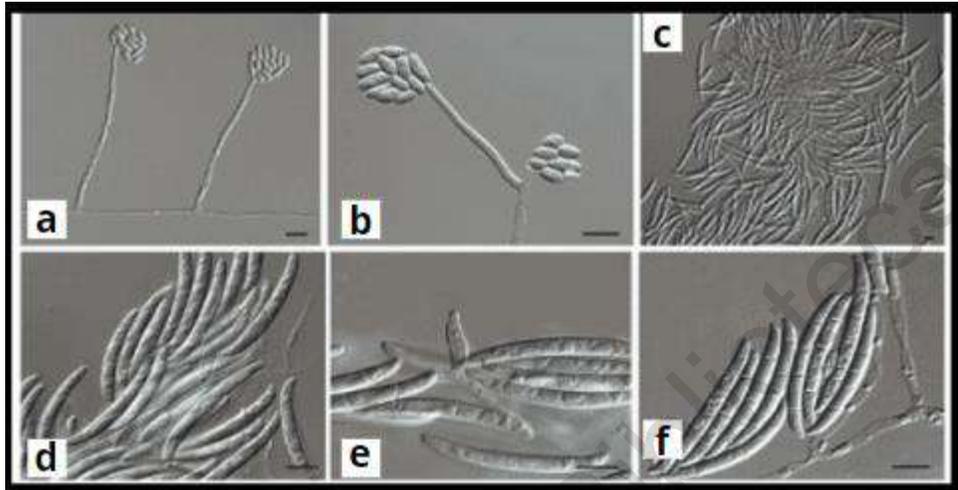


Figura 1. Monofiálides con cabeza falsa y microconidios (A-B); (A-B) Conidios formados en conidióforos aéreos cortos que surgen de las hifas; (C-F) Macroconidios abundantes. Barra de escala = 10  $\mu$ m (Šišić et al., 2018).

Actualmente las características taxonómicas primarias de identificación de *Fusarium* sp. son: la morfología, la pigmentación de la colonia y la ausencia o presencia de esporodoquio, en medios de cultivo habituales las colonias presentan un crecimiento rápido, que suele ocupar toda la placa en una semana. El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia son datos importantes para su identificación taxonómica (Hami et al., 2021). (Fig. 2)

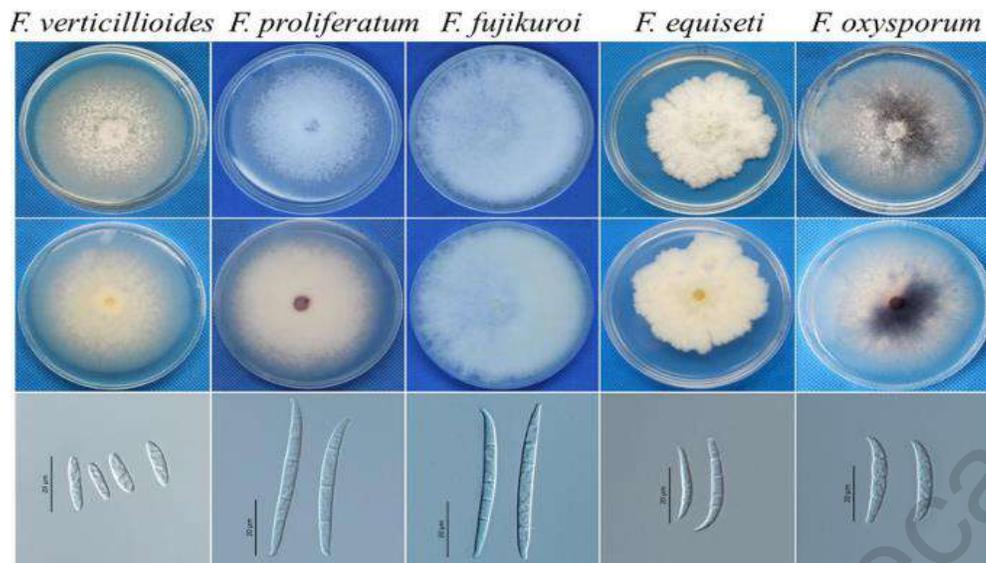


Figura 2. Colonias representativas del género *Fusarium* sp. crecidas en PDA y características de la morfología conidial (Wang et al., 2021).

### 1.3 Importancia del género *Fusarium* sp.

Hoy en día hay especies modelo las cuales son objeto de estudio debido a 2 factores: a) por ser caracterizado como fitopatógeno y b) por ser productores de metabolitos secundarios como el ácido giberélico (AG). El ácido giberélico es un fitorregulador de crecimiento hormonal que estimula y regula el desarrollo de las plantas el cual consiste en acelerar el crecimiento vegetativo, principalmente a la elongación de las células, aunque en algunos casos, la multiplicación celular también se ve incrementada.

### 1.4 Diversidad entre las especies de *Fusarium* sp.

Los agentes fitopatógenos pertenecientes al género *Fusarium* sp. tienen ciclos de vida diversos, especialización en un nicho, adaptación al huésped y especificidad. Por ejemplo, *F. graminearum* y *F. verticillioides* son patógenos de un estrecho rango de hospederos que infectan predominantemente los cereales, mientras que *F. oxysporum* tiene un amplio rango de hospederos e infecta tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas; *Fusarium equiseti* se considera un patógeno débil en los cereales y se encuentra ocasionalmente asociado a los granos infectados por el tizón de la cabeza de *Fusarium*. *F. equiseti* es un patógeno para una variedad específica de cultivos y recientemente se ha informado que es un organismo causante de la marchitez en chile habanero (*Capsicum chinense*) en México (Hami et al., 2021). Las especies de *Fusarium* sp. varían en cuanto a la estrategia de

reproducción; *F. oxysporum* se reproduce de forma asexual, otras son tanto asexuales como sexuales con autofecundación (homotalismo) o con cruce obligado (heterotalismo). Las especies de *Fusarium* sp producen esporas meióticas (sexuales) y al menos tres tipos de esporas mitóticas (asexuales). Sin embargo, no todas las especies producen todo tipo de esporas: Además, menos del 20% de las especies de *Fusarium* sp se reproducen sexualmente (Satyanarayana, 2017) .

### 1.5 Identificación molecular.

La identificación de las especies se realiza a través de análisis macro y microscópicos, pero la forma más fiable de identificación es a través de la información obtenida mediante la secuenciación de nucleótidos de las regiones genéticas conservadas que incluyen el espaciador transcrito interno (ITS), y el Factor de elongación de la traducción 1-alfa (EF-1 $\alpha$ ). La información de la secuencia utilizando las regiones ITS se ha utilizado enormemente en la filogenia y la taxonomía de las especies de *Fusarium* sp, ya que se sabe que las regiones ITS ayudan con éxito a la identificación entre las especies. El ITS se diferencia en dos regiones ITS1 e ITS2 (genes 18S-5,8S y 5.8S-28S respectivamente). Actualmente hay más de 172.000 secuencias de ITS presentes en el Genbank (Hami et al., 2021).

Hoy en día, el marcador "Translation elongation factor 1-alpha" EF-1 $\alpha$  es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos por las siguientes razones: 1) La presencia de una única copia en el genoma de *Fusarium* sp, 2) la ausencia de copias ortólogas, 3) su riqueza de regiones intrónicas y alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y 4) la posibilidad de generar cebadores universales; que permiten realizar estudios a través de los límites filogenéticos del género (Silva, 2014). (Fig. 3)

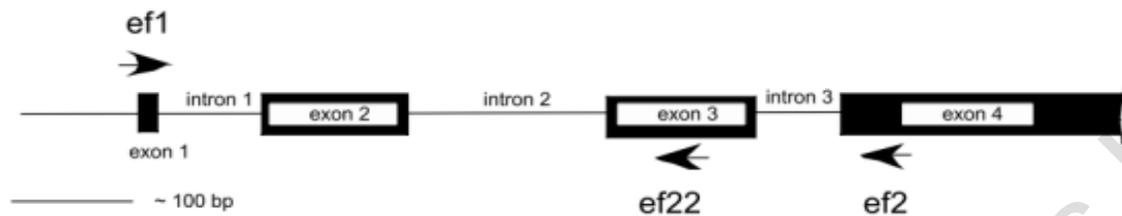


Figura 3. Mapa del locus EF-1 $\alpha$ , con la localización de los cebadores. Tomado y adaptado de Geiser y colaboradores (2004).

A pesar de la complejidad que posee *Fusarium* sp., se han descrito métodos moleculares que pueden detectar específicamente las formaciones especiales de *F. oxysporum* (Silva, 2014). De igual manera se desarrollaron cebadores específicos para cepas de *F. oxysporum* basándose en la secuencia de un fragmento distinto revelado por el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

#### 1.6 Enfermedades causadas por *Fusarium* sp.

Se ha establecido que la especie *F. oxysporum* ataca principalmente a las plantas causando podredumbre de la raíz, del tallo y de la espiga, con una severa reducción del rendimiento económico de los cultivos, que a menudo se estima entre el 10 y el 30% (Rose, 2008), mientras que *F. fujikuroi* es importante debido a su amplio espectro de metabolitos secundarios como lo son principalmente las giberelinas (Parra Rivero, 2020). Actualmente, se utiliza en gran parte del mundo para la producción comercial de ácido giberélico (Wiemann, 2013).

Por otro lado, *F. oxysporum* tiene un amplio espectro de huéspedes y es considerado uno de los patógenos más devastadores que se transmiten por el suelo, causando síntomas como la podredumbre de las raíces y la marchitez vascular en las plantas de cultivo, de igual manera puede sobrevivir como saprófito en el suelo y en los restos de plantas en ausencia de un huésped y permanecer viable durante mucho tiempo dificultando su control (Nishioka, 2019). *F. oxysporum* es la única especie de este género que crece realmente dentro del sistema vascular de la planta

hospedante y se propaga en sentido ascendente por dentro de la misma, las otras especies se propagan hacia arriba por fuera de la planta.

Por otro lado, *F. solani* es de gran importancia agrícola debido a que se ha reportado como uno de los principales agentes causales de marchitez en Chile y en México. La reevaluación de la taxonomía de las especies basada en análisis filogenéticos moleculares ha revelado que *F. solani* es un complejo de especies que incluye al menos 60 especies filogenéticas distintas; las cuales están distribuidas por todo el mundo y son de una plasticidad ecológica considerable, lo que causa infecciones tanto en las plantas como en los seres humanos (Šišić, 2018).

Las especies de *Fusarium* sp. son causantes de marchitez vascular (Fig. 4) la cual es una enfermedad que presenta diversos síntomas tales como, el amarillamiento y marchitez de las hojas, normalmente localizados en cierta área y posteriormente en la planta completa. Otros síntomas son la decoloración marrón de los tejidos del xilema que se observan cuando se cortan los tallos, siguiendo un patrón similar de infección; penetran por la raíz de forma asintomática; posteriormente, coloniza tejido vascular y desencadena un marchitamiento masivo, necrosis la cual consiste en la muerte de todos los tejidos de una planta y clorosis que es el amarillamiento del tejido foliar causado por la falta de clorofila en las partes aéreas de la planta. Mientras, que *F. graminearum*, la principal causa de fusariosis de la espiga de cereales en todo el mundo, produce una necrosis limitada (Villa-Martínez, 2015).



Figura 4. Sintomatología relacionada a la marchitez en planta de chile causada por *F. oxysporum*. A) Planta de chile inoculada con  $2 \times 10^6$  conidios. B) Medición del tamaño del daño ocasionado por *F. oxysporum* (15 cm). C) Daño en el sistema vascular. D) Pudrición de la raíz. Foto: Daniel Mendoza.

#### 1.7 Control tradicional de enfermedades producidas por *Fusarium* sp. en México

En el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium* sp. y otros hongos se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato (Agris, 2017) Sin embargo, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos para las plantas, así como que pudieran incrementar el grado de resistencia de los patógenos ante su efecto (Agris, 2017). Por todas las implicaciones negativas acerca del uso inadecuado de productos agroquímicos, sus efectos secundarios indeseables, tanto en el costo de estos y de la resistencia de patógenos, como en el desgaste ambiental y peligro a la salud pública, se vuelve cada vez más necesario desarrollar nuevos sistemas para reducir el uso de los agroquímicos (Villa-Martínez, 2015).

En México, fue hasta a mediados de los años 80s cuando se establece la legislación sobre el control del uso de plaguicidas y de sustancias tóxicas. Sin embargo, dichas leyes sólo se han impuesto con base en aspectos sanitarios, dejando por un lado las consecuencias ambientales (Garc, 2018).

Muchos de los plaguicidas que se usan en la agricultura se aplican por aspersión de polvos o mezclas acuosas al follaje de las plantas y/o malezas que crecen junto a los cultivos. En México, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se usaron en promedio 5.55 toneladas (t) de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) por cada 1000 hectáreas entre el año 2015-2017. Los compuestos mayormente usados son organofosforados que llegando a aplicarse 211 t en 72 500 ha en una temporada. En México se estima que en 2017 se comercializaron 100 000 t de estos compuestos, equivalentes al 4% del consumo mundial (FAO 2018). Sin embargo, no se cuenta con información detallada sobre el grupo o los ingredientes activos más utilizados, mucho menos sobre el uso por Estado de la República o por cultivo.

En México los Estados con mayor actividad agrícola son: Michoacán 14%, Jalisco con 10%, Sinaloa que aporta el 8%, Veracruz con 7%, Chihuahua con 7% y Sonora también con 7%; SAGARPA 2019. Las pérdidas económicas debido a enfermedades causadas por hongos fitopatógenos alcanzaron hasta un 40% de la producción agrícola total. Entre las enfermedades de mayor importancia económica se encuentra las causadas por el género *Fusarium sp.* siendo la mayor amenaza con un 12% en pérdidas, ya que es un microorganismo con una gran diversidad de especies, formas especiales y razas, asociadas con enfermedades de plantas. (Sixto Velarde Félix 2019). En el Estado de Querétaro, durante el ciclo primavera-verano del 2020 se sembraron 146,162 ha de las cuales el 69.17% fue con maíz para grano, 4.25% con frijol, 2.3% con sorgo para grano; el resto fue para frutales, hortalizas. Para el ciclo de otoño-invierno se sembraron 12 mil 630 ha, el 39% corresponden a avena forrajera, seguido de la cebada para grano con un 35 %. (INFOSIAP, 2020).

#### 1.8 Control biológico.

Actualmente el uso de agentes naturales como microorganismos o metabolitos producidos por los mismos son una alternativa para combatir enfermedades, estos surgen como una opción ambientalmente sostenible. Sin embargo, la manera clásica en la que se utiliza un solo agente de control biológico (BCA) ha demostrado una gran variabilidad, puesto que los agentes biológicos son organismos vivos y pueden

no ser activos en todos los agroecosistemas. Recientemente, algunos estudios se han centrado en el uso de combinaciones de BCA para aumentar la eficacia contra los fitopatógenos, es decir consorcios microbianos, en los cuales se encuentran más de un microorganismo, con la finalidad de aumentar el efecto contra el fitopatógeno (Izquierdo-García, 2020). En una combinación de dos BCA, la actividad antagonista puede aumentar, reducirse o ser similar en comparación con la actividad individual. Varios estudios han evaluado la eficacia de los microorganismos en consorcio, pero pocos se han enfocado en cómo los microorganismos interactúan entre sí y no se han identificado los mecanismos por los que el consorcio tiene una mayor actividad de biocontrol que los componentes individuales (Izquierdo-García, 2020; Sarma, 2015). Los microorganismos más frecuentemente utilizados en estos estudios son los hongos *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., y las bacterias *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. Se han evaluado las combinaciones entre hongos-hongos, hongos-bacterias y bacterias-bacterias (Sarma, 2015). Estos consorcios han contribuido a la reducción de las enfermedades causadas por *F. solani* y *Rhizoctonia solani*, mediante el uso de *B. subtilis* y *Rhizobium tropici* en el frijol. En plantas de guisante, se ha demostrado la disminución de la mortalidad de las plantas debido a *S. sclerotiorum*, mediante un consorcio de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp.; por otro lado, la combinación de *B. subtilis* y *P. fluorescentes* ha disminuido el daño provocado por *F. solani* en el pimiento (Sundaramoorthy et al., 2012). Finalmente, la combinación de *T. harzianum* y *Pseudomonas* sp. ha ayudado al control de *F. oxysporum* en el pepino (Izquierdo-García, 2020).

#### 1.9 Microorganismos del suelo.

Tanto los factores bióticos como abióticos influyen en la estructura y la función de las comunidades bacterianas de las plantas, por ejemplo, el cambio climático, el tratamiento con plaguicidas, el tipo de suelo, el estado nutricional de las plantas y la etapa de desarrollo. Además, la composición de los exudados de las raíces varía entre las plantas y afecta a la abundancia de microorganismos cerca de la raíz. No sólo las plantas proporcionan nutrientes a los microorganismos, sino que algunas especies de plantas también contienen metabolitos antimicrobianos que son

exclusivos de sus exudados. Por lo tanto, los compuestos que segregan las raíces actúan como una señal, atrayendo o repeliendo a los microorganismos a las plantas y regulando así la interacción entre las raíces y los microorganismos del suelo (Jiang, 2019).

#### 1.9.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR)

Las PGPR son bacterias que habitan la rizósfera, esta es la región del suelo influenciada por los exudados de la raíz, incluye el área del suelo unida a la raíz que se extiende a pocos milímetros de la superficie del sistema radicular, ésta se caracteriza por albergar una gran variedad de microorganismos en comparación con el resto del suelo (Molina-Romero et al., 2015). Los exudados incluyen: aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas (Fig. 5). Las rizobacterias compiten por estos metabolitos y por el sitio que ocupan sobre la raíz de la planta; siendo las uniones entre las células epidérmicas y el área donde emerge la raíz los sitios más poblados (Cesa-Luna et al., 2020).

Las PGPR colonizan competitivamente las raíces y estimulan su crecimiento y/o reducen la incidencia de las enfermedades. El concepto de PGPR ha sido reivindicado por el aislamiento de muchas cepas bacterianas que cumplen por lo menos dos de los tres criterios (colonización agresiva, estimulación del crecimiento de las plantas y biocontrol), como ejemplos podemos mencionar a los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. los cuales son antagonistas de patógenos de raíz (Haas & Défago, 2005). Los mecanismos fisiológicos que intervienen en este proceso incluyen la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas (auxina y citoquinina) y estimulantes del crecimiento volátiles (etileno) (Molina-Romero et al., 2015). (Fig. 5)

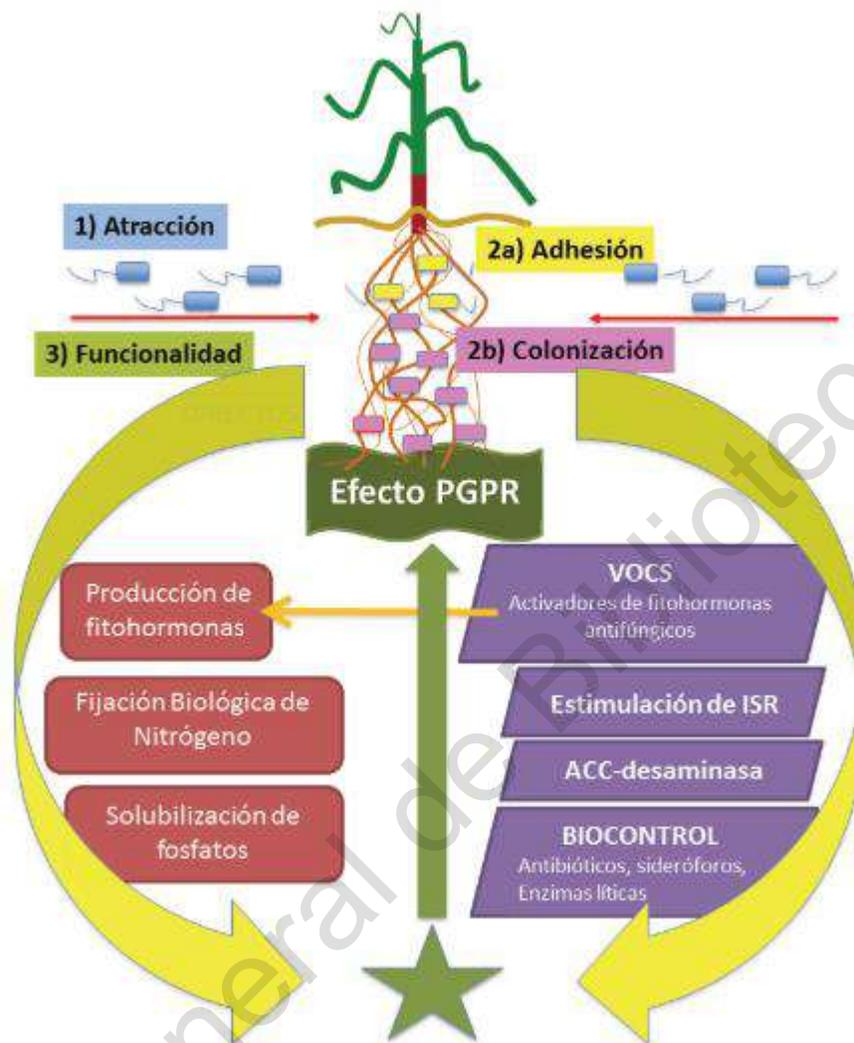


Figura 5. Atracción, adhesión y colonización bacteriana como determinantes para ejercer (Molina-Romero et al., 2015).

### 1.9.2 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal

Los mecanismos por los cuales estas bacterias tienen la capacidad de estimular el crecimiento de plantas incluyen la producción de fitohormonas, compuestos volátiles, compuestos antimicrobianos (producción de enzimas líticas, sideróforos), fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros.

## Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Este proceso biológico se lleva a cabo mediante interacciones simbióticas o no simbióticas entre PGPR y plantas. Las PGPR simbióticas, de las que se ha informado con mayor frecuencia que fijan  $N_2$  atmosférico en el suelo, incluyen cepas de *Rhizobium* sp., *Azoarcus* sp., *Beijerinckia* sp., *Pantoea agglomerans* y *K. pneumoniae* (Gouda et al., 2018). La combinación de especies de rizobacterias en el suelo mejora su calidad y potencia la formación de nódulos. La fijación de  $N_2$  se lleva a cabo por un gen particular llamado *nif*, que junto con otros genes estructurales está involucrado en la activación de la proteína de hierro, la donación de electrones, la biosíntesis del cofactor de hierro y molibdeno, y muchos otros genes reguladores obligatorios para la síntesis y la actividad de la enzima (Shang et al., 2021). La inoculación de PGPR fijadoras de  $N_2$  en campos de cultivo revitaliza la actividad promotora del crecimiento, el manejo de enfermedades y mantiene el nivel de nitrógeno en el suelo agrícola (Gouda et al., 2018).

## Biosolubilización de fosfatos

El fósforo desempeña un papel importante en casi todos los procesos metabólicos principales, como la transferencia de energía, la respiración, la biosíntesis macromolecular y la fotosíntesis (Gouda et al., 2018). Sin embargo, el 95-99% del fósforo presente se encuentra en formas insolubles, inmovilizadas o precipitadas; por lo tanto, es difícil que las plantas lo absorban. Las plantas absorben el fosfato sólo como monobásico ( $H_2PO_4^-$ ) y dibásico ( $HPO_4^{2-}$ ) (Jun & Pu, 2020). Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) son un grupo de microorganismos capaces de solubilizar el fosfato insoluble, fijar el nitrógeno y secretar auxina, promoviendo así el crecimiento de las plantas (Jun & Pu, 2020). Se ha demostrado que las semillas o el suelo inoculados con bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) mejoran la solubilización del fósforo fijado en el suelo y de los fosfatos aplicados, lo que se traduce en un mayor rendimiento de las plantas (Chen et al., 2021).

## Producción de fitohormonas

Las fitohormonas o reguladores del crecimiento de las plantas son sustancias orgánicas, que a bajas concentraciones (< 1 mM), promueven, inhiben o modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gouda et al., 2018), estas fitohormonas son producidas por ciertos microbios, como las PGPR, en las plantas. Las PGPR producen más de un tipo de fitohormonas como por ejemplo: las auxinas, citocininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico (ABA) (Molina-Romero et al., 2015). Estas moléculas exhiben diferentes efectos específicos sobre la fisiología vegetal, como el incremento radicular, aumento de la tasa de respiración de la raíz de la planta hospedera y el flujo de protones en la membrana de la raíz; en consecuencia, se aumenta la absorción de nutrientes y minerales solubles (Fibach-Paldi et al., 2012).

### 1.9.3 Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal

Es por medio de la producción de algunos metabolitos secundarios que son excretados localmente o cerca de la superficie de la planta; estas moléculas no se necesitan en cantidades elevadas, a diferencia de los agroquímicos que son resistentes a la degradación por microorganismos y se aplican en grandes cantidades a los cultivos agrícolas para mantener la salud de las plantas. Los compuestos mayormente estudiados son: el ácido cianhídrico (compuesto volátil), el ácido fenazina-1-carboxílico, la pioluteorina, la pirrolnitrina, los lipopéptidos cíclicos y el diacetilfloroglucinol (DAPG), este antibiótico causa daño a la membrana celular de patógenos como *F. oxysporum* y *Phyitium* sp (Molina-Romero et al., 2015).

