

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Efectividad del consorcio bacteriano formado por *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, para antagonizar al hongo productor de la secadera del trigo *Fusarium proliferatum* y su posible uso como bioinoculante.

### **TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

### **LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA**

Presenta

Erick Alejandro Martínez Reséndez

Director de tesis

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



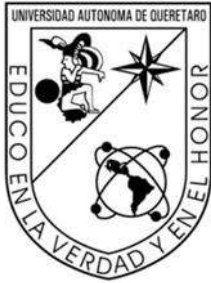
Efectividad del consorcio bacteriano formado por *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, para antagonizar al hongo productor de la secadera del trigo *Fusarium proliferatum* y su posible uso como bioinoculante

**por**

Erick Alejandro Martinez Resendez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** CNLIN-237033



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología

Efectividad del consorcio bacteriano formado por *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, para antagonizar al hongo productor de la secadera del trigo *Fusarium proliferatum* y su posible uso como bioinoculante.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Título de

Licenciado en Microbiología

Presenta:

Erick Alejandro Martínez Reséndez

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Director

Dr. Aldo Amaro Reyes

Secretario

M en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández

Vocal

Dr. Fidel Iaderos Jaime

Vocal

IAQ Daniel Mendoza Jiménez

Vocal

---

---

---

---

---

## Resumen

Los hongos fitopatógenos son de gran importancia en la agricultura, ya que debido a su interacción con las plantas y al estrés abiótico anualmente se pierden millones de toneladas de la cosecha. Entre las plantas más afectadas para el consumo humano se encuentran los cereales, los cuales son la base de la alimentación para algunos países. El control de las enfermedades producidas por los hongos utiliza fungicidas de origen químico, así como la aplicación de fertilizantes con la finalidad de promover el crecimiento y el bienestar de la planta, aunque existen evidencias de que son eficaces, su efectividad es a corto plazo debido a la resistencia que genera el microorganismo, aunado al efecto negativo dada la contaminación producida por estos compuestos químicos.

Actualmente se buscan alternativas menos contaminantes y más efectivas para el control de plagas. Se opta por un control biológico, como puede ser implementar las bacterias con actividades metabólicas que promueven el crecimiento de la planta, al mismo tiempo que antagonizan al fitopatógeno. *Fusarium proliferatum* es un hongo de amplia distribución mundial, en México la región más afectada por este hongo es el Bajío, dada la alta producción de trigo. *F. proliferatum* causa la pudrición de la raíz, terminando así con el crecimiento y disminuyendo la cosecha de trigo.

En este trabajo se usaron las bacterias rizosféricas aisladas de plantas de fresa *Pseudomonas mediterranea* (745 y 749), *Pantoea antophila* (751) y *Variovorax paradoxus* (752c), se formaron los consorcios 745-752c y 749-751. Se demostró que tienen un efecto benéfico en el crecimiento del maíz, trigo y sorgo, que antagonizan en un 70 % el crecimiento de *F. proliferatum in vitro*, así mismo son capaces de proteger a la planta de trigo retada con este patógeno. Estos consorcios utilizados tienen las características necesarias para ser utilizados como bioinoculantes, ya que colonizaron la raíz de las plantas de maíz, sorgo y trigo, eventualmente éstos se podrían implementar en cultivos y mejorar así el desarrollo de la planta, la producción del grano a la vez que brindan protección contra *F. proliferatum*.

## Abstract

Phytopathogenic fungi are of great importance in agriculture, since due to their interaction with plants and abiotic stress, millions of tons of harvest are lost annually. Among the most affected plants for human consumption are cereals, which are the basis of diet for some countries. The treatment of diseases caused by fungi uses fungicides of chemical origin, as well as the application of fertilizers to promote the growth and well-being of the plant. Although there is evidence that they are effective, their effectiveness is short-term due to the resistance generated by the microorganism, coupled with the negative effect given the contamination produced by these chemical compounds.

Currently, less polluting, and more effective alternatives are being sought for pest control. Biological control is chosen, such as implementing metabolic bacteria that promote plant growth, while antagonizing the phytopathogen. *Fusarium proliferatum* is a fungus with wide global distribution. In Mexico, the region most affected by this fungus is the Bajío, in this case due to the high production of wheat. *F. proliferatum* causes root rot, thus ending growth and decreasing the wheat harvest.