Los mecanismos mayormente usados y reportados son los siguientes:

#### Sideróforos

Son compuestos de bajo peso molecular, de alta afinidad y quelantes del hierro, producidos por microorganismos en condiciones de hierro limitado y que funcionan en la solubilización, el transporte y el almacenamiento del hierro. La producción de sideróforos puede actuar como un mecanismo antagonista al eliminar el hierro limitado del entorno del suelo, reduciendo así la cantidad de hierro disponible para otros organismos. Los sideróforos bien estudiados son las pioverdinas de

*Pseudomonas*, la bacilobactina de *Bacillus*, la desferrioxamina de *Streptomyces* y la ornibactina de *Burkholderia* (Tyc et al., 2016).

#### Metabolitos antifúngicos

La mayoría de las PGPR producen: fenazinas, pyrrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pyoluteorina, visconinamida y tensinas; además de enzimas como peroxidasas, polifenol oxidasa y la fenilalanina amonio-liasa estos compuestos actúan en la defensa contra los fitopatógenos fúngicos. Los géneros con capacidad de biocontrol contra hongos fitopatógenos que se han identificado son: *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Streptomyces* sp.; estas rizobacterias tienen la capacidad de suprimir patógenos (Molina-Romero et al., 2015).

#### Compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Son moléculas volátiles de bajo peso molecular (menor o igual a 300 g/mol); dentro de este grupo se han encontrado aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, índoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmonatos. Aunque algunos VOCs actúan de forma directa como fitohormonas, la mayoría estimula de forma indirecta a la promoción del crecimiento vegetal (Naz et al., 2021).

*B. subtilis* produce VOCs que pueden activar las vías de producción de fitohormonas como: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido salicílico y brasinosteroides, promoviendo el desarrollo mediante la acumulación de auxinas en los sitios primordiales de la raíz; además de modificar la pared celular que permite el alargamiento de las células radiculares (Molina-Romero et al., 2015). Los VOCs producidos por las rizobacterias pueden actuar como moléculas señal que median la interacción microorganismo-planta; cuando son producidos en suficiente concentración aumentan la respuesta inmunitaria, estimulando específicamente la resistencia sistémica inducida (ISR); regulan el crecimiento, morfogénesis de la planta, antibiosis y biocontrol de fitopatógenos (Tyc et al., 2016).

#### 1.9.4 *Pantoea* sp.

El género *Pantoea* sp. fue descrito por primera vez por Gavini et al, en el año 1989. En la actualidad, este género comprende 22 especies. Las especies de este género son Gram negativas, anaerobias facultativas, no forman esporas y comúnmente se mueven por medio de flagelos. Los miembros del género *Pantoea* se han aislados de diversos lugares tales como el suelo, el agua, los alimentos, las plantas, los seres humanos y otros animales. Se sabe que algunas especies de *Pantoea* sp. interactúan con las plantas y pueden conferir efectos beneficiosos o perjudiciales a sus huéspedes. Por ejemplo, la *P. agglomerans* fue identificada inicialmente como causante de enfermedades en una amplia gama de huéspedes, como la cebolla, la remolacha, el guisante de playa, el algodón, el arroz y el maíz, pero muchas cepas pertenecientes a esta especie también se presentan como epífitas o endófitos de plantas y exhiben efectos de promoción del crecimiento vegetal (PGP) o de biocontrol (Chen, 2017). Se ha descubierto que algunas de las bacterias de este género producen compuestos antimicrobianos convirtiéndose en productos comerciales de biocontrol para ayudar a controlar el fuego bacteriano en los manzanos y perales, mientras que otros tienen un potencial de biorremediación, con la capacidad de degradar herbicidas sin generar productos tóxicos (Jiang, 2019; Johnson, 2000).

#### 1.9.5 *Pseudomonas* sp.

Los miembros del género *Pseudomonas* sp. son bacterias Gram negativas en forma de varilla que se caracterizan por su versatilidad metabólica, la respiración aeróbica (algunas cepas también tienen respiración anaeróbica con el nitrato como aceptador terminal de electrones y/o la fermentación con arginina), la motilidad debido a uno o varios flagelos polares (Haas & Défago, 2005) (Compant et al., 2019).

Actúan de una doble forma sobre el cultivo: 1) promueven el crecimiento vegetal, 2) suprimen a los microorganismos patógenos. Se ha sugerido que estimulan el establecimiento de otros microorganismos beneficiosos asociados a las raíces como las micorrizas. Llegan a producir un incremento de la disponibilidad de fósforo y nitrógeno en forma asimilable para la planta debido a la producción de

fitohormonas estimuladoras de la actividad vegetativa, así como la degradación de precursores del etileno (Liu et al., 2020). La supresión de enfermedades parece estar relacionadas con la secreción de metabolitos secundarios, la competencia por el hierro, la mayor facilidad para colonizar la rizosfera, la inactivación de la germinación de las esporas de algunas especies de hongos, la inactivación de toxinas, la inducción de los mecanismos propios de defensa que poseen los vegetales a través de exudados radiculares inmuno protectores y la producción de enzimas extracelulares (quitinasa, glucanasa, laminarinasa, etc) capaces de digerir las paredes celulares de los hongos patógenos (Sarma et al., 2015, Bubici et al., 2019).

#### 1.9.6 *Variovorax* sp.

El género *Variovorax* se propuso inicialmente junto con la reclasificación de *Alcaligenes paradoxus* como *Variovorax paradoxus* (Gao et al., 2020). Los análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen 16S rRNA mostraron que el género *Variovorax* pertenece a la familia Comamonadaceae de la clase Betaproteobacteria.

Hasta la fecha se han descrito nueve cepas válidas del tipo *Variovorax*, estas bacterias son Gram negativas y aerobias, suelen almacenar poli (ácido 3-hidroxibutírico) como fuente de carbono intracelular para los periodos en los que las fuentes de carbono extracelular están escasamente disponibles (Gao et al., 2020). Las células son móviles mediante flagelos y se presentan como células individuales o en pares. Las dimensiones de las varillas rectas o ligeramente curvadas son de 0,3-0,6 × 0,7-3,0 µm. Las colonias son amarillas debido a los carotenoides, y suelen ser viscosas y brillantes (Satola & Wübbeler, 2013). Algunos estudios han determinado las funciones de los miembros de este género en la biotransformación y la biodegradación en la naturaleza. *V. paradoxus* produce 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC) que favorece el crecimiento de las plantas (Nguyen et al., 2018). La ACC deaminasa escinde el ACC, el precursor inmediato de la hormona vegetal etileno, para producir alfa-cetobutirato y amoníaco (Satola & Wübbeler, 2013). El etileno sirve como una importante molécula de señalización en las plantas bajo estrés biótico y abiótico y resulta en la inhibición del crecimiento de la planta.

También se ha informado que *Variovorax boronicumulans* produce sideróforos lipopéptidos que podrían ser útiles para cultivar bacterias "no-cultivables". La función principal de los sideróforos es quelar el Fe, pero también forman complejos con otros elementos esenciales (por ejemplo, Mo, Mn, Co y Ni) en el medio ambiente y los ponen a disposición de las células microbianas (Satola & Wübbeler, 2013). Algo importante es que el análisis del genoma completo de *V. paradoxus* reveló que esta bacteria posee muchas características asociadas a la degradación de diversos compuestos, incluidos los productos químicos tóxicos (Nguyen et al., 2018).

## 2 HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios producidos por las bacterias *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus* son capaces de antagonizar el crecimiento de cepas del género *Fusarium* sp y a su vez promover el crecimiento vegetal en pimiento (*Capsicum annuum*).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 General

Evaluar la capacidad antagónica de las bacterias *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila*, *Variovorax paradoxus* contra cepas del género de *Fusarium* sp.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a nivel molecular las cepas de *Fusarium* sp. seleccionadas para el estudio.
- Determinar el efecto antagónico de las bacterias *P. mediterranea*, *P. antophila*, *V. paradoxus* contra las cepas de *Fusarium* sp.
- Establecer consorcios bacterianos y determinar su efectividad antagónica en contra de *Fusarium* sp.
- Estudiar la capacidad para promover el crecimiento por parte de los consorcios bacterianos en la planta de chile pimiento (*C. annuum*)

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Crecimiento y conservación de las cepas de *Fusarium* sp

#### 4.1.1 Crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp, y de bacterias PGPR

El trabajo partió de la colección de 24 cepas de *Fusarium* sp. obtenidas en el Estado de Colima por el Dr. Francisco Javier Delgado Virgen, del Instituto Tecnológico de Colima, una cepa de *Fusarium oxysporum* (FC3) donada por el Dr. Santiago Vergara de la Facultad de Ciencias Naturales, y una cepa de *Fusarium oxysporum* (Fox B) donada por la Dra. Blanca Estela Gómez Luna, de la Universidad de Guanajuato, (Tabla 1). El crecimiento de cada una de las cepas fue realizado en medio de cultivo PDA por sus siglas en inglés (Potato Dextrose Agar), para cada cepa se cortó un disco de ~1 cm<sup>2</sup> de micelio y se inoculó al centro de una placa Petri (90 x15) con medio PDA de tal forma que el micelio estuviera en contacto directo con la superficie del medio, se incubó a 28 °C por 7 días. En el caso de las bacterias PGPR, éstas se crecieron en una placa de Agar nutritivo a 28 °C por 24 h. Las bacterias utilizadas forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (Tabla 2), FCN-UAQ. Estas cepas se conservaron a -80 °C, para su uso, se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 28 °C por 24 h. Los cultivos líquidos, se prepararon en caldo nutritivo, se incubaron a 28 °C por 24 h en agitación constante a 150 rpm.

Tabla 1. Colección de cepas de *Fusarium* sp.

NOMBRE	TOMA DE MUESTRA	ZONA DE ORIGEN	NOMBRE	TOMA DE MUESTRA	ZONA DE ORIGEN
F10	Aire	Rancho de Villa, Colima	F90	Aire	Camotlán, Manzanillo
F27	Raíces de aguacate	Quesería, Cuauhtémoc	F91	Aire	Camotlán, Manzanillo
F36	Raíces de melón	El Calavero, Colima	F92	Aire	Camotlán, Manzanillo
F40	Aire	Cerro de Ortega, Tecomán	F100	Aire	Camotlán, Manzanillo
F63	Mazorca (maíz)	Lagunillas, Villa de Álvarez	F104	Aire	Lagunillas, Villa de Álvarez
F68	Aire	Canoas, Manzanillo	F113	Aire	Cuyutlán, Armería
F71	Suelo	Cofradía de Suchitlán, Comala	F119	Aire	Camotlán, Manzanillo
F72	Aire	Alcuzahue, Tecomán	F132	Aire	Camotlán, Manzanillo
F75	Aire	Camotlán, Manzanillo	F134	Aire	Playa de Oro, Manzanillo
F77	Aire	Camotlán, Manzanillo	F155	Suelo	Camotlán, Manzanillo
F78	Aire	Cuyutlán, Armería	F70	Suelo	Cofradía de Suchitlán, Comala

F79	Aire	Cuyutlán, Armería	Fox B	Chile	Guanajuato
F80	Aire	Cuyutlán, Armería	FC3	Cactus	Querétaro

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

CÓDIGO EN EL CEPARIO	NOMBRE CIENTIFICO
745	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
749	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
751	<i>Pantoea antophila</i>
752c	<i>Variovorax paradoxus</i>

#### 4.1.2 Conservación a -80 °C de *Fusarium* sp.

Se colocó un disco de celofán estéril de 90 mm de diámetro encima de una placa (90x15) de PDA, enseguida se inoculó de ~1 cm<sup>2</sup> de micelio obtenido de un cultivo en medio PDA que contiene estructuras del hongo en cuestión, de cada una de las cepas de *Fusarium* sp., de tal forma que el micelio estuviera en contacto directo con el disco de celofán. Se incubó a 28 °C por 7 días. Una vez que el hongo cubrió toda la caja de micelio, se retiró cuidadosamente el celofán que contenía al hongo, se depositó en una caja Petri estéril, y se secó en estufa a una temperatura de 28 °C por 4 días. Finalmente, una vez seco se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, se colocaron en tubos de plástico de 1.5 mL estériles, y se almacenaron en el ultracongelador Thermo SCIENTIFIC a -80 °C.

#### 4.2 Identificación molecular de *Fusarium* sp.

##### 4.2.1 Crecimiento de *Fusarium* sp. para extracción de DNA genómico

Se creció el hongo como se indicó en el punto 4.1.2. Una vez que cubrió toda la caja se retiró cuidadosamente el celofán que contenía al hongo, se depositó en un

tubo plástico de 50 mL estéril, y se almacenó en el ultracongelador Thermo SCIENTIFIC a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2 Molienda con $\text{N}_2$ líquido

Se utilizó mortero y pistilo estéril, congelados con nitrógeno líquido, la muestra se molió hasta tener un polvo fino, evitando siempre que la muestra se descongelara, para ello se adicionó nitrógeno líquido cuando fue necesario. El micelio molido se recuperó con una espátula metálica estéril en 2 tubos de plástico de 1.5 mL. A cada uno se le colocó 500 mg del micelio pulverizado. Y se almacenaron en el ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.3 Extracción de DNA

Se siguió el protocolo de Winston., 1987. A un tubo con la muestra se le adicionó un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de TSNT (Tritonx100-SDS-NaCl-Tris-EDTA 1M), se añadieron perlas de vidrio estériles (aproximadamente un volumen de 200  $\mu\text{L}$ ). Enseguida se adicionó un volumen de 300  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó en vortex por 3-4 min, posteriormente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Tris-EDTA 1M) y se mezcló por inversión con la mano. Se centrifugó en la microcentrífuga modelo Thermo SCIENTIFIC a 13k rpm por 8 min, se recuperó la fase acuosa y se añadió 1 mL de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) frío al 100%, se mezcló por inversión el tubo y se incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 13k rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se suspendió en 400  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular ( $\text{H}_2\text{O}$  GBM) RNasal (5  $\mu\text{L}$  de RNasal a 10 mg/mL) y se incubó por 20 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Enseguida se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de una solución de acetato de amonio ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ) 4 M, 1 mL de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) al 100% y se mezcló por inversión, se incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Se centrifugó a 12k rpm por 8 min y se descartó nuevamente el sobrenadante. Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) al 70%, y se golpeó el tubo para liberar la pastilla formada, se centrifugó a 13k rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.

El tubo se colocó invertido sobre una sanita para permitir que la pastilla de DNA se seque (10 min aproximadamente). Finalmente se adicionó (H<sub>2</sub>O GBM) aproximadamente 80 µL.

Una vez solubilizado el DNA se cuantificó en el Nanodrop 2000 spectrophotometer con 2 µL para determinar su concentración y pureza. Se preparó una solución de DNA a 25 ng/µL. Se realizó una electroforesis con 5 µL de muestra de DNA en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (100 µg BrEt) (*Molecular Cloning*, 2012).

#### 4.2.4 Amplificación del marcador “Internal Transcribed Spacer” (ITS) por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las condiciones para la reacción de PCR fueron las indicadas en la casa comercial DreamTaq (ThermoFisher) (Geiser, 2004), se utilizaron los cebadores reportados por Geiser 2004; ITS1(2117) Sentido (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (2118) reverso (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') las cuales amplifican un fragmento de aproximadamente ~500pb (Geiser, 2004)(Hami et al., 2021).

La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 µL, la cual consistió en: 2.50 µL de Buffer DreamTaq, 0.40 µL dNTPs, 0.5 µL ITS1(2217) sentido, 0.5 µL ITS4(2218) reverso, 0.3 µL Taq DreamTaq, 10 µL DNA, 10.8 µL agua grado biología molecular (GBM). El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación de los cebadores a 59 °C por 30 s, extensión de 72 °C por 1 min, y una elongación final de 72 °C por 2 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador BIO RAD Thermal cycler.

El producto de PCR se observó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (100 µg BrEt) usando un marcador de peso molecular de 1 Kb. La banda de amplificación se visualizó con luz ultravioleta en el fotodocumentador modelo BIO RAD Gel Doc<sup>tm</sup> XR+.

#### 4.2.5 Amplificación del marcador “Translation elongation factor 1” (*TEF 1*) por PCR

Las condiciones para la PCR seguidas fueron las reportadas por (Silva et al., 2014), usando los cebadores *TEF1* (2242) forward (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) EF2 (2243) reverse (GGARGTACCAGTSATCATGTT) los cuales amplifican para ~600pb. La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 µL, la cual consistió en: 2.50 µL de Buffer DreamTaq, 0.40 µL dNTPs, 0.5 µL 2242 Forward, 0.5 µL 2243 Reverse, 0.30 µL Taq DreamTaq, 10 µL DNA, 10.8 µL agua GBM. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 60s, hibridación a 54 °C por 75 s, extensión de 72 °C por 1 min y una elongación final de 72 °C por 2 min. La amplificación y observación del producto de PCR se realizó como en el punto anterior.

#### 4.2.6 Limpieza del producto de PCR

El producto de PCR amplificado se limpió utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit según lo indicado por la casa comercial. El producto de PCR se secuenció en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en Irapuato por el método de Sanger. Con las secuencias generadas se realizó la edición en el programa Chromas Lite 2.1.1®. Después de editarlas, se descargaron secuencias en GenBank de especies previamente publicadas que pertenezcan a los géneros en estudio. Las secuencias se alinearon en el programa Mesquite y se realizó el análisis filogenético empleando el algoritmo de máxima verosimilitud con 1000 réplicas (Bootstrap) usando el programa PAUP4, se utilizó BLAST del NCBI para la comparación de las especies (Geiser , 2004).

### 4.3 Caracterización fisiológica de las bacterias

#### 4.3.1 Prueba de hemólisis

Se creció a las bacterias de interés en una placa de agar nutritivo por 24 h a 28 °C. Se utilizó a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, como control negativo y positivo respectivamente. En una placa de agar sangre (sangre de carnero 5%) se estrió a las 6 bacterias de manera equidistante. En otra placa se colocó una gota de 10 µL de los sobrenadantes obtenidos de cada uno de los consorcios, y los controles

respectivamente. Se incubó la placa a 28 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación se observó la presencia o ausencia de hemólisis.

#### 4.3.2 Susceptibilidad a los antibióticos

La susceptibilidad de las bacterias sujeto de estudio se realizó por la técnica de Kirby-Bauer (Gefen et al., 2017). Se crecieron las bacterias en caldo Müller Hilton por 18 h a 28 °C a 150 rpm. Se midió la densidad óptica de cada una de ellas a 600 nm (Thermo Scientific), se preparó 1 mL a una densidad óptica (DO 0.2), se ajustó el volumen con solución fisiológica estéril (850 mg NaCl por cada 100 mL de agua destilada). Con este cultivo diluido se sembró en una placa de agar Müller Hilton 200 µL de la bacteria y con un hisopo estéril se estrió por toda la superficie de la placa de manera uniforme. Se colocaron de forma equidistante los sensibilizadores de antibióticos de: sulfametoxazol/trimetoprima DICKINSON (1.2 µg), cefazolina Becton Dickson and Company (30 µg), ciprofloxacina Bio-Rad (5 µg), imipenem Bio-Rad (10 µg), amikacina Bio-Rad (30 µg), gentamicina Bio-Rad (10 µg). Se incubó a 28 °C por 18 h, pasado el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición con vernier.

#### 4.4 Prueba de compatibilidad entre las cepas bacterianas

Para realizar la formación de los consorcios entre las bacterias y determinar así su efecto antagónico de manera conjunta, se probó la compatibilidad entre ellas “no antagonismo”, se siguió el método descrito por Fukui (1994). La compatibilidad se determinó usando placas de (90 x 15) de agar nutritivo (AN). Se creció a las bacterias de manera individual en caldo nutritivo (CN) a 28 °C por 48 h con agitación constante (150 rpm), posteriormente se ajustó la DO de 1.0 a 600 nm en el espectrofotómetro Thermo SCIENTIFIC.

Se colocó un disco de celofán estéril de 90 mm sobre la placa (90x15) de AN, se inoculó con 80 µL de una de las 4 bacterias de manera independiente y se estrió con un hisopo estéril por toda la placa dejando sin inocular un 1 cm aproximadamente con respecto al borde de la placa, se incubó a 28 °C por 48 h. Se retiró el disco de celofán de manera cuidadosa obteniendo así una placa de AN impregnada de metabolitos secundarios y/o enzimas. Previamente se preparó un cultivo líquido de

las cepas a confrontar, se colocó una gota de 15 µL de cada una de las bacterias , se permitió que la gota se secase, se incubaron las placas a 28 °C por 48 h (Sundaramoorthy, 2012). El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las bacterias.

#### 4.5 Pruebas de antagonismo contra *Fusarium* sp. con las bacterias *P. mediterranea* (745 y 749), *P. antophila* (751) y *V. paradoxus* (752c)

Se crecieron las bacterias de manera individual en caldo nutritivo (CN) a 28 °C por 48 h con agitación constante (150 rpm). Se colocó un disco de celofán estéril de 90 mm de diámetro sobre la placa (90 x 15) de PDA, se inoculó 80 µL de la bacteria de interés al centro de la placa y se estrío con un hisopo estéril de manera circular dejando sin inocular un 1 cm aproximadamente con respecto al borde de la placa, se incubó a 28 °C por 48 h. Una vez pasado el tiempo de incubación se retiró de manera cuidadosa el celofán que contenía la bacteria dejando así la placa de PDA impregnada de enzimas y/o metabolitos secundarios producidos que se difunden por el medio de cultivo a través del celofán (Michel-Aceves, 2009). Enseguida se colocó un disco de ~1 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contiene estructuras del hongo a probar de tal forma que el micelio estuviera en contacto directo con la superficie del medio PDA. Las placas se incubaron a 28 °C por 7 días, concluido el tiempo de crecimiento se midió el diámetro en cada uno de los casos, utilizando para ello un Vernier.

Se realizó un blanco el cual consistió en colocar 1 cm<sup>2</sup> del hongo sobre una placa de PDA. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial de las cepas de *Fusarium* sp., por efecto de los metabolitos se calculó con base a la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{D1 - D2}{D1} \right] \times 100 \text{ (Worasatit, 1994)}$$

Dónde: D1 = Diámetro de la colonia de *Fusarium* sp crecido en placa de PDA sin tratamiento

D2 = Diámetro de la colonia de *Fusarium* sp crecido en placa de PDA, en donde anteriormente creció la bacteria sobre el papel celofán (Michel-Aceves, 2009).

El experimento se realizó por triplicado. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.0001$ ). Los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se transformaron a porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza de un solo factor y prueba de Tukey.

#### 4.6 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. por efecto de los consorcios bacterianos.

Una vez determinada la capacidad para formar consorcios bacterianos, cada una de las bacterias se creció de manera individual en CN a 28 °C por 48 h con agitación constante (150 rpm), posteriormente se ajustó la densidad óptica (DO) de 1.0 a 600 nm en el espectrofotómetro Thermo SCIENTIFIC (Sundaramoorthy, 2012). Una vez ajustada la DO, se realizó una mezcla (1:1) para la obtención de los consorcios.

De esta mezcla, se inoculó 160  $\mu$ L del consorcio sobre una placa (90 x 15) de PDA previamente preparada con un disco de celofán estéril, se estrió el consorcio como se describe en el paso 4.5. Posteriormente, se retiró el disco de celofán obteniendo una placa de PDA impregnada de metabolitos secundarios y/o enzimas. Al centro de la placa se colocó un disco de  $\sim 1$  cm<sup>2</sup> de medio PDA que contiene estructuras del hongo. Como control positivo se colocó un disco de micelio en una placa de PDA fresca (sin inocular con consorcio). Las placas se incubaron a 28 °C por 7 días (Michel-Aceves, 2009). El experimento se realizó por triplicado y los datos obtenidos se analizaron por medio de la prueba de Tukey con separación de medias. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial se determinó utilizando la fórmula descrita en el apartado 4.5. El experimento se realizó por triplicado. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.0001$ ). Los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se transformaron a porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza de un solo factor y prueba de Tukey.

#### 4.7 Ensayo dual entre los consorcios bacterianos y *Fusarium* sp.

El ensayo se realizó en placas (90 x 15) de PDA, en las cuales se realizó una marca en los 2 cm para ser inoculada la bacteria en esta porción de la caja (Fig. 7). Previamente se inoculó en CN cada una de las bacterias de interés de manera independiente, se incubaron a 28 °C por 48 h con agitación constante (150 rpm). Se ajustó la DO de 1.0 a 600 nm en el espectro Thermo Scientific, y se realizó una mezcla a una relación (1:1) para la formación de los consorcios. La placa de PDA se inoculó con 160 µL del consorcio en la sección A de la placa como lo indica la figura 7, se incubó a 28 °C por 24 h. Posteriormente se colocó una porción de ~1 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contiene estructuras del hongo al centro de la sección B (Fig. 6), se incubó a 28 °C por 7 días. Se realizó un control, para ello en una placa de PDA sin inoculación de la bacteria, se sembró e incubó el hongo en las mismas condiciones. El experimento se realizó por triplicado. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.0001$ ). Los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se transformaron a porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza de un solo factor y prueba de Tukey.

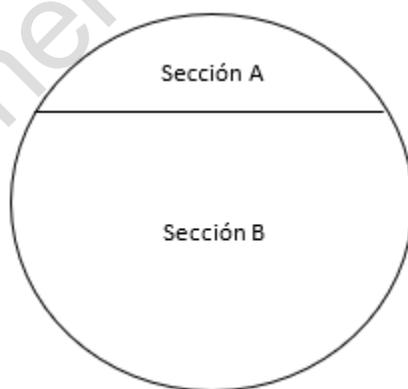


Figura 6. Esquema de placa de PDA para el ensayo dual entre los consorcios bacterianos y *Fusarium* sp.

#### 4.8 Inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. por efecto de los compuestos volátiles producidos por consorcios bacterianos.

El crecimiento de las bacterias se preparó según lo indicado, punto 4.6 Para este experimente se utilizaron cajas de Petri divididas (Fig. 7). Se inoculó la sección A de la placa de PDA con 160  $\mu$ L del consorcio, se estrió de manera uniforme por toda la superficie con un hisopo estéril y se incubó a 28 °C por 24 h. En la sección B de la placa de PDA, se colocó un inóculo de  $\sim$ 1 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contiene estructuras del hongo a probar, se incubó a 28 °C, por 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el efecto en el crecimiento del hongo por la presencia de compuestos volátiles.

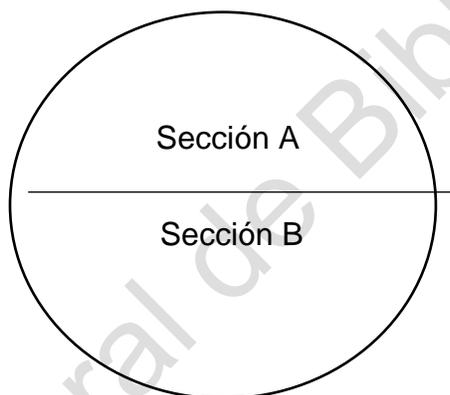


Figura 7. Secciones de placa de PDA para el ensayo de los compuestos volátiles.

#### 4.9 Obtención de conidios.

El ensayo se realizó con las placas de PDA obtenidas en el punto 4.6.

Para la obtención de los conidios se agregaron 2 mL del buffer PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2) estéril a la placa de PDA la cual contenía al sujeto de estudio, con una varilla acodada se realizó un raspado suave por toda la placa. Enseguida se recolectó la solución acuosa que estaba en la placa y se depositó en un tubo estéril de plástico de 15 mL, se repitió el procedimiento hasta obtener un volumen total de 5 mL. Una vez obtenidos los conidios se almacenaron a 4 °C para posteriores experimentos (Medio, 1981; Barrios-Roblero, 2019).

#### 4.9.1 Cuantificación de conidios en la cámara de Neubauer.

De los conidios colectados se realizó una primera dilución, consistió en 900  $\mu\text{L}$  de PBS estéril + 100  $\mu\text{L}$  de la solución de conidios contenidos en un tubo de plástico de 1.5 mL teniendo así una dilución (1:10), se prepararon diluciones sucesivas hasta (1:100). Para contar en la cámara de Neubauer se utilizó el microscopio óptico Leica DM500, El conteo se realizó por triplicado para cada muestra, se realizó el análisis estadístico de Tuckey con su respectiva separación de medias.

Se usó la siguiente fórmula para obtener los conidios totales.

$$\#conidios\ total = (\#de\ conidios)(10,000)(5)(D)$$

Donde:

#conidios = Conidios contados en la cámara de Neubauer.

D=Dilución

#### 4.10 Efecto del sobrenadante de cultivo libre de células de los consorcios bacterianos sobre la producción de biomasa de *Fusarium* sp.

Se tomaron 160  $\mu\text{L}$  de los consorcios preparados como en el punto 4.6, y se inocularon 40 mL de PDB por sus siglas en inglés (Potato-Dextrose-Broth), se incubó a 28 °C por 48 h con agitación constante (150 rpm). Enseguida, en la campana de flujo laminar y con todo el material estéril se colocó el cultivo en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 28 °C en la centrifuga Thermo SCIENTIFIC. Se recuperó el sobrenadante en un tubo cónico de 50 mL. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocó el sobrenadante del consorcio proveniente del cultivo en PDB, se agregó Medio Mínimo *Fusarium* 2x (MMF2x), 120  $\mu\text{L}$  de ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y un inóculo de  $\sim 1\text{ cm}^2$  de *Fusarium* sp, según se muestra en la Tabla 3. Como control positivo se incluyó el cultivo del hongo solamente en medio PDB y MMF2x (Tabla 3).

Los matraces se incubaron a 28 °C por 72 h con agitación constante (150 rpm). Posteriormente, se realizó un sistema de filtración por gravedad, para este paso se utilizó tela magitel a peso constante Enseguida se realizó la filtración de cada cultivo para recuperar la biomasa que creció en el medio de cultivo, se recuperó el magitel

y se colocó en cajas Petri a 70 °C (estufa Felisa) por 48 h. Finalmente, por diferencia de peso, se calculó la reducción de biomasa producida por efecto de los metabolitos secretados al medio de cultivo por los consorcios bacterianos con respecto al cultivo control. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos obtenidos para cada uno de los ensayos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.0001$ ). Los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se transformaron a porcentajes, antes de someterlos al análisis de varianza de un solo factor y prueba de Tukey.

Tabla 3. Componentes de reacción del ensayo de obtención de biomasa.

	Control positivo	C*1	C*2	C*3	C*4
PDB estéril 20 mL	+	-	-	-	-
PDB proveniente de consorcio 20 mL	-	+	+	+	+
Ampicilina 120 µL	+	+	+	+	+
Disco de micelio	+	+	+	+	+
MMF 2X (20 mL)	+	+	+	+	+

Dónde: C\*1= Consorcio 745-749, C\*2= Consorcio 751-745, C\*3= Consorcio 751-749, C\*4= Consorcio 752c-745.

4.11 Extracción de los metabolitos secundarios secretados al medio por las bacterias y evaluación de su efecto en la germinación de conidios.

4.11.1 Extracción de metabolitos secundarios secretados por los consorcios bacterianos al medio de cultivo.

Se realizó la formación de consorcios como en el punto 4.6, se inoculó 160 µL en una placa de PDA (se realizaron 5 placas por cada consorcio.). Las placas se incubaron a 28 °C por 48 h. Se preparó un conjunto de cajas para cada consorcio y se utilizaron tres solventes de distinta polaridad: acetato de etilo, metanol, hexano. Posteriormente, el agar de cada caja de Petri se fraccionó con una espátula estéril en cuadros de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>, y se depositaron en un frasco Schott (500

mL) estéril (las 5 cajas de cada consorcio por frasco), se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Una vez sacado de congelación al frasco 1 se le adicionaron 50 mL de agua destilada estéril + 150 mL de acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), al frasco 2, se le adicionó 200 mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), y al frasco 3, 50 mL de agua destilada estéril + 150 mL de hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ). Los frascos se mantuvieron en agitación a 150rpm durante 24 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se preparó un sistema de filtración por gravedad utilizando embudos y tela magitel, el filtrado se recuperó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril, la fase orgánica se recuperó con la ayuda de un embudo de separación, tomando en cuenta que el embudo de separación se rige por la densidad de los componentes por lo cual la fase orgánica se encontraba en la parte superior. Una vez que se recuperó la fase orgánica para cada uno de los solventes y cada consorcio, se realizó la concentración de los metabolitos en el rotavapor modelo Heidolph, el cual su fundamento establece una destilación suave de los solventes presentes en la muestra, para el caso del acetato de etilo se utilizó una temperatura inicial de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una final de  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se realizó un incremento gradual cada 3 minutos de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para el metanol se comenzó con una temperatura de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una final de  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un incremento gradual de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  cada 3 minutos. La reacción que contenía el metanol formó una mezcla azeotrópica, por lo cual se le adicionó 100 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), se volvió a pasar por el embudo de separación, en este caso el cloroformo al tener una densidad mayor ( $1,483\text{ g/cm}^3$ ) con respecto al agua la fase orgánica se localizó en la parte inferior. Se eliminó el cloroformo en el rotavapor con una temperatura inicial de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una final de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  con incrementos graduales cada 5 minutos. Para la extracción con hexano, se comenzó con una temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  con incremento gradual de  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$  cada 3 minutos hasta llegar a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los metabolitos presentes en el matraz balón se recuperaron en frascos ámbar previamente pesados (peso constante), se le adicionó al matraz balón 2 mL del solvente para lavarlo (3 veces) y así recuperar la mayor cantidad posible de compuestos. Finalmente, el solvente se evaporó a baño maría. Una vez secados se realizó un nuevo pesado para obtener la cantidad de metabolitos recuperados. Por último, se ajustaron los metabolitos a una

concentración de a 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  con metanol. Se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el congelador modelo Thermo SCIENTIFIC, siempre que fue posible se evitó el contacto con la luz para evitar posible foto descomposición.

#### 4.11.2 Evaluación de los metabolitos extraídos en contra de la germinación de conidios de *Fusarium* sp.

Se utilizaron 2500 conidios obtenidos y contados como en el punto 4.9.1, se colocaron en un tubo de plástico de 1.5 mL estéril, se prepararon tubos con dicha cantidad de conidios y se agregaron 3, 6 y 12  $\mu\text{L}$  del metabolito (para cada consorcio y para cada uno de los tres solventes utilizados: hexano, metanol/cloroformo, acetato de etilo), la reacción se llevó a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con PBS estéril. Las reacciones se incubaron por 8 h a 150 rpm/ a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente en placas de PDA con Tritón al 0.5%, se inocularon 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las reacciones. Como control se incluyó un tubo con conidios a las que no se les agregó metabolito, solamente el solvente (metanol). Por placa se sembraron: el control y el tratamiento de 3, 6 y 12  $\mu\text{L}$  del metabolito. Las placas así generadas se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 96 h. Posteriormente se observó el crecimiento obtenido en cada condición. La prueba se realizó por triplicado, para cada uno de los tres tipos de metabolitos preparados.

#### 4.11.3 Tinción de los conidios expuestos a metabolitos secundarios con azul de tripano.

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la reacción del punto anterior y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4% (AMRESCO), se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. En un portaobjetos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  y se observó al microscopio óptico Leica DM500 con el objetivo de 40X. Si se tiñeron de azul indica que esta se encuentra muerta por la acción de los metabolitos secundarios, caso contrario están vivas.

#### 4.12 Efecto de los consorcios bacterianos en la promoción del crecimiento en planta de pimiento (*C. annuum*).

Se realizó la formación de los consorcios bacterianos como en el paso 4.7. Se colocó en un tubo plástico estéril de 50 mL 30 semillas de pimiento morrón (*C. annuum*) variedad California y 2 mL del consorcio. Como blanco se utilizó agua, y caldo nutritivo. Se incubó por 48 h a 28 °C. Pasado el tiempo de incubación en una charola de germinación previamente sanitizada con hipoclorito de sodio al 5% se preparó con una mezcla de Agrolita, peat moss Se colocaron 30 semillas por tratamiento en la charola, se situó en un cuarto cerrado a 28 °C. Se ejecutó un riego manual cada 2 días, una vez por semana se inoculó la planta con 1 mL del consorcio, la inoculación se realizó directamente en la base del tallo de la plántula una vez regada la planta. La planta creció por 30 días, una vez que la planta presentó por lo menos 4 hojas verdaderas se retiraron de la charola de germinación, se lavaron con agua de grifo para medir la raíz y observar el crecimiento tanto de raíz como de la planta. Los datos obtenidos fueron: tamaño de raíz, peso seco, cantidad y tamaño de hojas, grosor del tallo.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un muestreo en un huerto de fresa orgánico en la localidad de La Calera en el municipio de Irapuato, Guanajuato en el 2015. De la zona de la rizósfera se procedió a realizar el aislamiento de bacterias, las cuales se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el ultra congelador hasta posteriores experimentos. Se realizaron pruebas de antagonismo con dichas bacterias aisladas, de las cuales finalmente se seleccionaron a *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila*, y *Variovorax paradoxus* por su doble función, su poder de inhibición de hongos fitopatógenos, y con la intención de analizar su capacidad para promover el crecimiento vegetal en *Capsicum annuum*.

Respecto a las cepas de hongos, se procedió a utilizar la colección de 24 cepas de *Fusarium* sp. obtenidas en el Estado de Colima por el Dr. Francisco Javier Delgado Virgen, la primera selección se basó en la procedencia del aislado, se tomaron las muestras las cuales provenían de: raíces de aguacate (F27), raíces de melón (F36), mazorca (maíz) (F63), aire (F40, F132, F44. F10, F90, F10) y suelo (F70, F71, F155). Una vez seleccionadas se realizó una prueba de antagonismo con las bacterias usadas en este trabajo para determinar el grado de inhibición del crecimiento ejercido por estas bacterias. El siguiente filtro de selección fue el porcentaje de inhibición de crecimiento que experimentaron a causa de los metabolitos de las bacterias utilizadas, finalmente se seleccionaron a las cepas F70 y F132 las cuales cumplían con los criterios mencionados. Así mismo, se incluyó a la cepa de *Fusarium oxysporum* (Fox B y FC3) donadas por la Dra. Blanca Estela Gómez Luna (Universidad de Guanajuato) y por el Dr. Santiago Vergara de la Facultad de Ciencias Naturales-UAQ respectivamente.

### 5.1 Identificación molecular de las cepas de *Fusarium* sp.

Para proceder a la identificación molecular de las cepas de *Fusarium* sp, se procedió a amplificar por PCR el marcador ITS, así como el TEF-1 $\alpha$ . En el caso del ITS se amplificó una banda de aproximadamente  $\sim 500$  pb (Fig. 8). Para la amplificación del fragmento de TEF-1 $\alpha$  se observó la presencia de amplicones bien definidos en el rango de  $\sim 650$  pb (Fig. 9). Se obtuvieron las bandas de amplificación

esperadas con los pesos descritos en la literatura (Sun et al., 2018). El análisis de las secuencias de *Fusarium* sp. con los marcadores ITS y TEF-1 $\alpha$ , confirmaron la identidad de diferentes especies del género *Fusarium* sp.

Las secuencias fueron analizadas en la base de datos de GenBank del NCBI, mediante la herramienta de Blast, el análisis de las secuencias indicó que la cepa Fox B corresponde a *F. oxysporum* (GenBank: KT339743.1) (Fig. 11), para la cepa F132 (Fig. 10), ésta corresponde a *F. incarnatum* (GenBank: MG543799.1), en dichas muestras se utilizó el marcador ITS. Se realizó la amplificación del gen TEF-1 $\alpha$  en la cepa F70, debido a que se conoce que llegan a existir errores a nivel de especie con la secuenciación del gen ITS a causa de la homología que existe algunas especies de este género, siendo el gen TEF-1 $\alpha$  más específico a nivel de especie, dándonos así mayor confiabilidad en los resultados, en este caso determinamos que la cepa F70 corresponde a *F. equiseti* (GenBank: KX215087.1) (Fig. 12).

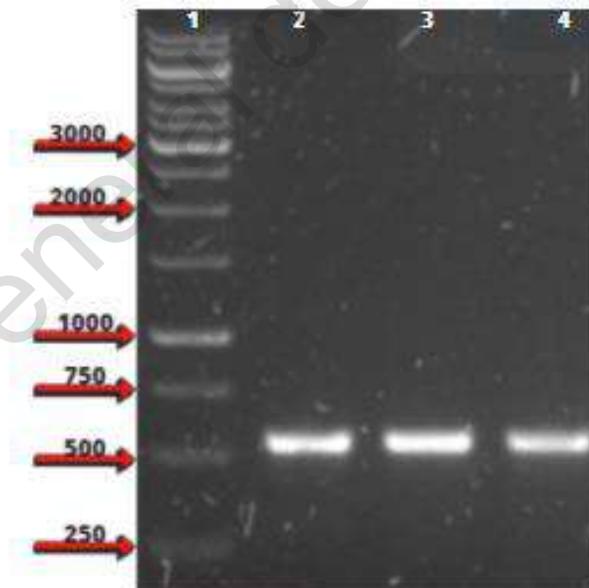


Figura 8. Amplificación del marcador “Internal Transcribed Spacer” (ITS). Producto de PCR de 500 pb para las muestras de *Fusarium* sp. Carril 1 MM: marcador de peso molecular de 1kb, carril 2 muestra Fox B: carril 3 muestra F70: carril 4 muestra F132.

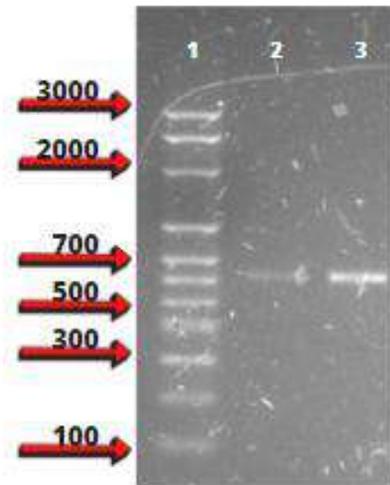


Figura 9. Amplificación del marcador “Elongation Factor” (TEF-1 $\alpha$ ). Producto de PCR de 650 pb para las muestras de *Fusarium* sp. Carril 1 MM: marcador de peso molecular de 1kb (se indica en pb), carril 2 muestra F70 Tm 57 °C: carril 3 muestra F70 Tm 54 °C.

A continuación, las secuencias obtenidas se compararon con información depositada en la base de datos de secuencias del GenBank del NCBI para identificar a sus parientes más cercanos. La posición filogenética exacta de los diferentes aislados se determinó mediante el análisis filogenético de las secuencias de los aislados con sus parientes más cercanos. Brevemente, las secuencias colectadas se alinearon utilizando el programa de alineación múltiple de secuencias MESQUITE y se utilizaron para generar los árboles filogenéticos basados en el algoritmo de máxima verosimilitud en el programa PAUP4. La validez de las ramas en los árboles resultantes se evaluó mediante el soporte de remuestreo bootstrap de los conjuntos de datos con 1000 réplicas (Slama et al., 2019). (Fig. 10-12)

Los resultados obtenidos en este estudio proveen una detección confiable de diagnóstico para el género *Fusarium* sp., usando dos tipos de marcadores moleculares, que permiten establecer las diferencias intra e interespecíficas de las especies de este género. Se ha justificado que la secuenciación parcial del gen TEF-1 $\alpha$  en *Fusarium* sp. permite identificar con precisión y rapidez las especies (Silva et al., 2014).

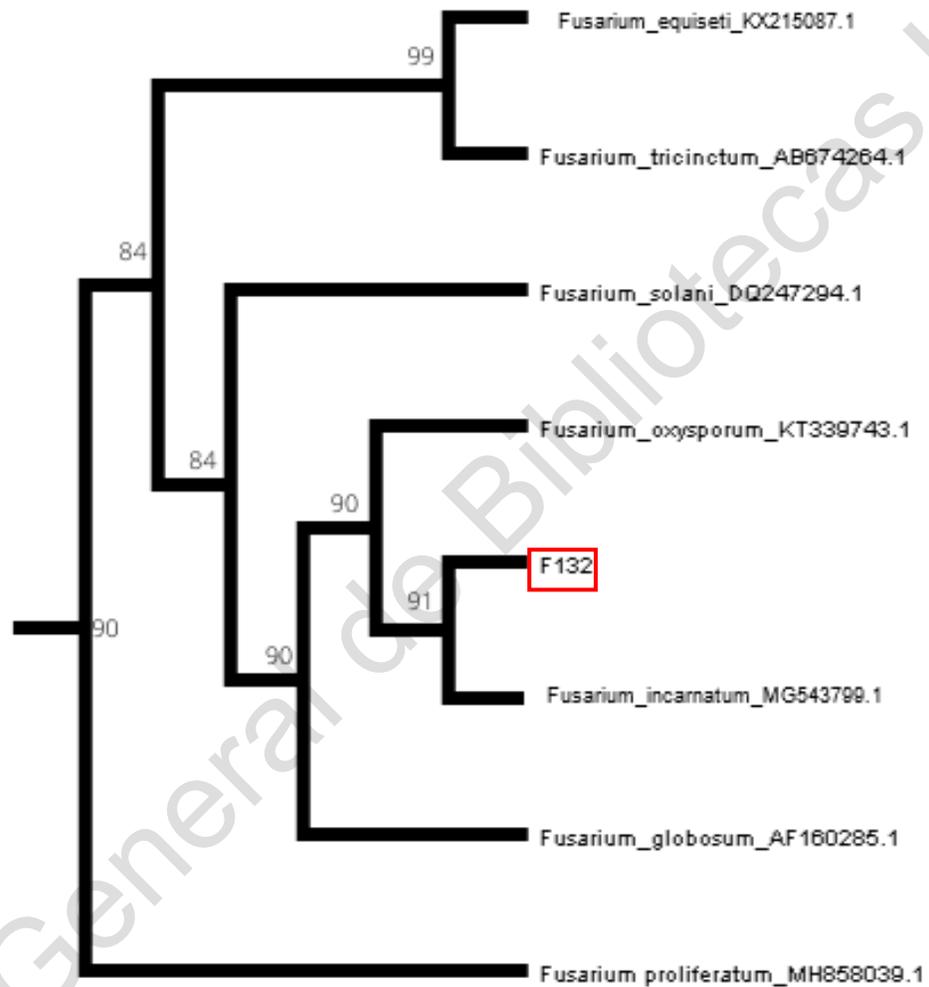


Figura 10. Árbol de máxima verosimilitud construido con secuencias parciales del gen ITS para la identificación de *Fusarium incarnatum* (F132) empleando un coeficiente de similitud de Máxima parsimonia. El árbol se elaboró con un Bootstrap de 1000 réplicas. La secuencia de *Fusarium proliferatum* se utilizó como taxon de fuera para arraigar el árbol.



Figura 11. Árbol de máxima verosimilitud construido con secuencias parciales del gen ITS para la identificación de *Fusarium oxysporum* (Fox B) empleando un coeficiente de similitud de Máxima parsimonia. El árbol se elaboró con un Bootstrap de 1000 réplicas. La secuencia de *Fusarium acutatum* se utilizó como taxon de fuera para arraigar el árbol.

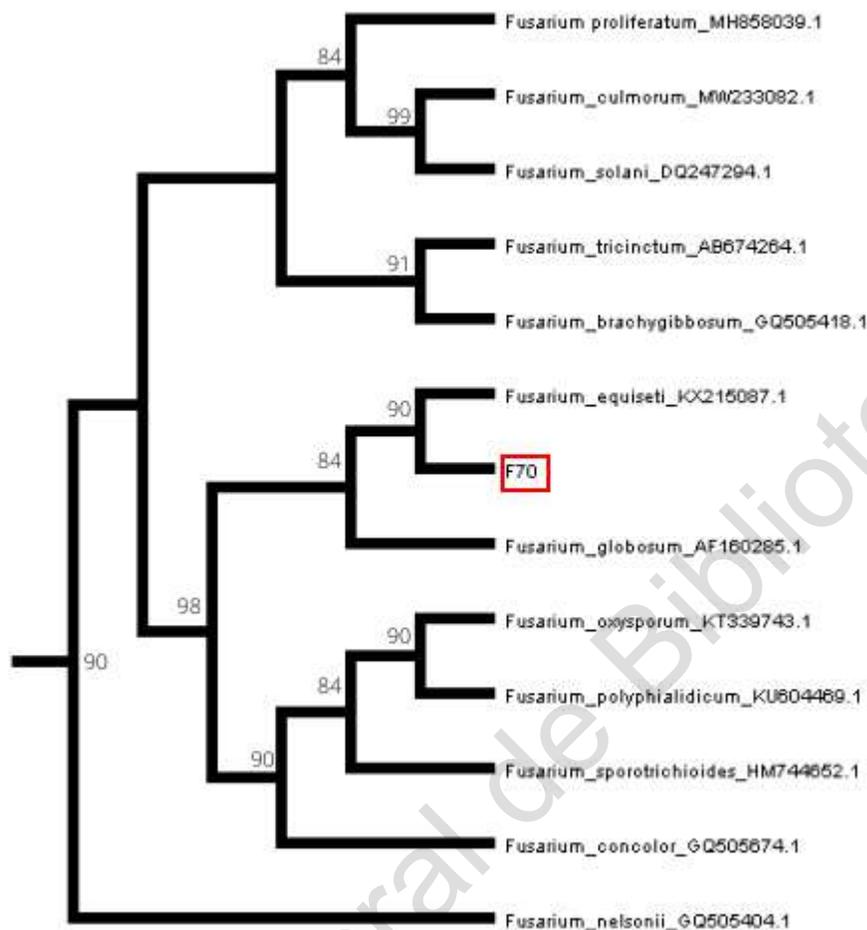


Figura 12. Árbol de máxima verosimilitud construido con secuencias parciales del gen TEF-1 $\alpha$  para la identificación de *Fusarium equiseti* (F70) empleando un coeficiente de similitud de Máxima parsimonia. El árbol se elaboró con un Bootstrap de 1000 réplicas. La secuencia de *Fusarium nelsonii* se utilizó como taxón de fuera para arraigar el árbol.