In this work, rhizosphere bacteria isolated from strawberry plants *Pseudomonas mediterranea* (745 and 749), *Pantoea antophila* (751) and *Variovorax paradoxus* (752c) were used; consortia 745-752c and 749-751 were formed. It was shown that they have a beneficial effect on the growth of corn, wheat, and sorghum, antagonizing the growth of *F. proliferatum* in vitro by 70 %, and are also capable of protecting the wheat plant challenged with this pathogen. These consortia used have the necessary characteristics to be used as bioinoculants, since they colonized the roots of corn, sorghum, and wheat plants, eventually these could be implemented in crops and thus improve the development of the plant, the production of the grain to the while providing protection against *F. proliferatum*.

## Dedicatoria

A mi familia, mis plantas y a DUKE

## Agradecimientos

- Al M en C Salvador Ramírez Baltazar por el apoyo técnico para realizar el trabajo experimental.
- Al proyecto FONDEC, Desarrollo de un bioinoculante bacteriano como alternativa de biofertilización y bioprotección contra fitopatógenos del cultivo de jitomate, y el efecto en la vida de anaquel de su fruto.
- Al Dr. Antonio por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por enseñarme la disciplina e insistencia en el proyecto realizado.
- Al Lic. Daniel Mendoza por enseñarme y ayudarme a formar bioinoculantes y con estos realizar pruebas de bioprotección en plantas de trigo.

## Contenido

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
2.1	Las plantas .....	9
2.2	Los hongos .....	10
2.2.1	La importancia de los hongos .....	11
2.2.2	La dispersión de <i>Fusarium</i> .....	12
2.2.3	Penetración de la raíz .....	12
2.2.4	Transporte de <i>Fusarium</i> a través del xilema .....	13
2.3	Las rizobacterias .....	14
2.3.1	El género <i>Pantoea</i> .....	15
2.3.2	El género <i>Variovorax</i> .....	15
2.3.3	El género <i>Pseudomonas</i> .....	16
2.3.4	Consortios bacterianos .....	17
2.4	Bioinoculantes .....	18
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>20</b>
4.1	Objetivos particulares.....	20
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1	Cepas por utilizar .....	21
5.2	Formación de consorcios bacterianos .....	21
5.3	Determinación de la huella molecular de los hongos 1144, 1145 y 1147 .....	22
5.4	Análisis tipo blast y elaboración del árbol filogenético .....	23
5.5	Efecto de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en el crecimiento de <i>F. proliferatum</i> .....	23
5.5.1	Inhibición del crecimiento por metabolitos difusibles al medio de cultivo. ....	23
5.5.2	Inhibición del crecimiento fúngico por compuestos volátiles (COVs).....	24



5.5.3	Metabolitos con actividad antifúngica recuperados del medio de cultivo por los consorcios bacterianos .....	25
5.5.4	Evaluación del efecto antifúngico contra <i>F. proliferatum</i> de los metabolitos producidos por los consorcios bacterianos .....	25
5.6	Medición del efecto benéfico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en las plantas de maíz, trigo y sorgo .....	26
5.7	Colonización de la raíz de las plantas de trigo, sorgo y maíz por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751.....	27
5.8	Efecto bioprotector de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas de trigo retadas con <i>F. proliferatum</i>	28
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
6.1	Identificación molecular de las cepas de hongos.....	30
6.2	Efecto antagonico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en <i>F. proliferatum</i> ....	34
6.2.1	Antibiosis de los consorcios bacterianos en <i>F. proliferatum</i> .....	34
6.2.2	Efecto antagonico en las cepas 1144 y 1147 ejercido por el extracto de metabolitos de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751.....	37
6.3	Los compuestos volátiles (COVs) producidos por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 inhiben el crecimiento de <i>F. proliferatum</i> .....	42
6.4	Efecto benéfico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en plantas de maíz, trigo y sorgo	45
6.5	Colonización de las bacterias de los consorcios 745-752c y 749-751 en las raíces de sorgo, maíz y trigo	53
6.6	Efecto bioprotector de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas de trigo en contra del hongo de <i>F. proliferatum</i> .....	55
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