## 5.2 Análisis fisiológico de las bacterias

Como se mencionó anteriormente, estas cepas fueron utilizadas previamente (Torres Lara, 2020), y fueron parcialmente caracterizadas para sus actividades relacionadas con la capacidad de promover el crecimiento en plantas. Es por ello por lo que procedimos a complementar su caracterización fisiológica.

### 5.2.1 Prueba de hemólisis para las bacterias *P. mediterranea*, *P. antophila*, y *V. paradoxus*.

La presencia de hemólisis se visualizó por el desarrollo de un halo claro en agar sangre alrededor de las colonias, indicando la producción moléculas biosurfactante (Fig. 13) (Hernández-Salmeron et al., 2014).

De las bacterias analizadas, encontramos que *S. aureus* produjo un claro halo de hemólisis signo de una  $\beta$ -hemólisis mientras que las dos cepas de *P. mediterranea* produjeron de igual manera un halo hemolítico resultado de una  $\beta$ -hemólisis, las cepas *P. antophila*, *V. paradoxus* no mostraron reacción alguna (Fig. 13). Hoy en día se sabe que algunas cepas con actividad hemolítica producen compuestos antibióticos como son: bacteriocinas, iturina A, surfactina o micosubtilina. Los mecanismos de estos antibióticos son diversos y complejos, pero la formación de poros en los eritrocitos, así como en las paredes celulares bacterianas o fúngicas es un mecanismo predominante (Fan D, 2021.). Por lo tanto, las cepas que producen este tipo de antibióticos tienen una excelente actividad para inhibir el crecimiento de competidores en ecosistemas como la rizósfera. Así, la producción de varios lipopéptidos como la micosubtilina, la iturina A o la surfactina se ha asociado con la inhibición o el biocontrol de diferentes hongos patógenos de las plantas como: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* (Fan D, 2021.)

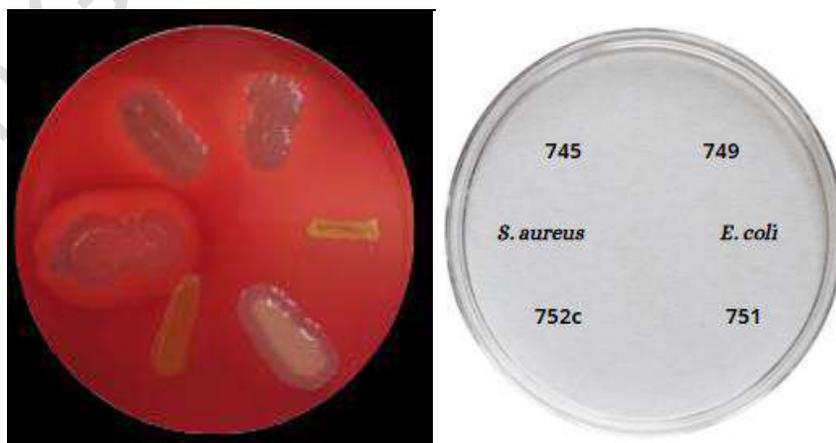


Figura 13. Prueba de hemólisis en agar sangre. Se detectó la presencia de  $\beta$ -hemólisis en *P. mediterranea*. Las bacterias *P. antophila*, *V. paradoxus* dieron

negativo a la detección de  $\beta$ -hemólisis. *S. aureus* y *E. coli* como controles positivo y negativo respectivamente.

### 5.2.2 Sensibilidad a antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad natural o adquirida de los microorganismos para resistir los efectos de un compuesto que es capaz de matar a la población sensible (Sep et al., 2020). De hecho, la resistencia a los antimicrobianos está ampliamente considerada como uno de los mayores retos sanitarios de nuestro tiempo.

Se determinó la resistencia para cada una de las bacterias utilizando antibióticos de amplio espectro: sulfametoxazol/trimetoprim, cefazolina, ciprofloxacina, imipenem, amikacina, y gentamicina. Los resultados del tamaño del halo de inhibición de la prueba se presentan en la Tabla 4 donde se muestran el diámetro de la zona de inhibición en mm producido por los antibióticos sobre el crecimiento de las bacterias. Para la interpretación de estos datos se acudió a la Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (IDDEX, 2018) la cual indica las medidas estandarizadas para asignar la potencial susceptibilidad ante diversos antibióticos. Por lo tanto, la interpretación de la susceptibilidad a antibióticos se presenta en la Tabla 5, donde se reportan como: susceptibles (S), intermedio (I) o resistentes (R).

Las placas se leyeron a las 24 h (Fig. 14). Los antibióticos amikacina (30  $\mu$ g), y gentamicina (10  $\mu$ g) fueron los más eficaces siendo todos los aislados sensibles a dicho antibiótico, seguido por imipenem (10  $\mu$ g) para el cual solamente *P. mediterranea* (745) resultó resistente, y poco tolerante para la otra cepa de *P. mediterranea* (749). Las cepas de *P. mediterranea*, y *V. paradoxus* fueron tolerantes a sulfametoxazol/trimetoprim Dickson (1.2  $\mu$ g), siendo *P. antophila* la única susceptible a dicho antibiótico. La cefazolina (30  $\mu$ g) fue el antibiótico menos eficaz a la concentración utilizada, todas las cepas resultaron tolerantes. En el caso del antibiótico ciprofloxacina (5  $\mu$ g), solamente se contaba con un sensidisco, el cual se usó con la cepa *V. paradoxus* la cual resultó ser susceptible.

Las cepas de *P. mediterranea* (745, 749) resultaron resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim, y cefazolina, susceptibles a amikacina, gentamicina. La cepa 745 fue de resistencia intermedia a imipenem en contraste con la cepa 749 que resultó ser susceptible. Se conoce que el género *Pseudomonas* llega a ser susceptible a amikacina, gentamicina, e imipenem con una CMI de 256 µg/ml. A su vez son resistentes a sulfametoxazol, ampicilina, y cloranfenicol (Correa Rivas et al., 2015).

Los datos del antibiograma de *P. antophila* refleja resistencia solamente para cefazolina y ampicilina, presentando sensibilidad para todos los antibióticos restantes. Las cepas resistentes a las concentraciones más altas de imipenem pertenecen en su mayoría a los géneros *Flavobacterium*, *Enterococcus*, *Janthinobacterium*, *Raoultella*, *Pantoea* y, sobre todo, *Pseudomonas* (Gefen et al., 2017). Curiosamente, no todas las *Pseudomonas* sp. se comportaron igual respecto a la resistencia (Fig 14).

Se sabe que las bacterias que presentan resistencia a antibióticos llegan a tener un papel de mayor importancia al ser utilizadas como bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) en el campo, debido a que su adaptación a la presencia de diversos compuestos tóxicos en el suelo, como lo son los residuos agroquímicos, así como una mejor capacidad para colonizar puesto que podrán ser más aptos para establecerse en el nicho ecológico (Nguyen et al., 2018).

Tabla 4. Diámetro del halo de inhibición en mm

Antibiótico	<i>P. mediterranea</i>	<i>P. mediterránea</i>	<i>P. antophila</i>	<i>V. paradoxus</i>
sulfametoxazol/trimetoprim	0	40	320	0
Cefazolina	0	0	0	0
Ciprofloxacina	x	X	X	300
Imipenem	80	260	340	240
amikacina	160	210	240	210
Gentamicina	150	220	190	190

El diámetro del halo de inhibición en mm de cada bacteria en respuesta al antibiótico. El signo X corresponde a que no se realizó la prueba correspondiente.

Tabla 5. Susceptibilidad de las bacterias según los índices de BSAC (2013), para la prueba de disco.

Antibiótico	1	2	3	4
sulfametoxazol/trimetoprim	R	R	S	R
cefazolina	R	R	R	R
Ciprofloxacina	X	X	X	S
Imipenem	I	S	S	S
amikacina	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S

R; resistencia al antibiótico, S; sensible al antibiótico, I: respuesta intermedia al antibiótico, X: no se realizó. 1) *P. mediterranea* (745), 2) *P. mediterranea* (749), 3) *P. antophila* (751), 4) *V. paradoxus*.

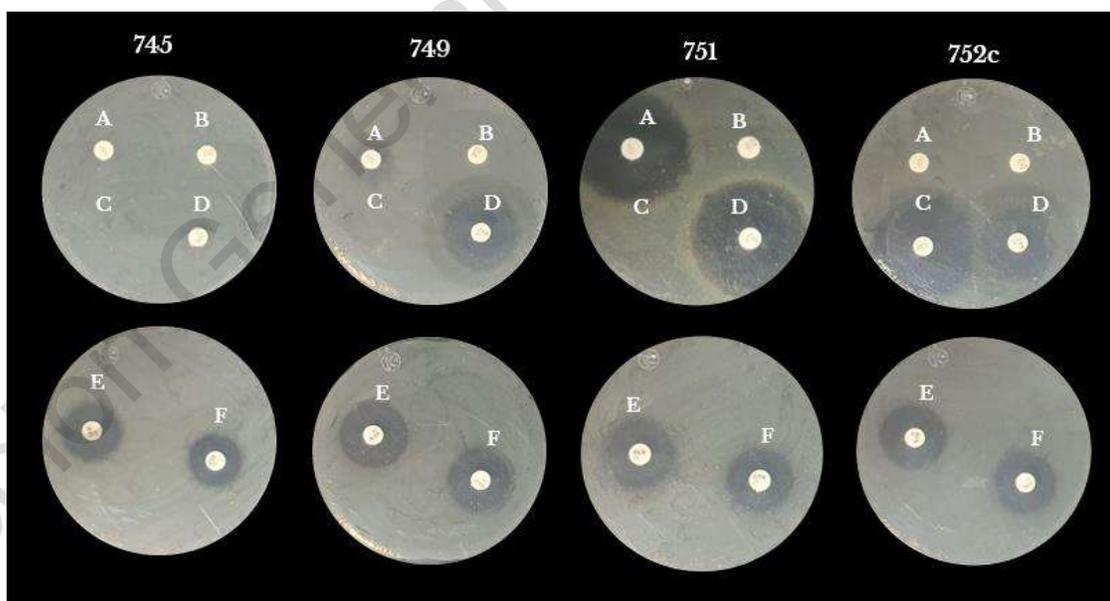


Figura 14. Prueba de Kirby-Bauer. Identifica el efecto de los antibióticos en las bacterias. Observación de la tolerancia a: A) sulfametoxazol/trimetoprim Dickson 1.2 µg B) cefazolina Becton Dickson and company 30 µg C) ciprofloxacina Bio-Rad 5 µg

D) imipenem Bio-Rad 10 µg E) amikacina Bio-Rad 30 µg F) gentamicina Bio-Rad 10 µg.

### 5.2.3 Caracterización bioquímica de *P. mediterranea*, *P. antophila*, *V. paradoxus*

Todas las bacterias viven en condiciones ambientales diferentes, por lo tanto, deben de adaptarse a su entorno de manera rápida, eficaz y aprovechando todas las reservas de nutrientes que hay en el suelo como fuente de energía. Esta diversidad es útil para caracterizar la diversidad de enzimas implicadas en el metabolismo y obtención de energía de cada microorganismo (Kumar et al., 2018). Para conocer un poco más a profundidad los mecanismos que las bacterias emplean, es que se realizaron diversas pruebas usando medios de cultivo selectivos para identificar algunos perfiles bioquímicos, averiguando la capacidad de sintetizar o degradar diversos compuestos que les otorguen la habilidad de ser empleadas como PGPR.

Tabla 6. Caracterización bioquímica de las bacterias

Bacteria	Solubilización de fosfatos	Sideróforos	AIA	Actividad quitinolítica
<i>P. mediterranea</i> (745)	-	-	+/-	-
<i>P. mediterranea</i> (749)	+	-	-	-
<i>P. antophila</i> (751)	-	-	+	-
<i>V. paradoxus</i> (752c)	-	-	-	-

Fueron empleados diferentes medios selectivos para determinar la capacidad de las bacterias aisladas como PGPB. Simbología, (+) prueba positiva, (-) prueba negativa, (+/-) resultado intermedio.

### 5.2.3.1 Solubilización de fosfatos

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (P) asociadas a las raíces de las plantas han sido consideradas como una de las alternativas para reducir la aplicación de fertilizantes fosfatados inorgánicos y promover el crecimiento de las plantas (Alfredo et al., 2017).

La determinación de la capacidad de las bacterias de solubilizar fosfatos se realizó usando el medio de cultivo PVK (Medio Pikovskaya) (Torres Lara 2020), dando como resultado a *P. mediterranea* (749) como la única bacteria capaz de solubilizar el fosfato tricálcico del medio (Fig. 15). La técnica consiste en determinar la capacidad de la bacteria para solubilizar el fosfato tricálcico para ello hay diversos mecanismos empleados por las bacterias (Corrales Ramírez, et al., 2014): 1) liberación de compuestos complejantes o disolventes minerales (aniones de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo), por medio de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, tales como el oxálico, cítrico, láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético. Estos compuestos actúan por medio de los grupos carboxílicos quelando cationes unidos a fosfato convirtiéndolos en formas solubles. Aunque la producción de ácidos orgánicos es uno de los mayores factores responsables de este proceso, no es el único mecanismo empleado por microorganismos para solubilizar fosfatos; (2) liberación de enzimas extracelulares (mineralización bioquímica del P); (3) liberación de P durante la degradación del sustrato (mineralización biológica P) (Alfredo et al., 2017).

El halo transparente que se formó alrededor de las colonias, en la medida que ocurrió la solubilización, constituyó el indicador de actividad de índice de solubilización de fosfatos (ISF) (Alfredo et al., 2017) (Fernández-Travieso, 2016). Las bacterias estudiadas como productoras de ácidos orgánicos solubilizadoras de fosfato sobresalen: *Kluyvera cryocrescens*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus*, y *Enterobacter nakasaki* (Restrepo et al., 2015).



Figura 15. Medio Pikovskaya inoculado con *P. mediterranea* (749) El halo transparente alrededor de la colonia indica la solubilización del fosfato tricálcico. La pigmentación amarilla muestra la capacidad de las bacterias para acidificar el medio de cultivo. Fotografía tomada de (Torres Lara, 2020)

#### 5.2.3.2 Producción de sideróforos

Los sideróforos, son pequeñas biomoléculas sintetizadas por algunos microorganismos para captar hierro del medio. En la naturaleza éste compuesto se encuentra fundamentalmente en la forma  $Fe^{3+}$  formando parte de sales e hidróxidos de muy baja solubilidad (Aguado-Santacruz et al., 2012).

La producción de sideróforos se realizó en el medio sólido Fe-CAS. De las muestras analizadas solamente las bacterias *P. antophila* y *V. paradoxus* dieron positivo a la prueba (Fig. 16). Jiang y Lingmin dieron a conocer que *Pantoea ananatis* además, de promover el crecimiento de las plantas por su capacidad de solubilizar fósforo y zinc, tiene la capacidad de producir gran cantidad sideróforos. Muchas cepas de *Pantoea* son fuertes competidores ambientales que producen una variedad de productos naturales con actividad antibiótica, como pantocinas, microcinas y fenazinas (Jiang et al., 2019). Nguyen en 2018 dio a conocer que *Variovorax boronicumulans* produce lipopéptidos sideróforos variochelin A y B, también demostraron que los perfiles de lípidos polares de algunas especies del género *Variovorax* consisten en difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina (Nguyen et al., 2018).

Ciertas bacterias producen sólo una clase de sideróforos, otras secretan diversos tipos que las hace más eficientes para colonizar diferentes ambientes.

Algunas especies del género *Pseudomonas* producen sideróforos del tipo hidroximato, entre los que se encuentran la ferribactina y pseudobactina, mientras que *P. fluorescens* produce moléculas denominadas pioverdinas del tipo catecol (Álvarez-García et al., 2020). Las bacterias sintetizan los sideróforos principalmente en la fase de crecimiento exponencial, que es la etapa en la que requieren mayor cantidad de nutrientes para la división y es por ello por lo que los secretan al medio. Los sideróforos producidos por *P. fluorescens*, participan en la inhibición del crecimiento de algunos fitopatógenos, tales como, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloesporioides*, *Phytophthora cinnamomi* y *F. oxysporum*, lo que nos indica que los sideróforos juegan un papel importante en la inhibición de patógenos (Álvarez-García et al., 2020).

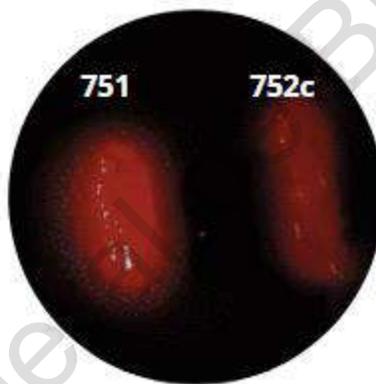


Figura 16. Detección de sideróforos en medio Fe-CAS para las bacterias *P. antophila* (751) y *V. paradoxus* (752c). La producción de sideróforos es indicada por la reacción involucrada en el secuestro de hierro del CAS (Cromo Azurol Sulfonato) por el efecto quelante de los sideróforos, tornando la coloración azul a naranja (Foto: Erick Alejandro Martínez-Reséndez).

#### 5.2.3.3 Determinación de ácido indol acético

La auxina: ácido indolacético (AIA), induce la formación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y a su vez promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Vega-Celedón et al., 2016) (Ortiz-Galeana et al., 2018).

La prueba de indol es revelada con el reactivo de Kovacs, la cual se basa en la formación de un pigmento rosa, el indol reacciona con el 4-dimetilaminobenzaldehído, ello es debido a la presencia de metil-indol o indol 60 metilado (Vega-Celedón et al., 2016). La bacteria que mostró un resultado positivo fue *P. antophila* (751) mostrando una tonalidad rosa como lo marca la literatura, se sabe que el género *Pantoea* llega a producir hasta 2 veces más AIA con respecto al género *Pseudomonas*. Los investigadores Ortiz-Galeana et al. 2018 encontraron que *Pantoea ananatis* llega a producir hasta 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que *Pseudomonas fluorescens* produce 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Por tal razón en el ensayo se observó que *P. mediterranea* (745) mostró una pigmentación tenue que puede interpretarse como un resultado intermedio, es decir, producen AIA en menor cantidad (Fig. 17).



Figura 17. Producción de ácido indol acético. Se muestra la producción de AIA en el medio de cultivo soya triptófano. Se observa el anillo que corresponde a la producción del AIA al reaccionar con el reactivo de Kovacs. Control negativo *Salmonella* sp. como control positivo *E. coli*. Fotografía tomada de (Torres-Lara, 2020).

#### 5.2.3.4 Actividad quitinolítica

La lisis de microorganismos ha sido atribuida a la acción de antibióticos, enzimas, aminoácidos (Okumoto, 2001). En la interacción antagónica entre las poblaciones de microorganismos en el ambiente natural, la lisis producida por enzimas es uno de los mecanismos más comunes. Una especie puede eliminar a

otra debido a la digestión de la célula o hifa por parte de las enzimas producidas por ésta. Las bacterias micolíticas producen quitinasa, lo cual podía degradar la pared celular del hongo que contenía quitina, como uno de sus principales componentes (Paulsen et al., 2020).

Las bacterias de estudio no mostraron un crecimiento significativo al estar en un medio compuesto por quitina coloidal, dando como resultado que estas bacterias no cuentan con la enzima quitinasa la cual es la encargada de degradar la quitina presente en el medio. El efecto de antagonismo que presentan sobre los hongos no es causado debido a este fenómeno (Torres Lara 2020).

### 5.3 Prueba de compatibilidad entre las cepas bacterianas

El desarrollo de consorcios como inoculantes bacterianos promotores de crecimiento vegetal se ha fundamentado en el desarrollo de mezclas bacterianas con diversas funciones cada una de ellas. Estos consorcios bacterianos se establecen por la combinación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), endófitos, solubilizadoras de P y productores de sustancias reguladoras de crecimiento (León-Fajardo et al., 2019). Sin embargo, este tipo de mezclas no siempre presentan resultados consistentes en la promoción de crecimiento vegetal.

Otra ventaja de la formación de consorcios bacterianos es con la finalidad de obtener mejores resultados al momento de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos, se ha estudiado que la formulación de consorcios bacterianos son más efectivos que el utilizar bacterias de forma independiente (León-Fajardo et al., 2019), incluso los consorcios suelen complementarse con bacterias u hongos benéficos (Vanegas Guerrero, 2012). Para determinar si las bacterias utilizadas podían formar consorcios procedimos a realizar una prueba de compatibilidad. Los resultados obtenidos indican que las bacterias pueden agruparse en diferentes consorcios: *P. mediterranea*-*P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*-*P. mediterranea* (752c-745). Aunque las cepas 745 y 749, ambas sean *P. mediterránea*, hemos observado

respuesta diferencial ante algunas pruebas con respecto a la inhibición de las diferentes cepas de *Fusarium* sp. Así como la resistencia a antibióticos.

### 5.3.1 Prueba de hemólisis para la detección de $\beta$ -hemólisis en el medio de cultivo libre de células proveniente del consorcio bacteriano.

Debido a que las bacterias son capaces de hemolizar los eritrocitos, procedimos a determinar si dichos compuestos son liberados al medio de cultivo. Para ello en una caja de agar sangre, colocamos una gota de los sobrenadantes de los consorcios bacterianos inoculados en caldo nutritivo por 48 h (extracto libre de células). La caja se incubó por 24 h a 28 °C, en este caso no se observó hemólisis (Fig. 18). Por tanto, el factor que produce la lisis de los glóbulos rojos no es un factor liberado en el sobrenadante, o bien que este no se encuentra en la cantidad suficiente; esto puede ser debido a que se requiere la presencia de los eritrocitos para que las bacterias sean capaces de producir las moléculas que se encargan de degradar la membrana de los eritrocitos (Sperandio et al., 2010) .



Figura 18. Detección de  $\beta$ -hemólisis en el extracto libre de células.

### 5.4 Efecto antagónico de las bacterias *P. mediterranea* (745 y 749), *P. antophila* (751) y *V. paradoxus* (752c) contra *Fusarium* sp.

Se han descrito varios mecanismos para el biocontrol de los patógenos de plantas, incluyendo la competencia por los nutrientes, la inducción de la resistencia del huésped y la producción de toxinas, enzimas líticas como la quitinasa y metabolitos antifúngicos.

Algunas cepas de *Pantoea* son fuertes competidores ambientales que producen una variedad de productos naturales con actividad antibiótica, como pantocinas, microcinas y fenazinas (Jiang et al., 2019). El modo de acción de *Pantoea* es producir irregularidades en la morfología de las hifas, como el estrechamiento de las puntas y la formación de vesículas, provocando la lisis de la pared celular (Chen et al., 2017). Actualmente se utilizan algunas especies del género *Pseudomonas* sp. como agente de biocontrol debido a que interactúa con los hongos patógenos a través de la quimiotaxis y viviendo muy cerca de los hongos, a menudo colonizan las superficies de las hifas y utilizan los nutrientes exudados por las células fúngicas vivas. También se sabe que este comportamiento bacteriano contribuye al biocontrol a través de la biosíntesis de compuestos antifúngicos o la liberación de enzimas implicadas en la degradación o alteración de los componentes fúngicos (Cabanás et al., 2018) (Liu et al., 2017). El género *Variovorax* se caracteriza principalmente por tener un gran impacto para promover el crecimiento de las plantas especialmente en hortalizas (chile, col china), dada su capacidad para producir sustancias y enzimas de crecimiento vegetal, como sideróforos y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa, respectivamente, de forma afín con el crecimiento activo en un rango más amplio de temperaturas (10-30 °C), y pH (5,0-10,0). Coloniza ampliamente en la superficie de la raíz generando una mayor masa radicular.

Para determinar el potencial de *P. mediterranea*, *P. antophila*, y *V. paradoxus*, para controlar el crecimiento de *Fusarium* sp. se usaron los aislados en un ensayo de inhibición en placa de medio PDA, reportando el % de inhibición del crecimiento a los 8 días (Tabla 6). Para *F. equiseti* la bacteria más eficiente en inhibir el crecimiento fue *P. antophila* (751) con un 88% de inhibición, seguido de las 2 cepas de *P. mediterranea* (745, 749) con un 86, y 85% de inhibición respectivamente, por último, esta *V. paradoxus* la cual solamente inhibió el crecimiento en un 68%, los cambios morfológicos fueron evidentes en la pigmentación de la colonia, puesto que cambió la tonalidad rosada a un amarillo tenue en la zona micelar esto para las muestras expuestas a los metabolitos de *P. mediterranea* y *P. antophila*, inclusive se

observó como la estructura de estos tratamiento era demasiado rígida con respecto al control. La tonalidad rosa se mantuvo para el tratamiento con *V. paradoxus*, este tratamiento mostró la menor eficiencia de inhibición con respecto a los demás. Sin embargo, todas las muestras mostraron un incremento de pigmentación en la zona posterior, cambiando de una tonalidad anaranjado claro, a un tono de mayor intensidad (Fig. 19). En el caso de *F. incarnatum* las bacterias de *P. mediterranea* y *P. antophila* tuvieron un porcentaje de inhibición del crecimiento similar con un 85% para las 3 muestras, siguiendo *V. paradoxus* como la de menor efecto inhibitorio con tan solo un 53.7%. Para los 3 primeros casos la inhibición por parte de los metabolitos provocó un cambio total en la pigmentación del micelio pasando de rosado claro para el control a un anaranjado oscuro para el tratamiento con *P. mediterranea* (745), cabe destacar que la estructura que cambió por completo el micelio desapareció formando una estructura gelatinosa, y a su vez rígida. Para *P. mediterranea* (749) y *P. antophila* (751), la tonalidad del micelio cambio a un tono blanco, pero aquí si hubo presencia de micelio tipo algodonoso. *V. paradoxus* solamente mostró una tonalidad más rosada en toda la zona del micelio (Fig. 20). Para *F. oxysporum* (Fox B) todas las bacterias mostraron un porcentaje de inhibición del crecimiento por arriba del 80%, el cambio morfológico de mayor interés fue causado por *P. antophila* (751), se puede observar un cambio total en la estructura frontal del hongo ya que no presenta micelio alguno, sino que se formó una estructura compacta de tonalidad anaranjada intensa. Para todas las demás muestras el cambio de tonalidad paso de rosado a blanco manteniéndose la estructura de micelio algodonoso (Fig 21). *F. oxysporum* (FC3) al ser expuesto a los metabolitos de las bacterias mostró una mayor resistencia con respecto a los demás tratamientos. *P. mediterranea* (749) fue la que inhibió en mejor manera el crecimiento con un 73%, siendo *V. paradoxus* la de menor impacto con tan solo un 49% de inhibición del crecimiento. Los cambios morfológicos aquí fueron más con respecto a la tonalidad, el aumento del pigmento morado en los tratamientos nos indica que la ruta de las antocianinas fue acelerada provocando así las pigmentaciones de los tratamientos (Fig 22). Dicha alteración puede tener significancia no sólo en el metabolismo del hongo sino en la virulencia de este, ya

que se ha demostrado que su coloración rosada a púrpura es ocasionada a la síntesis de la naftoquinona.

La bacteria *V. paradoxus* fue la que menor impacto tuvo al momento de inhibir el crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp, esto concuerda con la literatura, *V. paradoxus* hoy en día se usa mayormente para la promoción del crecimiento radicular y la formación de raíces secundarias (Natsagdorj et al., 2019). Siendo a su vez *P. antophila* la de mayor impacto inhibitorio.

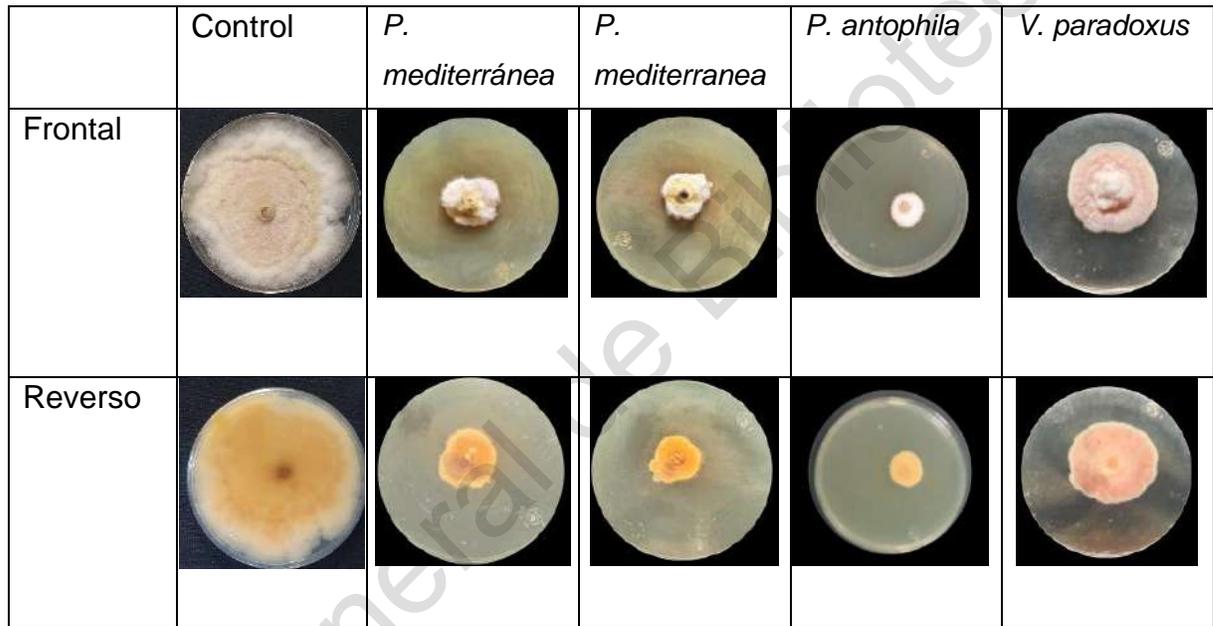


Figura 19. Antagonismo mediado por metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo PDA por *P. mediterranea* (745, 749), *P. antophila* (751), y *V. paradoxus* contra *F. equiseti* (F70). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Las bacterias se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio. Se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

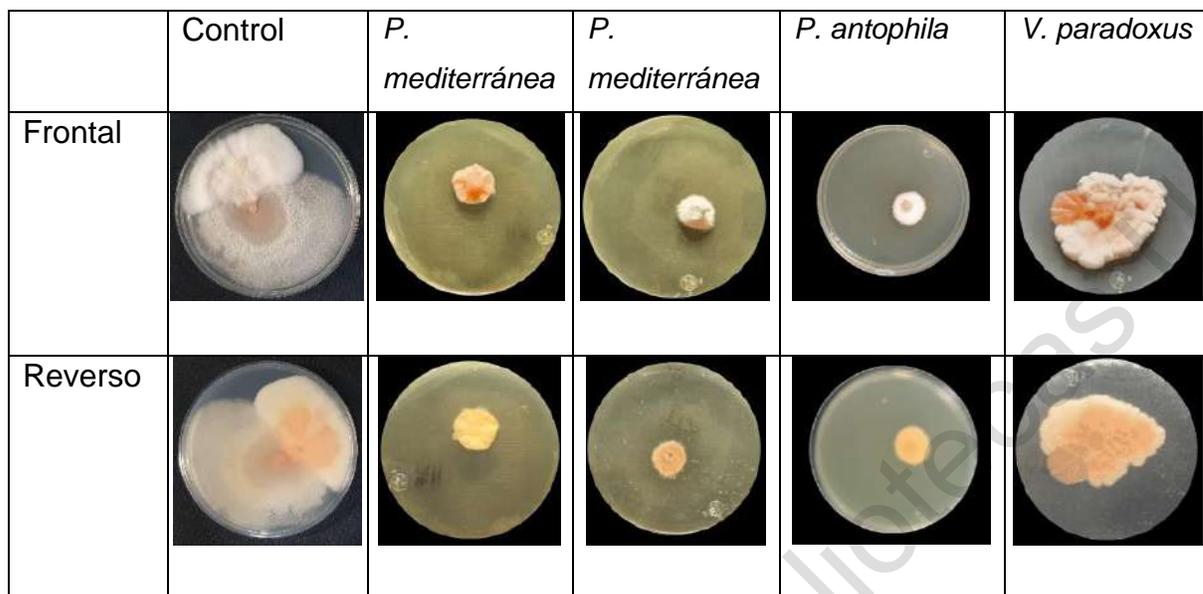


Figura 20. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por *P. mediterránea* (745, 749), *P. antophila* (751), y *V. paradoxus* contra *F. incarnatum* (F132). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Las bacterias se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio. Se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

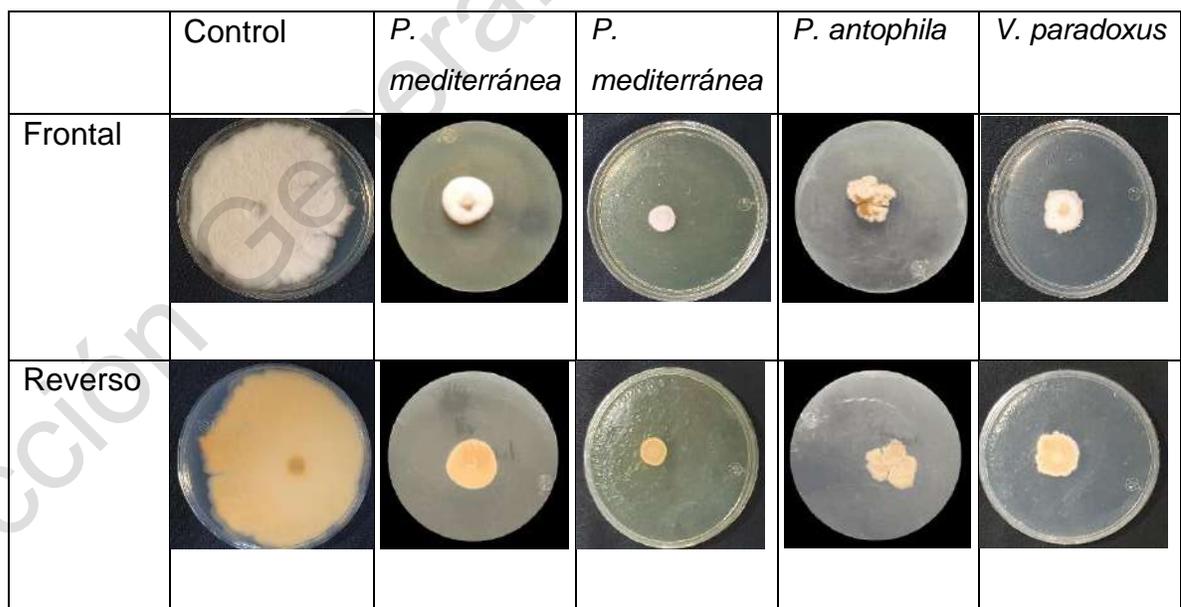


Figura 21. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por *P. mediterránea* (745, 749), *P. antophila* (751), y *V. paradoxus* contra *F. oxysporum* (Fox B). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja

Petri. Las bacterias se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio. Se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

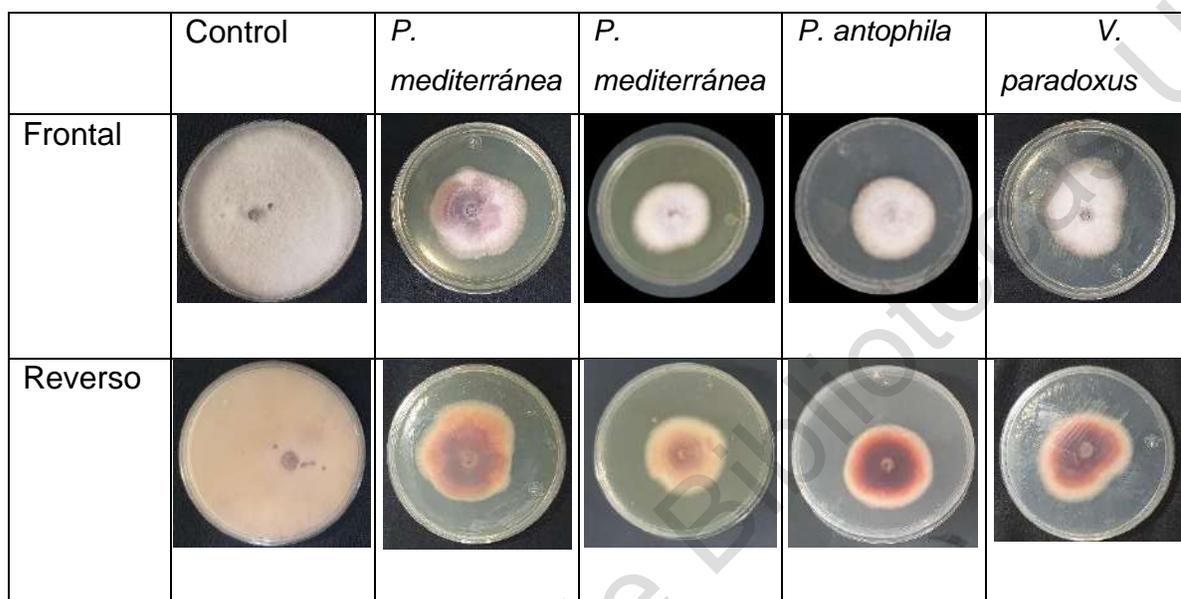


Figura 22. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por *P. mediterranea* (745, 749), *P. antophila* (751), y *V. paradoxus* contra *F. oxysporum* (FC3). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Las bacterias se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio. Se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las especies de *Fusarium* sp por los metabolitos difusibles al medio de cultivo de cepas de *P. mediterranea* (745 y 749), *P. antophila* (751) y *V. paradoxus* (752c).

Tratamiento	<b>F70</b>	<b>F132</b>	<b>Fox B</b>	<b>FC3</b>
	<i>F. equiseti</i>	<i>F. incarnatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>
	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
745	86 ± 2 <sup>ab</sup>	86 ± 2.8 <sup>a</sup>	83 ± 2.3 <sup>a</sup>	65 ± 1.3 <sup>b</sup>
749	85 ± 0.6 <sup>b</sup>	85.5 ± 1 <sup>a</sup>	83.7 ± 4 <sup>a</sup>	73 ± 1.3 <sup>a</sup>
751	88 ± 1.7 <sup>a</sup>	85 ± 7.4 <sup>a</sup>	81 ± 2 <sup>ab</sup>	54 ± 0.6 <sup>c</sup>
752c	68.5 ± 2 <sup>c</sup>	54 ± 4 <sup>b</sup>	80 ± 2.2 <sup>b</sup>	49 ± 0.6 <sup>d</sup>
Testigo	0 ± ND <sup>d</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>e</sup>

Las medias con letras diferentes (a-d) para cada hongo son estadísticamente diferentes.  $p < 0.0001$

## 5.5 Evaluación de la capacidad antagonista de los consorcios bacterianos

En los hábitats naturales, los microorganismos viven en comunidades y algunos aportan beneficios a las plantas. Además, cuando los microorganismos se introducen en el suelo en forma de consorcio e interactúan con una planta huésped tratando de imitar parcialmente las condiciones naturales del suelo desencadenando así respuestas más eficaces de defensa en las plantas huésped durante la entrada de patógenos, sin embargo, no se consigue un efecto aditivo o sinérgico cada vez que se utiliza un consorcio microbiano. (Sarma et al., 2015). La combinación de agentes de biocontrol compatibles entre sí es un enfoque estratégico para controlar las enfermedades de las plantas.

El presente estudio se evaluó el efecto de inhibición de las cepas bacterianas compatibles (*P. mediterranea*, *P. antophila* y *V. paradoxus*). Se conoce por Sarma et al. que el consorcio formado por 2 especies del género de *Pseudomonas* promueve el crecimiento vegetal y a su vez reduce el crecimiento del agente patógeno, la esporulación y la germinación de los conidios (Sarma et al., 2015). En el caso de *F. equiseti* (F70) el consorcio formado por *V. paradoxus*-*P. mediterranea* (752c-745) logro un 89% de inhibición del crecimiento, en este caso fue el consorcio más efectivo, todos se mantuvieron por arriba de un 86% de inhibición del crecimiento (Tabla 7). En todos los casos la pigmentación se modificó pasando de una tonalidad anaranjada tenue a una de mayor intensidad (Fig. 23). En el tratamiento de *F. incarnatum* con el consorcio formado por *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-749) alcanzó una inhibición del crecimiento superior al 90%, mientras que los tratamientos (745-749) y (751-745) inhibieron un 85% el crecimiento (Tabla 7). De igual manera el aumento en la pigmentación ocurrió pasando a una tonalidad anaranjado intenso para todos los tratamientos (Fig. 24). Para *F. oxysporum* (Fox B) todos los consorcios lograron una inhibición por arriba del 83%, siendo el consorcio más efectivo el formado por la pareja de *P. mediterranea* con un 88% de inhibición en el crecimiento (Tabla 7). Los cambios morfológicos más evidentes se dieron con el tratamiento

formado por *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-749) en donde nuevamente se logró apreciar una estructura rígida sin apariencia de existencia de micelio alguno (Fig. 25). Por otro lado, *F. oxysporum* (FC3) mostró un mayor impacto en el crecimiento al ser sometido al consorcio *V. paradoxus*-*P. mediterranea* (752c-745) puesto que alcanzó un 74% en la inhibición del crecimiento (Tabla 7). En contraparte, el consorcio *P. mediterranea*-*P. antophila* (751-749) fue el menos eficaz con tan solo un 67% de inhibición del crecimiento. Estos tratamientos con respecto a las bacterias de forma individual no se observó un cambio en la pigmentación tan radical (Fig. 26).

El consorcio (752c-745) conformado por *V. paradoxus*-*P. mediterranea* fue el más eficaz para los 4 hongos, teniendo por arriba de un 85% de inhibición para *F. equiseti* (F70), *F. incarnatum* (F132), *F. oxysporum* (Fox B), mientras que para *F. oxysporum* (FC3) se obtuvo una inhibición del crecimiento del 74%. La mayoría de los tratamientos obtuvieron por arriba de un 85% de inhibición (Tabla 7), aunque no fue tan grande la diferencia con respecto a los agentes individuales, se tiene la ventaja que los consorcios microbianos promueven el crecimiento de las plantas y desencadenan respuestas de defensa en las plantas huésped durante la entrada de patógenos. También se ha descubierto que los microbios de los pequeños consorcios mejoran las cascadas de señalización de defensa, lo que conduce a una mayor activación transcripcional de varias vías metabólicas (Sarma et al., 2015). Estos resultados sugieren que las interacciones sinérgicas de los agentes de control biológico pueden resultar en un mejor desempeño cuando se encuentran en contacto con la planta (Cabanás et al., 2018).

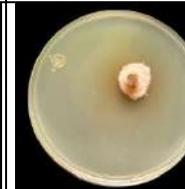
	Control	745-749	751-745	751-749	752c-745
Frontal					



Figura 23. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. equiseti* (F70). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio, y se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

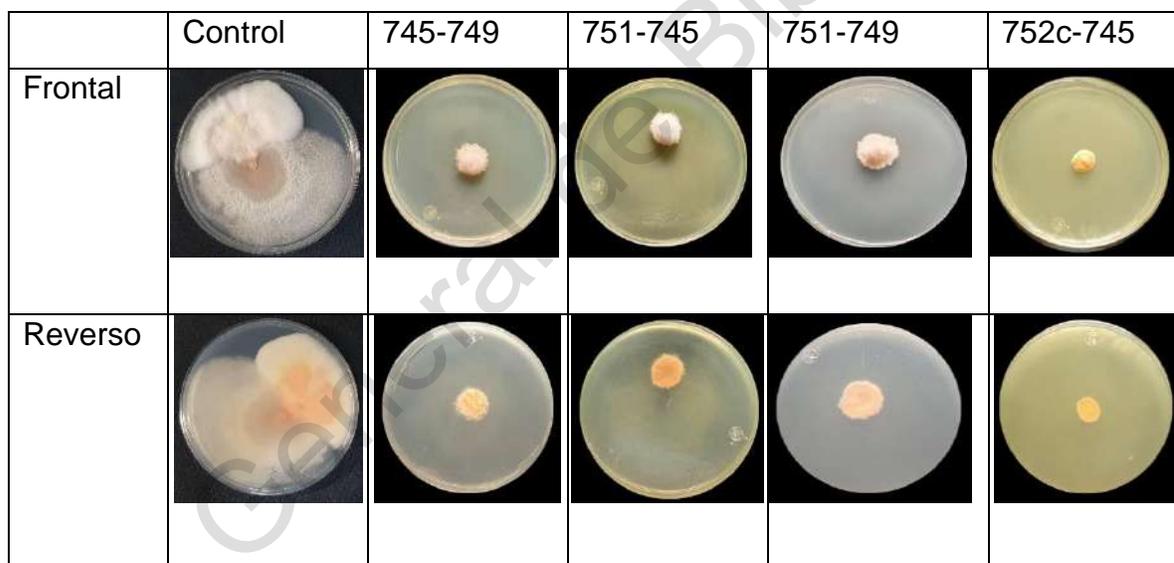


Figura 24. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. incarnatum* (F132). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio, y se incubó a 28 °C por una semana. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

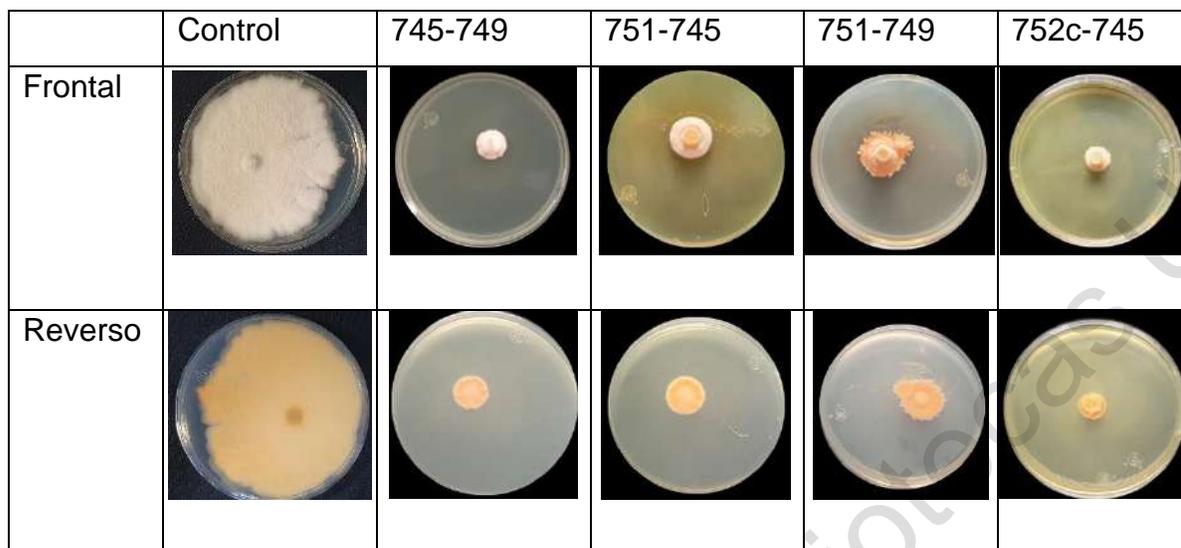


Figura 25. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. oxysporum* (Fox B). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio, y se incubó a 28 °C por una semana, Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

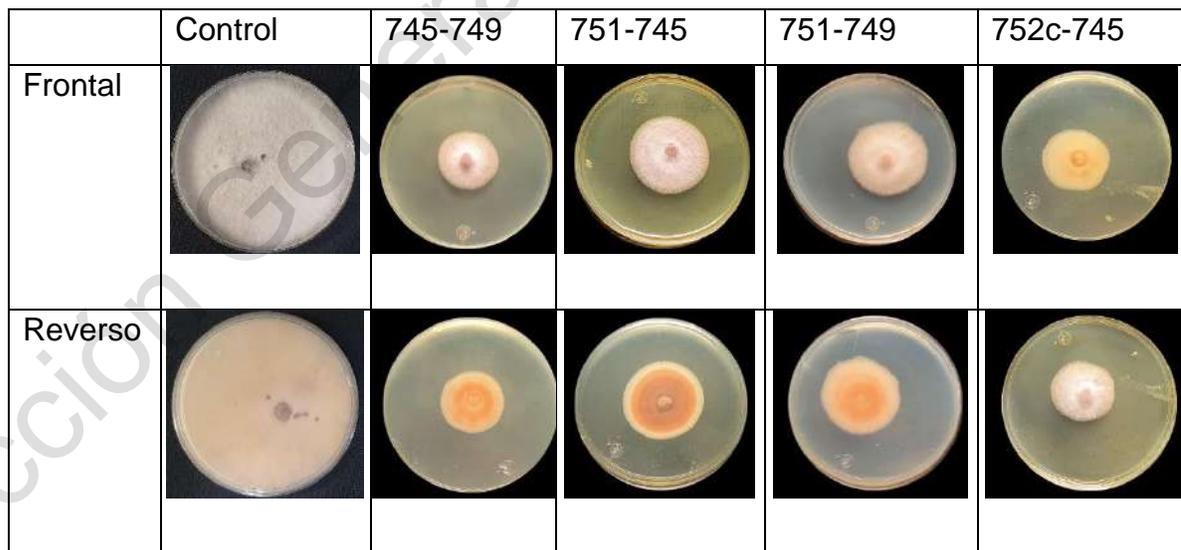


Figura 26. Antagonismo por producción de metabolitos bacterianos difusibles al medio de cultivo por los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. oxysporum* (FC3). Se muestra la

imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre una membrana semipermeable a los metabolitos difusibles. Se retiró el celofán y sobre la caja impregnada de metabolitos se inoculó con el micelio, y se incubó a 28 °C por una semana, Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp ocasionada por la actividad antagónica de los consorcios bacterianos.

Tratamiento	<b>F70</b>	<b>F132</b>	<b>Fox B</b>	<b>FC3</b>
	<i>F. equiseti</i>	<i>F. incarnatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>
	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
745-749	87 ± 1.7 <sup>a</sup>	85 ± 0.64 <sup>c</sup>	86.4 ± 2.2 <sup>a</sup>	73.8 ± 1.7 <sup>a</sup>
751-745	88 ± 0.6 <sup>a</sup>	86 ± 0.64 <sup>c</sup>	87.4 ± 3 <sup>a</sup>	68.5 ± 0.6 <sup>b</sup>
751-749	86 ± 1.7 <sup>a</sup>	91 ± 0.01 <sup>a</sup>	84 ± 0.6 <sup>b</sup>	67.3 ± 2.8 <sup>b</sup>
752c-745	89 ± 2 <sup>a</sup>	88 ± 0.6 <sup>b</sup>	87.3 ± 2 <sup>a</sup>	74 ± 0.5 <sup>a</sup>
Testigo	0 ± ND <sup>b</sup>	0 ± ND <sup>d</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>

Las medias con letras diferentes (a-d) para cada hongo son significativamente diferentes.  $p < 0.0001$

5.6 Observación de los cambios morfológicos ocasionados a *Fusarium* sp debido a la actividad antagónica de los consorcios bacterianos, y la cuantificación de la producción de conidios.

La deformación de las estructuras miceliales, hifales o conidiales fue común en todos los hongos analizados. Los septos transversales y longitudinales desaparecieron por completo en y los conidios se volvieron de paredes gruesas y de forma esférica o irregular (Chaurasia et al., 2005). En varios casos se detuvo la formación de conidios y sólo se desarrolló el micelio vegetativo, pero en otros casos la reducción micelial se vio totalmente reducida sin embargo la producción de conidios se vio favorecida aquí es donde es donde nos hacemos la pregunta, ¿Serán viables estas células reproductivas? En *F. oxysporum* se observó la lisis de las hifas fúngicas y la vacuolización, así como la granulación de las estructuras miceliales (Fig. 27). En este caso, los conidios se volvieron hinchados y de paredes gruesas (Fig. 29). Todos estos cambios morfológicos tuvieron como consecuencia la disminución en la producción de conidios. Para realizar el conteo de los conidios se hizo uso del

PSB y con una varilla triangular se realizó un raspado superficial por toda la zona de crecimiento, se recuperó el sobrenadante para ser cuantificado en la cámara de Neu Bauer. Al final del conteo se observó que existió una disminución en la producción de conidios por arriba del 97% con respecto a el control manejado.

La eficacia del consorcio entre *P. mediterranea*-*P. antophila* (751-749) con el 87% inhibición al desarrollo micelial del hongo y la reducción del 98% de los conidios producidos estaría participando en inhibir la fase sexual y asexual del ciclo vida de *F. oxysporum*; donde la producción de enzimas hidrolíticas como: surfactina e iturrina A degradan la membrana citoplasmática de hongos filamentosos (Guato-molina et al., 2019). *F. equiseti* (F 70) resultó ser aquel en donde se vio una reducción por arriba del 99% en todos sus tratamientos.

Tabla 9. Porcentaje de reducción en la producción de conidios de *Fusarium* sp por el uso de los metabolitos de los consorcios bacterianos.

	<b>F70</b> <i>F. equiseti</i>	<b>F132</b> <i>F. incarnatum</i>	<b>Fox B</b> <i>F. oxysporum</i>	<b>FC3</b> <i>F. oxysporum</i>
Tratamiento	Reducción (%)	Reducción (%)	Reducción (%)	Reducción (%)
745-749	98.6 ± 0.2 <sup>c</sup>	98.7 ± 0.18 <sup>c</sup>	99.1 ± 0.11 <sup>a</sup>	99.3 ± 0.11 <sup>a</sup>
751-745	99.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	98.3 ± 0.14 <sup>b</sup>	98.5 ± 0.13 <sup>b</sup>	99.5 ± 0.11 <sup>a</sup>
751-749	99 ± 0.15 <sup>b</sup>	98.6 ± 0.15 <sup>a</sup>	98.1 ± 0.14 <sup>c</sup>	97.8 ± 0.45 <sup>b</sup>
752c-745	99.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	97.8 ± 0.28 <sup>c</sup>	98.5 ± 0.09 <sup>b</sup>	97.6 ± 0.22 <sup>b</sup>
Testigo	0 ± ND <sup>d</sup>	0 ± ND <sup>d</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>

Las medias con letras diferentes (a-d) para cada hongo son significativamente diferentes.  $p < 0.0001$



Figura 27. Cambios al desarrollo micelial, por la actividad antagónica del consorcio entre *V. paradoxus*-*P. mediterranea* (752c-745) en *F. oxysporum* (Fox B). Estructuras obtenidas con PBS del ensayo de inhibición en placa de PDA. Las flechas indican la formación de tumores en las hifas de *F. oxysporum*.



Figura 28. Formación de tumores en *F. incarnatum* (F132) ocasionados por la actividad antagónica del consorcio formado entre *P. antophila*-*P. mediterranea*. Estructuras obtenidas con PBS del ensayo de inhibición en placa de PDA.



Figura 29. Ensanchamiento de conidio ocasionado por el consorcio *P. mediterranea*-*P. antophila* (751-749). Estructuras obtenidas con PBS del ensayo de inhibición en placa de PDA.

#### 5.7 Ensayo dual entre los consorcios, y *Fusarium* sp.

En los ensayos de doble cultivo en placa de PDA, los consorcios bacterianos al estar presentes en un mismo sistema son capaces de difundir metabolitos secundarios, enzimas, proteínas al medio de cultivo, de igual manera es importante mencionar la posible presencia de compuesto volátiles orgánicos (CVOs), con respecto a los ensayos anteriores aquí el micelio del hongo no estuvo en contacto directo con una placa impregnada de metabolitos, sino que con el transcurrir del tiempo las bacterias iban segregando dichos compuestos (Giorgio et al., 2015). Aunque con diferente eficacia, todos los tratamientos resultaron inhibir a todas las cepas de *Fusarium* sp.

En general, los consorcios formados de *P. mediterranea* y *P. antophila* (751-745) resultaron más activos en la inhibición del crecimiento de los hongos, mientras que el consorcio formado por *V. paradoxus* y *P. mediterranea* (752c-745) fue el menos efectivo. Además, la cepa de *F. oxysporum* (FC3) resultó ser la menos sensible a los metabolitos difundidos al medio, siendo *F. equiseti* fue la más sensible a las sustancias mencionadas. Se observó una actividad antifúngica menor con respecto a los ensayos de inhibición en placa.

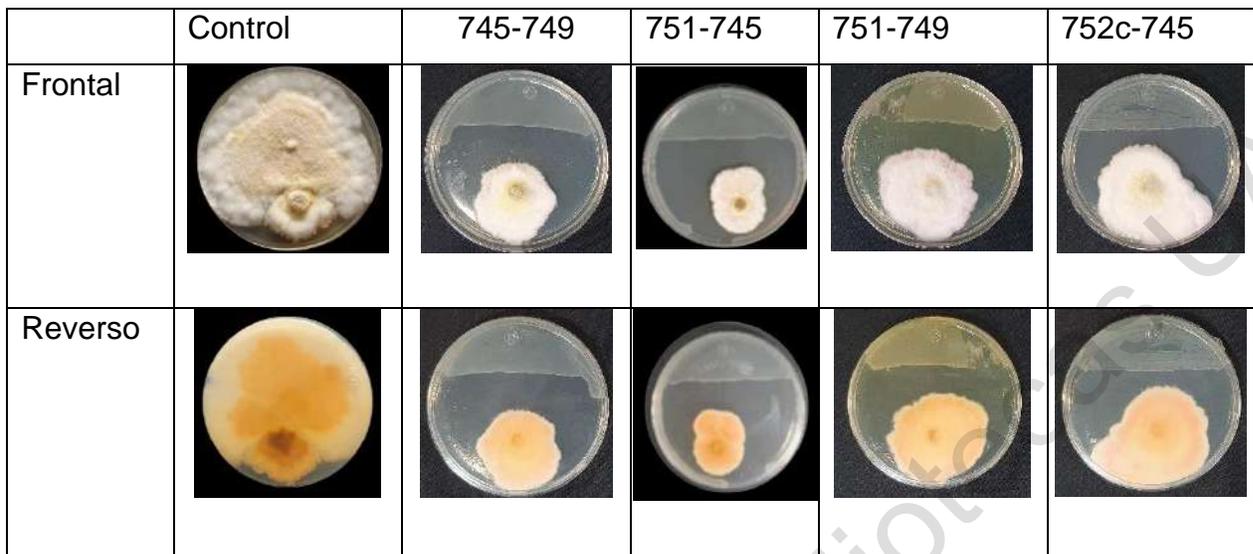


Figura 30. Antagonismo por la difusión de metabolitos bacterianos al medio de cultivo por la presencia de los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. equiseti* (F70). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre la sección superior de la placa de PDA, en la sección libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

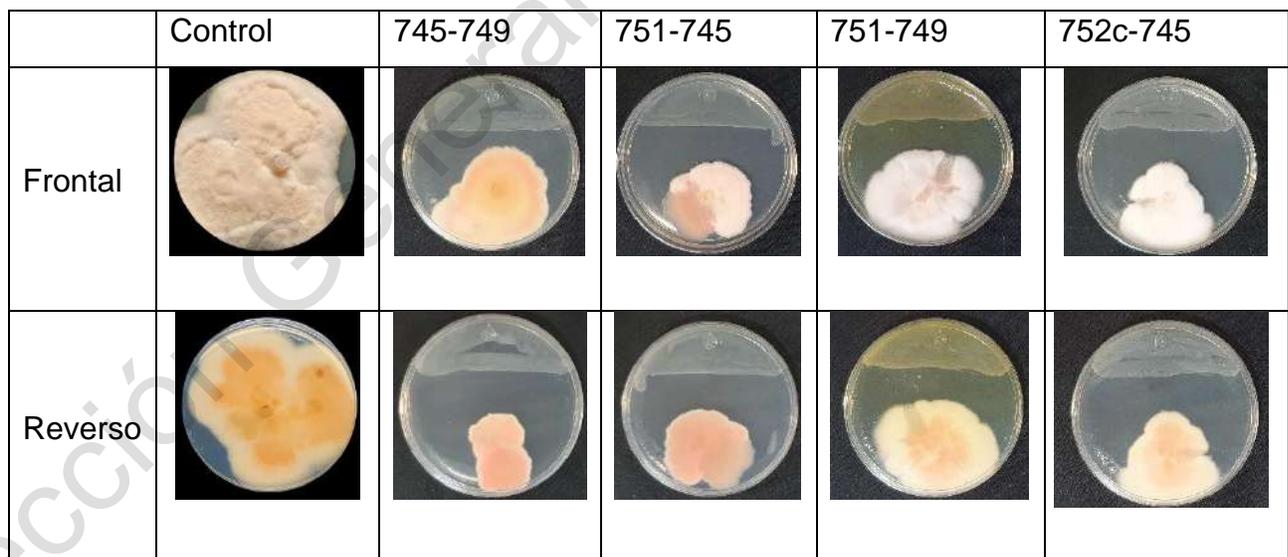


Figura 31. Antagonismo por la difusión de metabolitos bacterianos al medio de cultivo por la presencia de los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. incarnatum* (F132). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a

28 °C por 48 h sobre la sección superior de la placa de PDA, en la sección libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

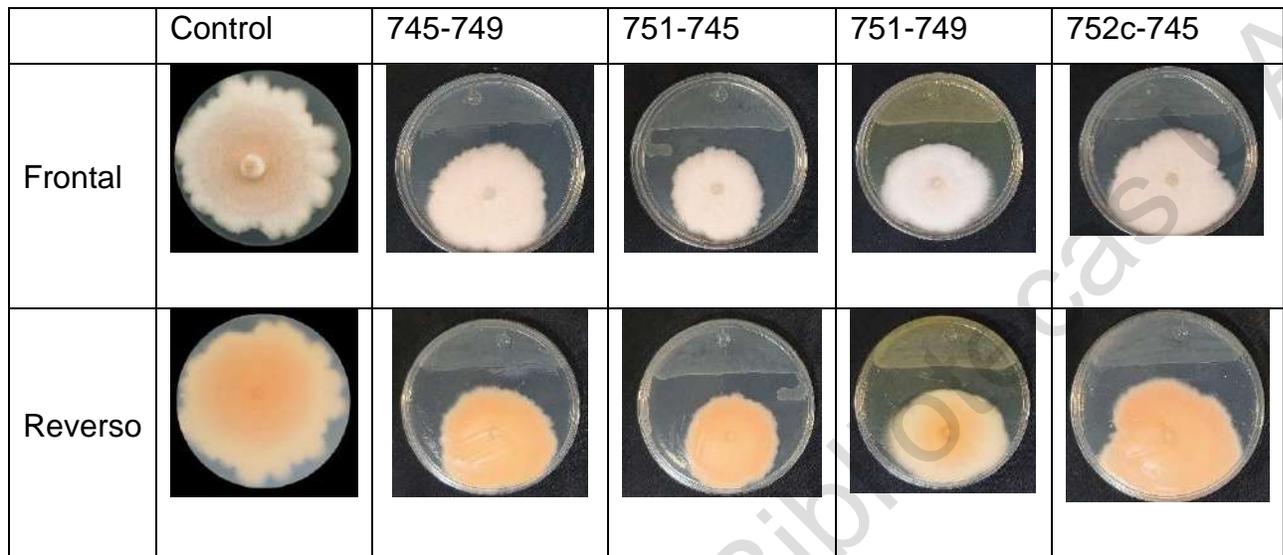


Figura 32. Antagonismo por la difusión de metabolitos bacterianos al medio de cultivo por la presencia de los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. oxysporum* (Fox B). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre la sección superior de la placa de PDA, en la sección libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

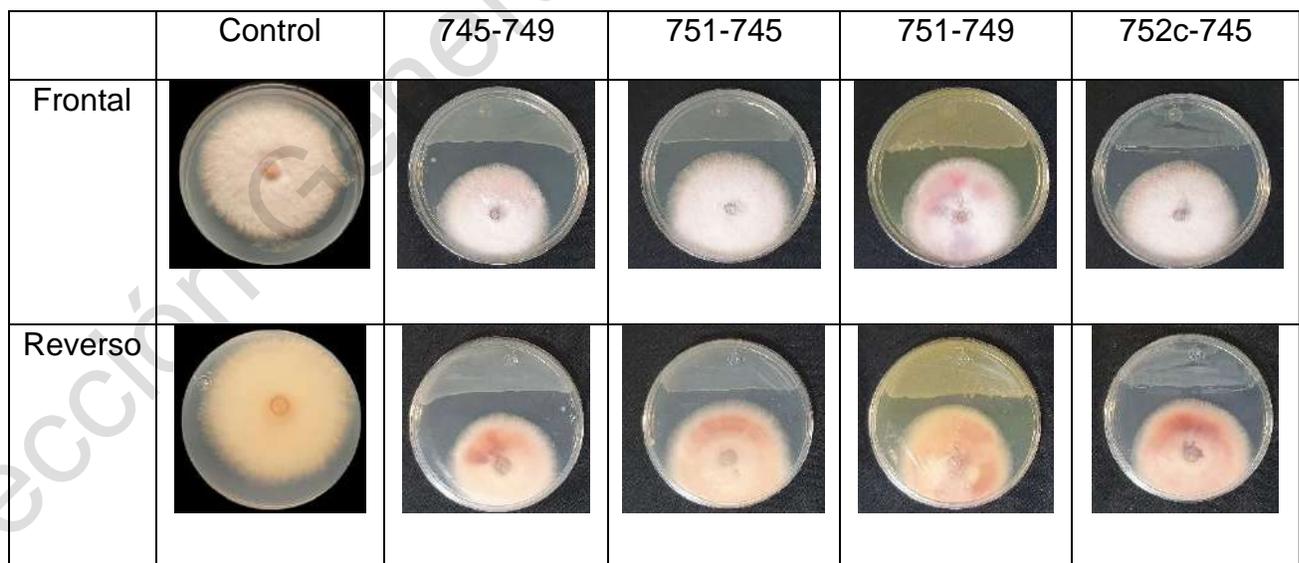


Figura 33. Antagonismo por la difusión de metabolitos bacterianos al medio de cultivo por la presencia de los consorcios *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) contra *F. oxysporum* (FC3). Se

muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 48 h sobre la sección superior de la placa de PDA, en la sección libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. en un ensayo dual entre ambos microorganismos.

	<b>F70</b>	<b>F132</b>	<b>Fox B</b>	<b>FC3</b>
	<b><i>F. equiseti</i></b>	<b><i>F. incarnatum</i></b>	<b><i>F. oxysporum</i></b>	<b><i>F. oxysporum</i></b>
Tratamiento	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
745-749	67 ± 1.7 <sup>a</sup>	34 ± 1.7 <sup>b</sup>	38 ± 1.7 <sup>c</sup>	25 ± 2.2 <sup>b</sup>
751-745	65 ± 2.3 <sup>ab</sup>	33 ± 1.7 <sup>b</sup>	40 ± 1.3 <sup>a</sup>	23 ± 1.7 <sup>b</sup>
751-749	63 ± 1.3 <sup>b</sup>	35 ± 1.7 <sup>b</sup>	41 ± 2.2 <sup>a</sup>	48 ± 1.3 <sup>a</sup>
752c-745	67 ± 1.7 <sup>a</sup>	46 ± 1.1 <sup>a</sup>	46 ± 1.7 <sup>a</sup>	24 ± 1.7 <sup>b</sup>
Testigo	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>d</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>

Las medias con letras diferentes (a-d) para cada hongo son significativamente diferentes.  $p < 0.0001$

#### 5.8 Efecto de los compuestos volátiles en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp.

Recientemente se ha demostrado que los COVs de las bacterias del suelo pueden influir también en el crecimiento de los hongos fitopatógenos (Giorgio et al., 2015). Los COVs son generalmente sustancias lipofílicas con alta presión de vapor que atraviesan libremente las membranas biológicas y se liberan en la atmósfera o en el suelo. No existió inhibición estadísticamente diferente por parte de los COVs provenientes de los consorcios bacterianos en contra de *Fusarium* sp., aunque sí determinaron un cambio significativo en la pigmentación de los micelios de las 4 especies de *Fusarium* sp. (Fig. 33-36). Como se observa en la Fig. 33 los COVs indujeron a que *F. equiseti* (F70) cambió una tonalidad blanca con textura algodonosa a una tonalidad rosada e intensa en el reverso de la placa, inclusive se logra apreciar una inhibición por parte del consorcio 752c-745.

Para *F. incarnatum* (F70) (Fig. 34) sucedió algo similar con respecto a *F. incarnatum*, la tonalidad de cada uno de los tratamientos cambio, de ser blanca a rosada, pero aquí se logró apreciar que no existió como tal un crecimiento uniforme,

inclusively se logran apreciar zonas en donde se aprecia crecimiento, pero sin micelio. Para *F. oxysporum* (Fox B) (Fig. 35), en los tratamientos 751-749, y 752c-745 se logra apreciar un cambio de tonalidad, en este caso paso de ser rosado a blanco, también se logra apreciar una pequeña disminución en el crecimiento con respecto al control. Los efectos de los COVs en *F. oxysporum* no ocasiono daños significativos en el crecimiento micelial, solamente se observó que los consorcios *P. mediterranea*-*P. antophila* y *V. paradoxus*-*P. mediterranea* provocaron un cambio en la pigmentación del micelio pasando de una tonalidad morada tenue a un micelio blanco algodonoso (Fig. 36).

Los COVs que se han identificado provenientes de *Pseudomonas brassicacearum*; *Bacillus megaterium*, y *Pseudomonas putida*. son: ácido acético, m-cimeno, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, dl-limoneno, 2-nonanona, 2-propanona, 1-tetradecanol, y 2-undecanona 1-undeceno (Giorgio et al., 2015). Otros compuestos volátiles como lo son el HCN, y el amoníaco poseen una actividad de biocontrol; los cuales pueden funcionar suprimiendo enfermedades de las plantas. Se conoce que *Pseudomonas*, llega a producir ambos compuestos. Esto sugiere un rol del HCN está en el aumento de la disponibilidad de fosfato en las plantas, siendo considerado este como un mecanismo para promover el crecimiento de las plantas (Fan D, Smith DL. 2021), aunque como tal no se observó reducción del crecimiento del hongo, una vez utilizado este consorcio en suelo, es factible considerar que pueda promover cambios en la planta con el fin de mejorar su crecimiento (Perczak et al., 2020).

	Control	745-749	751-745	751-749	752c-745
Frontal					

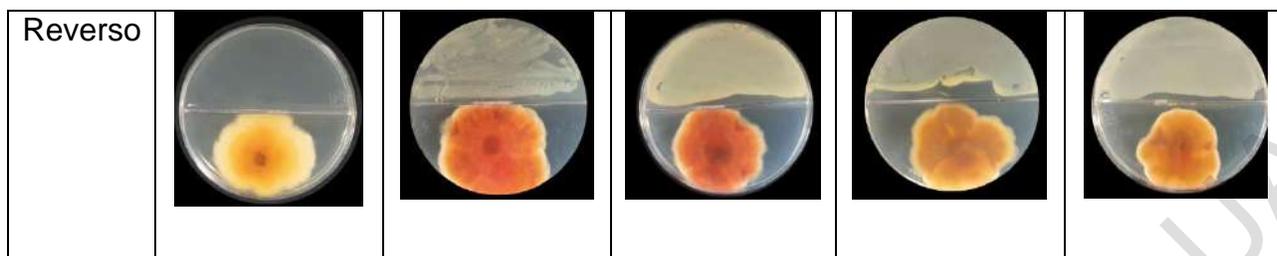


Figura 34. Efecto de los compuestos volátiles provenientes de los consorcios bacterianos *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) en contra de *F. equiseti* (F70). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 24 h sobre una de las 2 secciones de la placa de PDA, en la sección que quedó libre se inoculó con micelio del hongo correspondiente. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

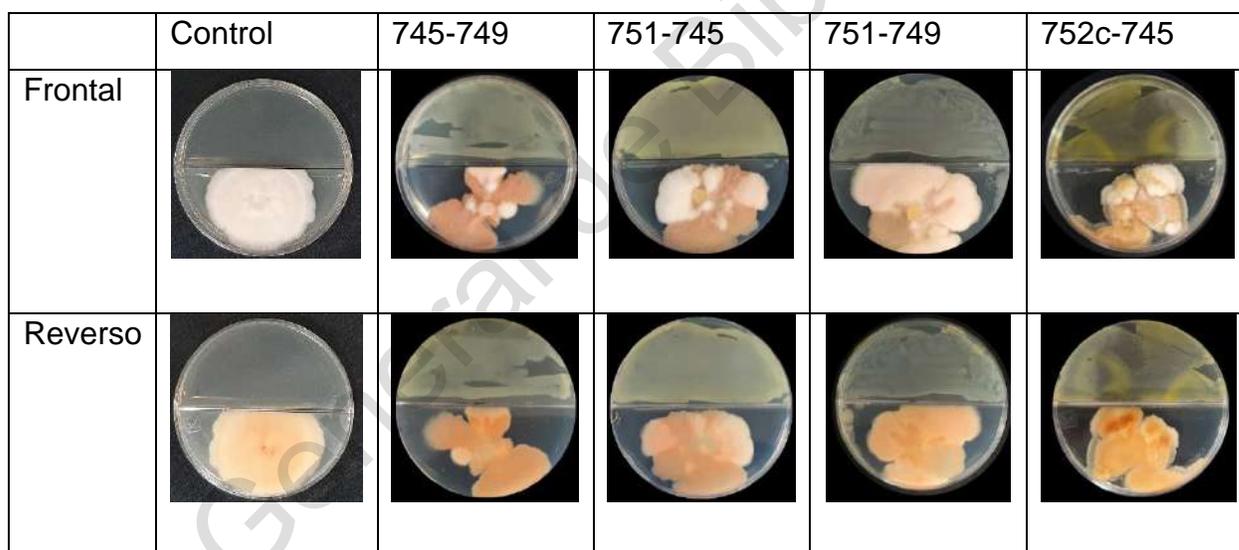


Figura 35. Efecto de los compuestos volátiles provenientes de los consorcios bacterianos *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) en contra de *F. incarnatum* (F132). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 24 h sobre una de las 2 secciones de la placa de PDA, en la sección que quedó libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

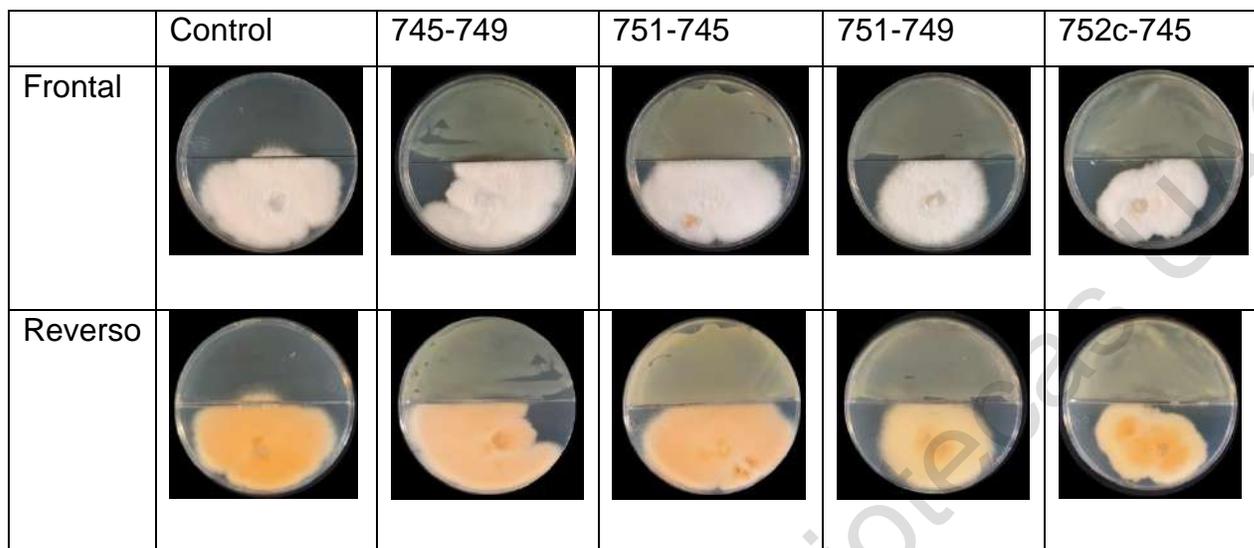


Figura 36. Efecto de los compuestos volátiles provenientes de los consorcios bacterianos *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) en contra de *F. oxysporum* (Fox B). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 24 h sobre una de las 2 secciones de la placa de PDA, en la sección que quedó libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

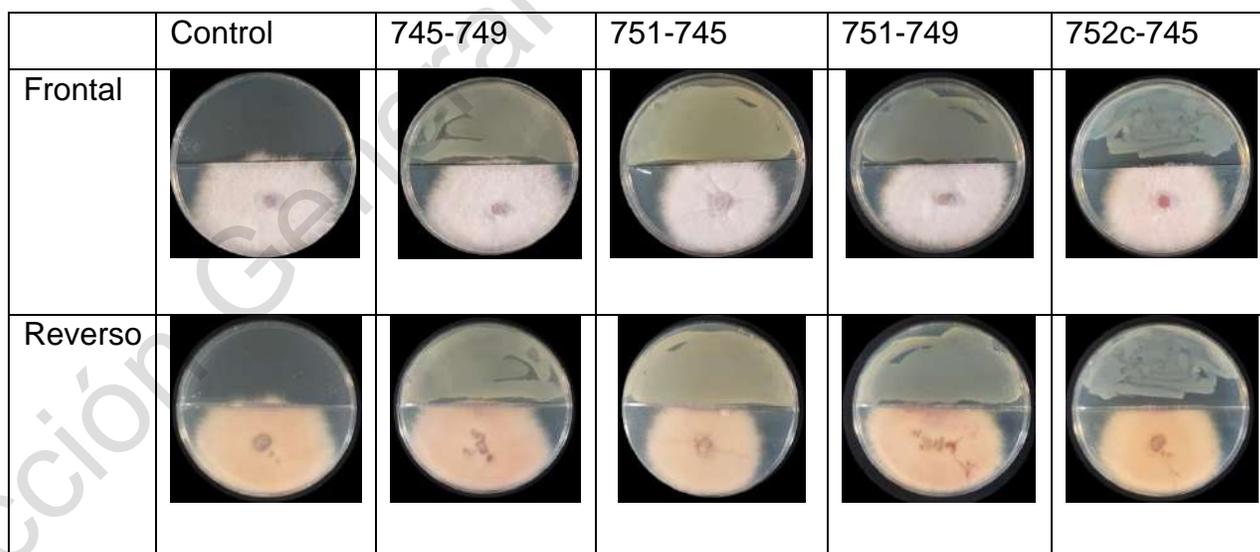


Figura 37. Efecto de los compuestos volátiles provenientes de los consorcios bacterianos *P. mediterranea*- *P. mediterranea* (745-749), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-745), *P. antophila*- *P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*- *P. mediterranea* (752c-745) en contra de *F. oxysporum* (FC3). Se muestra la imagen frontal y el reverso de la caja Petri. Los consorcios se crecieron a 28 °C por 24 h

sobre una de las 2 secciones de la placa de PDA, en la sección que quedó libre se inoculó con micelio. Como control se sembró al hongo en una caja de PDA.

#### 5.9 Inhibición de la producción de biomasa en cultivo sumergido de *Fusarium* sp efecto de extracto libre de células de los consorcios bacterianos.

Se descubrió que el sobrenadante libre de células derivado de los cultivos de los consorcios bacterianos entre *Pantoea dispersa*- *P. agglomerans* mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento de diversas cepas de *Fusarium* sp y *Ceratocystis fimbriata* (Jiang et al., 2019). Durante el crecimiento de los consorcios bacterianos en medio líquido, es factible que se secreten al medio de cultivo diversos metabolitos las bacterias, los cuales podrían tener un efecto en el crecimiento de *Fusarium* sp. en cultivo sumergido (Izquierdo-García et al., 2020). Es por ello por lo que preparamos un medio mínimo de cultivo para *Fusarium* en el cual se adicionó el extracto libre de células obtenido del crecimiento del consorcio en medio PDB por 48 h, en el cual podrían existir diversos metabolitos con actividad antifúngica. Posterior a incubar al hongo en dicho medio durante 4 días y analizar el peso de la biomasa producida, se logró observar de manera visual un claro efecto de inhibición en medio líquido en los matraces de reacción (Fig. 38).



Figura 38. Crecimiento de *F. equiseti* en cultivo sumergido posterior a 48 h de incubación en medio mínimo suplementado con el extracto libre de células de los consorcios bacterianos. De izquierda a derecha: Control, extracto libre de células de *E. coli*, *P. mediterranea*-*P. mediterranea*, *P. antophila*-*P. mediterranea*, *P. antophila*-*P. mediterranea*, *V. paradoxus*-*P. mediterranea*.

*F. equiseti* fue la cepa más afectada por los 4 tratamientos, los consorcios *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-749) y *V. paradoxus*-*P. mediterranea* mostraron una inhibición del 93% cada uno, *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745) alcanzó una inhibición del 91%, siendo el consorcio formado por las 2 cepas de *P. mediterranea*

la menos eficiente con un 87% de inhibición (Tabla 10). *F. incarnatum* fue el hongo más resistente en la producción de biomasa con respecto a los demás. El consorcio formado por *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745) resultó ser el más efectivo con un 89% de eficiencia al momento de inhibir el crecimiento, los otros 3 tratamientos inhibieron el 84% la producción de biomasa (Tabla 10). En el caso de *F. oxysporum* (Fox B) los consorcios entre *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745, 751-749) la inhibición de la producción de biomasa alcanzó un 90% para ambos tratamientos, seguido del consorcio entre *V. paradoxus*-*P. mediterranea* en donde se logró alcanzar un 89% de inhibición en la producción de biomasa, siendo el consorcio entre las 2 cepas de *P. mediterranea* el menos efectivo logrando solamente un 87% en la inhibición de la producción de biomasa (Tabla 10). FC3, fue la muestra más susceptible al extracto libre de células por parte del sobrenadante correspondiente al consorcio (752c-745) en donde se logró una inhibición del 92%. Para los tratamientos entre *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745, 751-749) el % de inhibición de la producción de biomasa alcanzo un 90%, dejando así al consorcio formado por las 2 cepas de *P. mediterranea* con un 91% de inhibición (Tabla 10). Por otro lado, el sobrenadante proveniente de *P. mediterranea* (745-749), fue el menos eficaz con respecto a los demás, solo en el caso de FC3 supero el 90% de inhibición (Tabla 9).

Izquierdo-García, 2020 ha estudiado los efectos de antagonismo en contra de diversos agentes fitopatógenos de los extractos libres de células de diversos consorcios como lo son: *Bacillus subtilis* y *Rhizobium tropici* para reducción de las enfermedades causadas por *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, el uso de *Trichoderma harzianum* y *Gliocladium catenulatum* para controlar *Phytophthora cactorum* en la fresa; la disminución de la mortalidad de las plantas de guisantes debido a *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando un consorcio de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp; la combinación de *B. subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* contra *F. solani* en pimiento; la reducción de la incidencia de la enfermedad causada por *Rhizoctonia bataticola* en algodón utilizando un consorcio de *Azospirillum* sp. y *P. fluorescens*; y la combinación de *T. harzianum* y *Pseudomonas* sp. contra *F. oxysporum* en pepino (Izquierdo-García et al., 2020).

Tabla 11. Porcentaje de inhibición en cultivo sumergido de *Fusarium* sp. por el extracto libre de células de los consorcios bacterianos.

	<b>F70</b>	<b>F132</b>	<b>Fox B</b>	<b>FC3</b>
	<b><i>F. equiseti</i></b>	<b><i>F. incarnatum</i></b>	<b><i>F. oxysporum</i></b>	<b><i>F. oxysporum</i></b>
Tratamiento	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)	Inhibición (%)
45-749	88 ± 2.8 <sup>a</sup>	84 ± 2.5 <sup>a</sup>	87.5 ± 1.6 <sup>b</sup>	91 ± 0.5 <sup>b</sup>
751-745	91 ± 1.6 <sup>a</sup>	89 ± 0.5 <sup>a</sup>	90 ± 1.7 <sup>a</sup>	90 ± 0.1 <sup>a</sup>
751-749	93 ± 0.9 <sup>a</sup>	84 ± 4.9 <sup>a</sup>	90 ± 0.48 <sup>a</sup>	90 ± 0.5 <sup>c</sup>
752c-745	93 ± 1.4 <sup>a</sup>	84 ± 0.2 <sup>a</sup>	89.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	92 ± 0.6 <sup>c</sup>
Testigo	0 ± ND <sup>b</sup>	0 ± ND <sup>b</sup>	0 ± ND <sup>c</sup>	0 ± ND <sup>d</sup>

Las medias con letras diferentes (a-d) para cada hongo son significativamente diferentes.

#### 5.10 Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos extraídos de los consorcios bacterianos contra *Fusarium* sp.

Los estudios basados en la extracción de metabolitos secundarios han revelado que incluso una sola cepa bacteriana puede producir una amplia gama de metabolitos secundarios codificados por grupos de genes crípticos que no se transcriben en condiciones in vitro. Los metabolitos secundarios no intervienen directamente en el crecimiento, el desarrollo o la reproducción de la bacterias como tal, pero desempeñan importantes funciones ecológicas en las interacciones con otros organismos (Tyc et al., 2016, Slama et al., 2019). Estas moléculas actúan en distancias más cortas, pero suelen presentar actividades biológicas más fuertes como toxinas o antibióticos debido a su alto grado de funcionalización.

Se obtuvieron los metabolitos producidos de los 4 consorcios utilizando tres solventes de diferente polaridad como lo son: acetato de etilo, mezcla metanol-cloroformo, hexano. Finalmente, los metabolitos recuperados con los solventes mencionados se suspendieron en metanol. Los conidios fueron tratados con la cantidad indicada de metabolitos y se incubaron por 8 h a 28 °C. Posteriormente se depositaron en una caja de PDA como se indica en la Fig. 39 y se incubaron durante 96 h a 28 °C. Observamos que los 4 tipos de metabolitos fueron efectivos al impedir la germinación de conidios de los 4 hongos utilizados.

En el caso de *F. equiseti* (F70) fue la especie más susceptible al efecto de los metabolitos, en todos los tratamientos aplicados (metabolitos extraídos con: acetato de etilo, metanol-cloroformo, hexano), 6 mg de cada mezcla de compuestos fue suficiente para impedir la germinación de los conidios, hubo casos en donde algunos conidios tratados incluso con 3 mg fueron susceptibles imposibilitando su germinación, aunque en menor proporción en comparación al control (conidios tratados con metanol) (Fig. 40).

Para *F. incarnatum* (F132) la cantidad de 12 mg de los metabolitos extraídos con acetato de etilo y la mezcla de metanol-cloroformo fue suficiente para impedir la germinación de los conidios, para los metabolitos extraídos con hexano se encontró que con 6 mg ya hubo un impedimento en la germinación de los conidios (Fig. 41). La muestra *F. oxysporum* (Fox B) mostró un impedimento en la germinación de los conidios con 12 mg de los metabolitos provenientes de la extracción con acetato de etilo, y la mezcla metanol-cloroformo. Siendo de igual manera 6 mg suficientes de los metabolitos no polares para impedir la germinación de los conidios (Fig. 42). Para *F. oxysporum* (FC3) solamente se requirieron 3 mg de los metabolitos no polares (hexano) para inhibir la germinación de los conidios, sin embargo 6 mg bastaron con los compuestos más polares para inhibir la germinación de los conidios de igual forma (Fig. 43). Siendo esta especie la segunda más susceptible después de *F. equiseti*.

El gran efecto inhibitorio observado, puede atribuirse a que estos tienen una función antifúngica, y la respuesta diferencial está relacionada con la polaridad de los solventes utilizados. Con la evidencia obtenida se puede conjeturar que la capacidad de antagonismo no proviene solamente de la producción de enzimas líticas, VOCs, proteínas, sino que también en la producción de metabolitos secundarios capaces de dañar la estructura superficial de los conidios realizando perforaciones inhabilitando su germinación. En este caso el extracto obtenido con hexano que es el solvente menor polar fue el que mostró una mayor actividad antifúngica.

Se sabe que las PGPR tienen diversos mecanismos de acción para controlar a los agentes fitopatógenos presentes en el suelo, para el género *Pseudomonas* los mecanismos propuestos son: la producción de sideróforos que, al secuestrar el hierro, quedaría no disponible para los fitopatógenos y la producción de distintos antibióticos, como el 2,4-diacetilfluoroglucinol, la pyoluteorina, la pyrrolnitrina, tetraciclina ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ), e Indole-3-carbaldehído el cual inhibe el apareamiento sexual de los hongos y su crecimiento. que son capaces de suprimir el crecimiento de hongos patógenos en cultivos agrícolas. *Pseudomonas putida* produce un compuesto llamado putidacina, el cual inhibe el crecimiento de patógenos en planta. *V. paradoxus* produce 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC) deaminasa, así como sideróforos. (Jiang et al., 2019, Tyc et al., 2016, Gao et al., 2020).



Figura 39. Distribución de los metabolitos secundarios extraídos de los consorcios bacterianos aplicados a conidios de *Fusarium*. El punto 0 mg corresponde al control en el que los conidios fueron tratados solamente con metanol.

	745-749	751-745	751-749	752c-745
Acetato de etilo				
Metanol-Cloroformo				
Hexano				

Figura 40. Actividad antifúngica de los metabolitos en contra *F. equiseti* (F70). Los metabolitos se ajustaron a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L, de ahí se tomaron las cantidades necesarias y se adicionaron a un mix en donde habían 2500 conidias, se incubaron por 8 h a 28 °C.

	745-749	751-745	751-749	752c-745
Acetato de etilo				
Metanol-Cloroformo				
Hexano				

Figura 41. Actividad antifúngica de los metabolitos en contra *F. incarnatum* (F132). Los metabolitos se ajustaron a una concentración de  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , de ahí se tomaron las cantidades necesarias y se adicionaron a un mix en donde habían 2500 conidias, se incubaron por 8 h a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

	745-749	751-745	751-749	752c-745
Acetato de etilo				
Metanol-Cloroformo				
Hexano				

Figura 42. Actividad antifúngica de los metabolitos en contra de *F. oxysporum* (Fox B). Los metabolitos se ajustaron a una concentración de  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , de ahí se tomaron las cantidades necesarias y se adicionaron a un mix en donde habían 2500 conidias, se incubaron por 8 h a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$

	745-749	751-745	751-749	752c-745
Acetato de etilo				

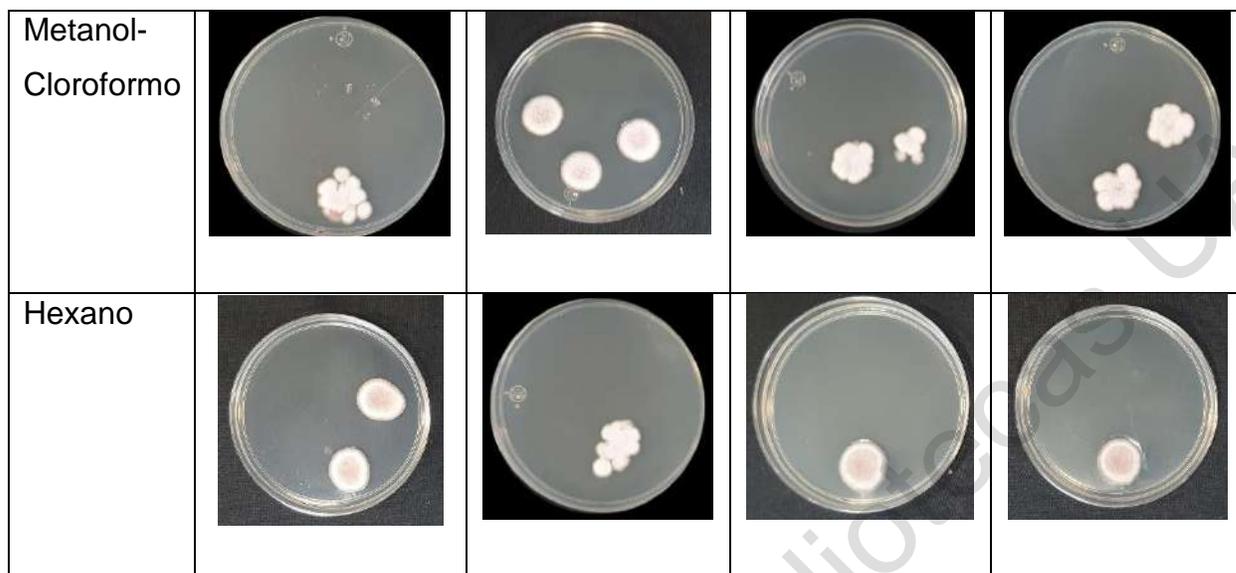


Figura 43. Actividad antifúngica de los metabolitos en contra de *F. oxysporum* (FC3). Los metabolitos se ajustaron a una concentración de  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , de ahí se tomaron las cantidades necesarias y se adicionaron a un mix en donde habían 2500 conidias, se incubaron por 8 h a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 5.11 Observación de los conidios tratadas con los metabolitos obtenidos con azul de tripano

La tinción con azul de tripano permite distinguir entre las células no viables de las viables. Su fundamento consiste en que las células vivas, con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio penetra en las células muertas con lesión de la membrana celular lo que hace que se tiñan de color azul.

La tinción se realizó posterior al tratamiento de los conidios con los respectivos metabolitos de cada una de las extracciones. Los resultados del bioensayo mostraron que a una concentración final menor a  $6 \text{ mg}/\mu\text{L}$  no tenía ningún efecto sobre la germinación de los conidios, a la concentración mayor a  $6 \text{ mg}/\mu\text{L}$  la germinación de los conidios se afectó. Como se observa en la figura 44 (A), los conidios que no captan el colorante son las que tienen intacta su membrana (vivas); las que se tiñen de azul (Fig. 44 B) son las que tienen la membrana dañada (muertas). Esto nos da una idea que en el extracto existen moléculas capaces de degradar la membrana celular de los conidios, dichas moléculas pueden ser algún tipo de surfactantes.

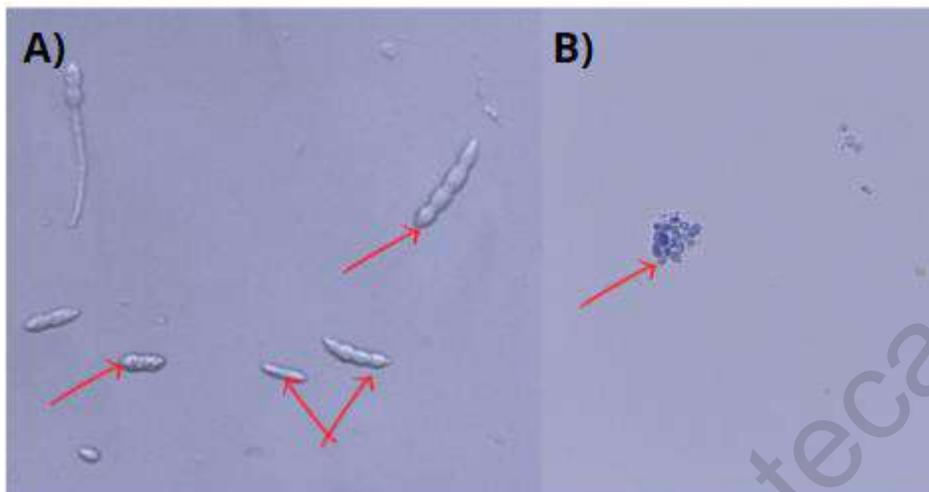


Figura 44. Tinción de conidios con azul de tripano posterior al tratamiento con los metabolitos extraídos del consorcio entre *V. paradoxus*-*P. mediterranea*. Se tomaron 10  $\mu$ L de la reacción + 20  $\mu$ L de azul de tripano, se incubaron por 5 min. Se observaron al microscopio Leica objetivo 100X. A) Conidios de *F. oxysporum* (Fox B) sin daño. B) Conidios de *F. oxysporum* (Fox B) expuestos a 12  $\mu$ g de los metabolitos.

#### 5.12 Efecto de los consorcios bacterianos en la promoción del crecimiento en planta de pimiento (*C. annuum*).

Considerando la caracterización bioquímica de los consorcios, sabemos que estos presentan características de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, como son: Producción y síntesis de sideróforos, solubilización de fosforo, síntesis de fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas), producción de ácido indolacético, producción de antibióticos, reducción de hierro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) (Syed-ab-rahman et al., 2019).

Es por ello por lo que determinamos su capacidad de promover el crecimiento vegetal en la planta de pimiento durante los primeros 40 días de crecimiento. Observamos que por acción de los consorcios bacterianos las plantas mostraron un incremento en el tamaño de la raíz lo cual se ve reflejado en el peso fresco de cada uno de los tratamientos (Gráfica 1), en este caso los consorcios más efectivos para la promoción del sistema radicular fueron el 745-749 el cual está conformado entre las 2 especies de *P. mediterranea* y el consorcio 752c-745 *V. paradoxus*-*P. mediterranea* en ambos tratamiento es sistema radicular se logró observar un crecimiento más voluminoso con una gran cantidad de raíces secundarias y pelos absorbentes en ella (Fig. 45) , este tipo de crecimiento favorece una mayor captación

de nutrientes y agua del suelo, en los otros 2 tratamientos la raíz tuvo un crecimiento más elongado con respecto a los demás siendo favorable este crecimiento para suelos un poco más compactos, ya que permite que la raíz pueda ir a través del suelo en busca de nutrientes o agua (Fig. 46). El tratamiento 745-749 conformado por las 2 especies de *P. mediterranea* mostró la única diferencia significativa con respecto a los otros 3 tratamientos realizados exceptuando el control, teniendo una media de crecimiento radicular de 14.58 cm (Gráfica 2). Un punto por resaltar fue que las semillas inoculadas con los consorcios bacterianos germinaron 24 h antes que los controles.

La mayor promoción del crecimiento vegetal de las plantas inoculadas fue con el consorcio entre *P. antophila*-*P. mediterranea* (751-745) donde se apreció un claro alargamiento del tallo con respecto a los demás tratamientos, el número de hojas que fue mayor dando, lo cual se podría manifestar en la planta con una mayor tasa fotosintética a las plantas, como previamente se ha mostrado (Natsagdorj et al., 2019). Este efecto puede estar relacionado con a la producción de AIA, debido a que es el principal metabolito que induce el crecimiento de las plantas al aumentar la división celular en las raíces y la diferenciación de tejidos (de Jesús-Ramos et al., 2020). En concentraciones altas de AIA producida por bacterias, pueden llegar a perturbar el crecimiento vegetal, tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* que produce hasta  $78 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  de AIA, provocando la enfermedad conocida como "agalla de la corona" que se caracteriza por tumores en raíces, tallos y ramas de diversas especies (Kumar et al., 2018) (Sarma et al., 2015). Se ha encontrado que bajas concentraciones de etileno promueven el crecimiento de los pelos radicales de las plantas inoculadas, y así aumentan el área superficial de la raíz para una mayor absorción de nutrientes. Este consorcio fue el único que mostró diferencias estadísticas con respecto a todos los tratamientos teniendo una media de crecimiento del tallo de 19 cm mientras que el control solamente alcanzo una media de crecimiento de 10 cm (Gráfica 1).

Con los datos obtenidos del tamaño de la raíz y tallo se decidió conocer el peso fresco de las plantas para saber si existían diferencias de crecimiento entre las

plantas que poseían un mayor tamaño del tallo con respecto a las plantas que poseían un sistema radicular voluminoso y saber cómo los consorcios afectan de diversas maneras el crecimiento de las plantas. Los datos obtenidos del peso fresco mostraron que el consorcio entre *V. paradoxus*-*P. mediterranea* fue el más eficaz, promoviendo a su vez un sistema radicular voluminoso el cual favorece indirectamente al ataque de agentes patógenos en el suelo y un crecimiento vegetal considerable con respecto al control. Seguido del consorcio 751-745 *P. antophila*-*P. mediterranea* el cual se vio favorecido por su gran desarrollo en la parte superior de la planta, aun así, su sistema radicular, aunque no fue de gran volumen sí era extenso teniendo otro factor de importancia (Gráfica 3).

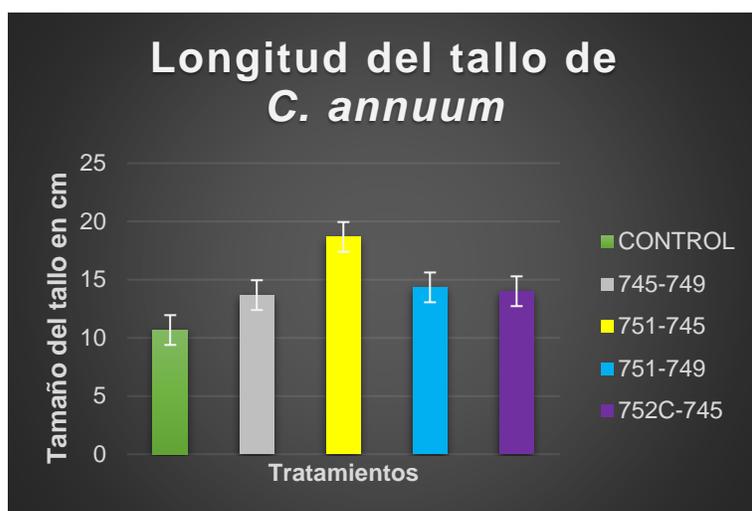
El género *Variovorax* promueve el crecimiento de las plantas debido a la producción de 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa. Esta enzima inhibe la producción de la hormona etileno por parte del huésped y facilita el crecimiento de las plantas bajo estrés biótico y abiótico (Gao et al., 2020). Los géneros bacterianos con mayor potencial de uso son *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y asimilación directa de fosfatos insolubles, lo que está relacionado con la fuente de fósforo disponible. La especie *Pseudomonas fluorescens* se caracteriza por la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento. Las principales sustancias de este tipo son hormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas). Además, también producen aminoácidos y promotores específicos del crecimiento vegetal. La producción de estas sustancias es posible siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y que en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica. La elaboración de inoculantes a partir de estas bacterias permitiría reducir a largo plazo el uso de productos químicos en la agricultura, así como desarrollar estrategias agronómicas que preserven el medio ambiente (Pandey & Gupta, 2020).



Figura 45. Promoción del crecimiento vegetal en *C. annuum* a los 40 días de crecimiento inoculadas con 1 mL del consorcio bacteriano una vez por semana.

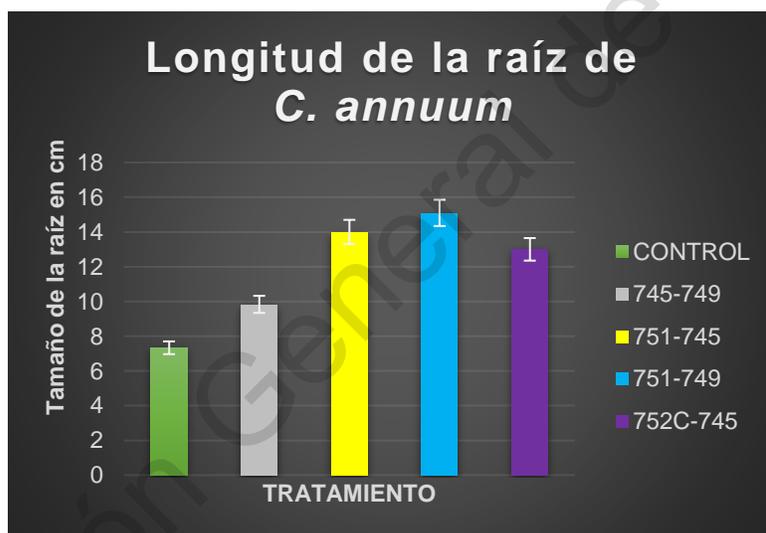


Figura 46. Efecto en la zona radicular de *C. annuum* a los 40 días de crecimiento inoculadas con 1 mL del consorcio bacteriano una vez por semana.



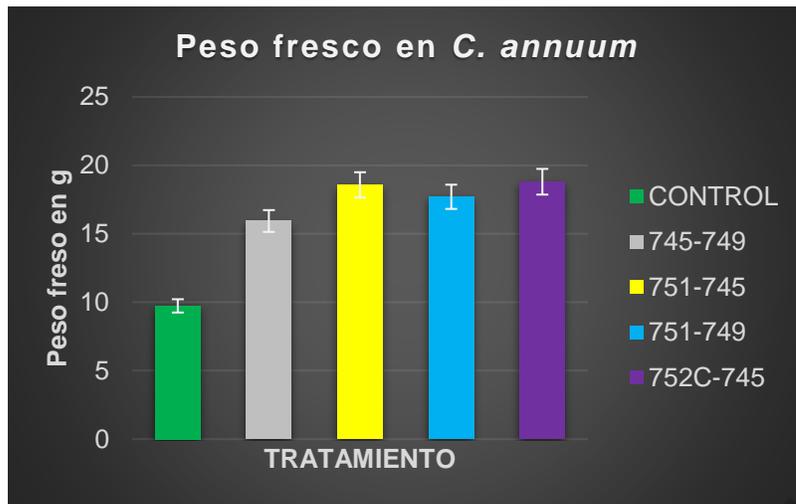
Tratamiento	
751-745	19.02±0.928 <sup>a</sup>
751-749	14.92±0.729 <sup>b</sup>
745-749	14.42±0.58 <sup>b</sup>
752c-745	14.36±0.58 <sup>b</sup>
CONTROL	10.40±0.652 <sup>c</sup>

Grafica 1. Se muestra los efectos promotores del crecimiento en la longitud del tamaño del tallo de las plantas de Chile. Las barras representan los valores estadísticos  $\pm$ SD (n= 30). Las letras (a-c) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control.  $p < 0.005$



Tratamiento	
751-749	14.58±0.606 <sup>a</sup>
751-745	13.98±0.907 <sup>a</sup>
752c-45	13.66±0.493 <sup>a</sup>
745-749	9.28±0.20 <sup>b</sup>
CONTROL	6.4±0.23 <sup>c</sup>

Grafica 2. Se muestra los efectos promotores del crecimiento en la longitud del tamaño de la raíz de las plantas de Chile. Las barras representan los valores estadísticos  $\pm$ SD (n= 30). Las letras (a-c) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control.  $p < 0.005$



Tratamiento	
752c-745	18.84±0.245 <sup>a</sup>
751-745	18.6±0.394 <sup>a</sup>
751-749	17.66±0.467 <sup>b</sup>
745-749	15.74±0.464 <sup>c</sup>
CONTROL	19.52±0.415 <sup>d</sup>

Grafica 3. Se muestra los efectos promotores del crecimiento en el peso fresco de las plantas de chile. Las barras representan los valores estadísticos  $\pm$ SD (n= 30). Las letras (a-d) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control.  $p < 0.005$

Dirección General de Bibliotecas

## 6 CONCLUSIONES

Las bacterias *Pseudomonas mediterranea* (745), *Pseudomonas mediterranea* (749), *Pantoea antophila* (751) y *Variovorax paradoxus* (752c) aisladas de la rizosfera de plantas de fresas cultivadas bajo manejo orgánico, tienen capacidad antagonista *in vitro* contra diversas especies de *Fusarium*, como lo son *F. equiseti* (F70), *F. incarnatum* (F132), *F. oxysporum* (Fox B) y *F. oxysporum* (FC3). La formación de consorcios entre estas bacterias mostró una mayor actividad antagónica contra las especies de *Fusarium* analizadas, siendo el consorcio formado entre *Variovorax paradoxus*-*Pseudomonas mediterranea* el más efectivo en contra las 4 especies de hongos del género *Fusarium*.

Los metabolitos secundarios extraídos con hexano secretados por los consorcios bacterianos al crecer en caldo nutritivo mostraron una mayor capacidad de inhibir la germinación de los conidios de las diversas especies de *Fusarium*, siendo en la mayoría 6 µg lo suficiente para producir daños en la membrana de los conidios imposibilitando así su desarrollo.

Con todos los estudios realizados se comprueba que la mayoría de los mecanismos de acción de las bacterias en contra de agentes fitopatógenos como lo son los compuestos volátiles, producción de antibióticos, producción de sideróforos, moléculas surfactantes, producen daño en el desarrollo de *Fusarium* sp.

Algunas de las bacterias estudiadas mostraron características fisiológicas propias de actividad promotora de crecimiento (producción de AIA, la solubilización de fosfatos por medio de ácidos orgánicos) y la producción de sideróforos. Lo cual fue evidenciado en la estructura radicular y el desarrollo vegetativo de plantas de chile inoculadas con los diversos consorcios. En donde los consorcios *Pseudomonas mediterranea*-*Pseudomonas mediterranea* (745-749) y *Variovorax paradoxus*-*Pseudomonas mediterranea* (752c-745) mostraron un incremento en la zona radicular desarrollando una mayor cantidad de raíces secundarias y a su vez un incremento en la cantidad de pelos radiculares.

El uso de las bacterias como biofertilizante depende de su capacidad de supervivencia, competencia e interacción con otros microorganismos en el suelo, así como su capacidad para promover el crecimiento de las plantas. Es debido a esto que las pruebas de susceptibilidad a antibióticos concedieron una visión sobre la capacidad de resistencia a compuestos dañinos, como pudieran ser los residuos de diversos agroquímicos, a los cuales se enfrentarían en condiciones de campo.

Perspectivas:

Es importante realizar pruebas en campo, para analizar la interacción planta-suelo-microorganismos-ambiente-fitopatógenos, de esta manera se podrán diseñar estrategias para perfeccionar el desarrollo de un agente inoculante que estimule con mayor eficacia la productividad vegetal y a su vez otorgue una protección a la planta contra los agentes fitopatógenos, como lo sería el buscar la formación de un nuevo consorcio, puesto que sería conveniente incluir más especies bacterianas con el objetivo de tener varias formas de estimulación vegetal y protección antagónica.

Conocer más a fondo si las etapas fenológicas de las plantas se ven aceleradas por las bacterias pero que a su vez no estén generando algún daño en la planta, realizar un análisis de suelo antes y después para ver como éste está siendo afectado por las bacterias como puede ser la cantidad de materia orgánica, en la retención de nutrientes y agua, son otros aspectos para considerar en futuras investigaciones; así como realizar análisis bromatológicos a los frutos de las plantas de estudio para así conocer si el estado nutricional está siendo modificado e identificar a nivel molecular aquellos compuestos que son producidos ya sean como COVs, o secretados al medio de cultivo.

Conocer cómo es la protección de las bacterias a la planta en contra de *Fusarium* sp ya en cultivo. En la actualidad el empleo de agentes de control biológico ha tenido mayor relevancia en el mundo. Sin embargo, México un importante productor y exportador de alimentos para consumo humano y animal, continúa manteniendo su manejo de cultivos haciendo uso excesivo de diversos agroquímicos.

## 7 REFERENCIAS

- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: A synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.9>
- Alfredo, S., Luevanos-escareño, A., & Paulina, M. (2017). Revista de Investigación y Desarrollo Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos y su potencial para disolver fosfato tricálcico. *Marzo*, 3(7), 33–37. [www.ecorfan.org/spain](http://www.ecorfan.org/spain)
- Álvarez-García, J.-A., Santoyo, G., & Rocha-Granados, M. del C. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01–10. <https://doi.org/10.33154/rln.2020.01.01>
- Barrios-Roblero, C., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D., & Vázquez-Ovando, A. (2019). Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience*, 29(August 2018), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.008>
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Cabanás, C. G., Mercado-blanco, J., & Dita, M. (2019). *Biological Control Agents Against Fusarium Wilt of Banana*. 10(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>
- Cabanás, C. G., Legarda, G., Ruano-rosa, D., Pizarro-tobías, P., Valverde-corredor, A., Niqui, J. L., & Triviño, J. C. (2018). *Indigenous Pseudomonas spp . Strains from the Olive ( Olea europaea L .) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against Verticillium dahliae : From the Host Roots to the Bacterial Genomes*. 9(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00277>
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernández, V., De La Cruz-Enríquez, J., Castañeda-Antonio, M. D., & Muñoz-Rojas, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 140–154. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>
- Chaurasia, B., Pandey, A., Man, L., Palni, S., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. 160, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.013>
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y., & Zhang, L. (2017). *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep41564>
- Chen, J., Zhao, G., Wei, Y., Dong, Y., & Hou, L. (2021). Isolation and screening of multifunctional phosphate solubilizing bacteria and its growth - promoting effect

on Chinese fir seedlings. *Scientific Reports*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88635-4>

- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). *A review on the plant microbiome : Ecology , functions , and emerging trends in microbial application*. 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Corrales Ramírez, MSc, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- Correa Rivas, K. A., Bravo Torrealba, M. V., Silva Alvarado, R. A., & Montiel, M. (2015). Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 83–88.
- de Jesús-Ramos, A., Baez, A., Molina-Romero, D., Muñoz-Rojas, J., & Morales-García, Y. E. (2020). Potenciación del crecimiento de cacahuate criollo Huaquechula por bacterias rizosféricas aplicadas de forma individual o en consorcio. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 5(19), 1–21. <https://doi.org/10.11235/BUAP.05.19.02>
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-Pacheco, M., & Velázquez-Becerra, C. (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminas inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.005>
- Fernández-Travieso, J. C. (2016). Revista CENIC. Ciencias biológicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(3), 185–188.
- Gamboa, M., Heredia, G., Reyes, M., & De la Rosa, S. (2008). Bacterias y hongos microscópicos. *Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán*, 2.
- Gao, J., Sun, Y., Xue, J., Sun, P., Yan, H., Sayyar, M., Wang, L., Zhang, X., & Sun, J. (2020). *Variovorax beijingsensis* sp . nov ., a novel plant-associated bacterial species with plant growth-promoting potential isolated from different geographic regions of Beijing , China. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(6), 126135. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126135>
- Garc, J. (2018). Plaguicidas en la agricultura mexicana y potenciales alternativas sustentables para su sustitución Pesticides in Mexican Agriculture and promissory alternatives for their replaceme ... *Biológico Agropecuaria*, May.
- Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q. (2017). *TDtest : easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay*. February, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep41284>
- Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. D. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan,

- N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., & O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5–6), 473–479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
- Gimeno-Gilles, C., Lelièvre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N., Limami, A. M., Schmidt-Lebuhn, A. N., Fuchs, J., Hertel, D., Hirsch, H., Toivonen, J., Kessler, M., Loureiro, J., Lavania, U. C. U. C., Srivastava, S., Lavania, S., Basu, S., ... Yao, J. L. (2016). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. *Euphytica*, 18(2), 22280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.006><http://dx.doi.org/10.1016/j.neps.2015.06.001><https://www.abebooks.com/Trease-Evans-Pharmacognosy-13th-Edition-William/14174467122/bd>
- Giorgio, A., Stradis, A. De, Cantore, P. Lo, & Iacobellis, N. S. (2015). *Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on Sclerotinia sclerotiorum*. 6(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01056>
- Gouda, S., George, R., Das, G., Paramithiotis, S., & Shin, H. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206(October 2017), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Growth, T. N., Effects, P., & Fan, D. (n.d.). *Characterization of Selected Plant Growth-Promoting*. 6.
- Guato-molina, J. J., Auhing-arcos, J. A., Abel, J., Esmeraldas-garcía, G. A., Francisco, A., & Canchignia-martínez, H. F. (2019). *Scientia Agropecuaria agente biocontrolador a Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici, y Moniliophthora roreri Plant growth promoting bacteria with potential biocontrol agent of*. 10(3), 393–402. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.03.10>
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>
- Hami, A., Rasool, R. S., Khan, N. A., Mansoor, S., Mir, M. A., Ahmed, N., & Masoodi, K. Z. (2021). Morpho-molecular identification and first report of Fusarium equiseti in causing chilli wilt from Kashmir (Northern Himalayas). *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82854-5>
- Hernandez-salmeron, J., Valencia-cantero, E., & Moreno-hagelsieb, G. (2014). *Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with  $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of Medicago truncatula plants*. July. <https://doi.org/10.4238/2014.July.4.11>
- IDDEX. (2018). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima*

*inhibitoria (CMI). Cmi*, 3. <https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>

- Izquierdo-García, L. F., González-Almarino, A., Cotes, A. M., & Moreno-Velandia, C. A. (2020). *Trichoderma virens* GI006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling Fusarium wilt of cape gooseberry. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63689-y>
- Jiang, L., Jeong, J. C., Lee, J. S., Park, J. M., Yang, J. W., Lee, M. H., Choi, S. H., Kim, C. Y., Kim, D. H., Kim, S. W., & Lee, J. (2019). Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52804-3>
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., & Sugar, D. (2000). Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. *Phytopathology*, 90(11), 1285–1294. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1285>
- Jun, J. L., & Pu, L. (2020). Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *The ISME Journal*, 1600–1613. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0632-4>
- Kumar, A., Singh, V. K., Tripathi, V., Singh, P. P., & Singh, A. K. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Perspective in Agriculture Under Biotic and Abiotic Stress. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Crop Improvement through Microbial Biotechnology* (Issue 2004). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00016-5>
- Lara, A. T. (2020). *Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Ciencias Naturales*.
- León-Fajardo, M., Mancilla-Felipez, J. D., & Ortuño-Castro, F. N. (2019). Evaluación de bacterias endófitas promotoras de crecimiento en el cultivo de quinua. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(2), 88–99. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2019.070200088>
- Liu, S., He, F., Lin, N., Chen, Y., Liang, Z., Liao, L., Lv, M., Chen, Y., Chen, S., Zhou, J., & Zhang, L. H. (2020). *Pseudomonas* sp. ST4 produces variety of active compounds to interfere fungal sexual mating and hyphal growth. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13289>
- Liu, S., Lin, N., Chen, Y., Liang, Z., Liao, L., Lv, M., Chen, Y., Tang, Y., He, F., Chen, S., Zhou, J., & Zhang, L. (2017). Biocontrol of sugarcane smut disease by interference of fungal sexual mating and hyphal growth using a bacterial isolate. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00778>
- Medio, D. E. L. (1981). *Estudio preliminar de la germinación y viabilidad de las especies de fusarium en respuesta al potencial osmótico del medio*. September.

Michel-Aceves, A., Otero-Sánchez, M., Solano-Pascacio, L., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., & Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18–26.

*Molecular Cloning* (Vol. 1). (2012).

Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. del R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24–34.

Natsagdorj, O., Sakamoto, H., Santiago, D. M. O., Santiago, C. D., Orikasa, Y., Okazaki, K., Ikeda, S., & Ohwada, T. (2019). *Variovorax* sp. Has an optimum cell density to fully function as a plant growth promoter. *Microorganisms*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030082>

Naz, R., Bano, A., Nosheen, A., Yasmin, H., Keyani, R., Shah, S. T. A., Anwar, Z., & Roberts, T. H. (2021). Induction of defense-related enzymes and enhanced disease resistance in maize against *Fusarium verticillioides* by seed treatment with *Jacaranda mimosifolia* formulations. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79306-x>

Nguyen, T. M., Trinh, N. H., & Kim, J. (2018). *Proposal of three novel species of soil bacteria , Variovorax ureilyticus , Variovorax rhizosphaerae , and Variovorax robiniae , in the family.* 56(7), 485–492. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8025-3>

Nishioka, T., Marian, M., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Tamaki, H., Suga, H., & Shimizu, M. (2019). Microbial basis of *Fusarium* wilt suppression by *Allium* cultivation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37559-7>

Okumoto, S. (2001). Actividad de cepas de bacterias quitinol ' ticas antagonistas a *Alternaria solani* in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 59, 58–62.

Ortiz-Galeana, M. A., Hernández-Salmerón, J. E., Valenzuela-Aragón, B., de los Santos-Villalobos, S., del Carmen Rocha-Granados, M., & Santoyo, G. (2018). Aceptado: 17 mayo 2018. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 34(2), 140–151. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

Pandey, S., & Gupta, S. (2020). Evaluation of *Pseudomonas* sp . for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato ( *Solanum lycopersicum* ) plants. *Scientific Reports*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77850-0>

Parra-Rivero, O., Pardo-Medina, J., Gutiérrez, G., Limón, M. C., & Avalos, J. (2020). A novel lncRNA as a positive regulator of carotenoid biosynthesis in *Fusarium*.

- Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57529-2>
- Paulsen, S. S., Isbrandt, T., Kirkegaard, M., Buijs, Y., Strube, M. L., Sonnenschein, E. C., Larsen, T. O., & Gram, L. (2020). Production of the antimicrobial compound tetrabromopyrrole and the *Pseudomonas* quinolone system precursor, 2-heptyl-4-quinolone, by a novel marine species *Pseudoalteromonas galathea* sp. nov. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78439-3>
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., & Waśkiewicz, A. (2020). The inhibitory potential of selected essential oils on fusarium spp. Growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010023>
- Restrepo, G., Maria, S., & Moreno, M. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(1), 63–76.
- Rose, N. (2008). Psicología como una ciencia social. *Psicología & Sociate*, 20(2), 155–164. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1>
- Sarma, B. K., Yadav, S. K., Singh, S., & Singh, H. B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>
- Satola, B., & Wübbeler, J. H. (2013). *Metabolic characteristics of the species Variovorax paradoxus*. 541–560. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4585-z>
- Satyanarayana, T., Deshmukh, S. K., & Johri, B. N. (2017). Developments in fungal biology and applied mycology. In *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8>
- Sep, K., Turk, M., Mogrovejo, D. C., Perini, L., Gostin, C., Brill, F. H. H., Gundecimerman, N., Pearce, D. A., & Campo, R. Del. (2020). *Prevalence of Antimicrobial Resistance and Hemolytic Phenotypes in Culturable Arctic Bacteria*. 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00570>
- Shang, L., Yan, Y., Zhan, Y., Ke, X., Shao, Y., Liu, Y., Yang, H., Wang, S., & Dai, S. (2021). *OPEN A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by Pseudomonas stutzeri*. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00230-7>
- Silva, F. P. Da, Vechiato, M. H., Harakava, R., Pires, F., Vechiato, M. H., Harakava, R., Biológico, I., & Paulo, S. (2014). EF-1 $\alpha$  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology*, 39(1), 64–73. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000100008>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A. M. S., Karlovsky, P., Ahmed, S. A., Maier, W., De Hoog, G. S., & Finckh, M. R. (2018). The “forma specialis” issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Scientific Reports*, 8(1), 1–

17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>

- Slama, H. Ben, Cherif-silini, H., Bouket, A. C., & Qader, M. (2019). *Screening for Fusarium Antagonistic Bacteria From Contrasting Niches Designated the Endophyte Bacillus halotolerans as Plant Warden Against Fusarium*. 9(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Sperandio, D., Rossignol, G., Guerillon, J., Connil, N., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., & Merieau, A. (2010). *Cell-associated hemolysis activity in the clinical strain of Pseudomonas fluorescens MFN1032*.
- Sun, S., Lui, Q., Han, L., Ma, Q., He, S., Li, X., Zhang, H., Zhang, J., Liu, X., & Wang, L. (2018). Identification and Characterization of *Fusarium proliferatum*, a New Species of Fungi that Cause Fungal Keratitis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23255-z>
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.002>
- Syed-ab-rahman, S. F., Carvalhais, L. C., Chua, E. T., Yi, F., Moyle, P. M., Eltanahy, E. G., & Schenk, P. M. (2019). Science of the Total Environment Soil bacterial diffusible and volatile organic compounds inhibit *Phytophthora capsici* and promote plant growth. *Science of the Total Environment*, 692, 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.061>
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, xx, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
- Vanegas Guerrero, J. (2012). *Desarrollo de consorcios de diazotrofos con actividad promotora de crecimiento en plantas de arroz inundado y seco en los departamentos del Tolima y Meta*. 110. <http://www.bdigital.unal.edu.co/8917/>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts Introducción. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122015000200011&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122015000200011&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Wiemann, P., Sieber, C. M. K., von Bargen, K. W., Studt, L., Niehaus, E. M., Espino, J. J., Huß, K., Michielse, C. B., Albermann, S., Wagner, D., Bergner, S. V.,

Connolly, L. R., Fischer, A., Reuter, G., Kleigrewe, K., Bald, T., Wingfield, B. D., Ophir, R., Freeman, S., ... Tudzynski, B. (2013). Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *PLoS Pathogens*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003475>

Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98(12), 1357–1363. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81063-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81063-0)

Dirección General de Bibliotecas UJAQ