Figura 1. Cepas de <i>Fusarium sp</i> crecidas en agar PDA.....	30
Figura 2. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares.....	31
Figura 3. Árbol filogenético de las cepas 1144 y 1147.....	33
Figura 4. Árbol filogenético de la cepa 1145.....	34
Figura 5. Efecto antagónico en la cepa 1144 de los metabolitos secundarios producidos por los consorcios bacterianos.....	35
Figura 6. Efecto antagónico en la cepa 1144 de los metabolitos secundarios producidos por los consorcios bacterianos.....	36
Figura 7. Inhibición del crecimiento en <i>F. proliferatum</i> por los metabolitos secretados al medio de cultivo por los consorcios 745-752c y 749-751.....	37
Figura 8. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 745-752c.....	38
Figura 9. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 749-751.....	39
Figura 10. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 745-752c.....	40
Figura 11. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 749-751.....	40
Figura 12. Inhibición de crecimiento en <i>F. proliferatum</i> por acción de los COVs producidos por los consorcios bacterianos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Efecto antagónico en la cepa 1144 por acción de COVs. ....	43
Figura 14. Efecto antagónico en la cepa 1147 por acción de COVs.....	45
Figura 15. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de maíz variedad Ocelote.....	46

Figura 16. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de maíz variedad Zeus.....	47
Figura 17. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de maíz variedad Ocelote.....	48
Figura 18. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de maíz variedad Zeus.....	48
Figura 19. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de trigo variedad Bernard.....	49
Figura 20. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de sorgo variedad Bernard.....	50
Figura 21. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de sorgo variedad Aspros.....	51
Figura 22. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de sorgo de la variedad Aspros.....	51
Figura 23. Incremento en el crecimiento de la raíz y tallo el consorcio bacteriano en plantas de sorgo variedad Pioneer.....	52
Figura 24. Efecto promotor de crecimiento del consorcio bacteriano en la planta de sorgo de la variedad Pioneer.....	53
Figura 25. UFC obtenidas a partir de raíz colonizada.....	54
Figura 26. Efecto promotor de crecimiento en tallo en plantas de trigo variedad Maya por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751.....	56
Figura 27. Efecto promotor de crecimiento en raíz por parte de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en la variedad Maya.....	56
Figura 28. Efecto de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas infectadas con <i>F. proliferatum</i> .....	58
Figura 29. Crecimiento de <i>F. proliferatum</i> en planta de trigo variedad Maya.....	59

<b>Tabla 1. Identificación molecular de las cepas de <i>Fusarium</i> basada en el análisis del marcador molecular ITS (1145); EF1<math>\alpha</math> (1144 y 1147). .....</b>	<b>32</b>
---	-----------

## 1 INTRODUCCIÓN

Las plantas sufren constantemente de estrés debido a factores externos tanto bióticos como abióticos. Entre los abióticos encontramos principalmente factores químicos y físicos como sequía, cambios bruscos de temperatura, deficiencia de nutrientes, exceso de agua. Por otro lado, tenemos a los bióticos como son los agentes patógenos ya sean las bacterias, los hongos, los parásitos, los insectos, los virus y los animales. Estos factores están relacionados con cualquiera de las etapas fenológicas del desarrollo de la planta como son: el crecimiento, la floración, la germinación, la respiración, el metabolismo y el desarrollo de semillas entre otros.

Entre los agentes fitopatógenos tenemos a los hongos, estos son organismos eucariotas heterótrofos que presentan una pared celular formada por quitina, existen principalmente en dos formas, las levaduras y las hifas; en algunos casos pueden presentar ambas morfologías dependiendo de su ciclo de reproducción (Leslie et al., 2006). Los hongos que son patógenos de diferentes géneros de plantas se les conocen como hongos fitopatógenos, algunas familias de plantas que se ven afectados por hongos son las Cucurbitaceae (la calabaza, el calabacín, el melón, el pepino, la sandía etc), la Solanaceae que comprende el jitomate y el tomate etc, además de la Poaceae en esta todas son gramíneas y se encuentran 3 de las plantas más importantes en la agricultura como son el maíz, el sorgo y el trigo. Las plantas de interés agrícola son atacadas por diferentes géneros de hongos, entre ellos tenemos a *Fusarium* el cual es un patógeno ubicuo y ampliamente distribuido que pertenece al Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Class Sordariomycetes, Order Hypocreales y Family Nectriaceae (Leslie et al., 2006). Entre las muchas enfermedades que produce *Fusarium*, las cuales están relacionadas con la especificidad del hospedero, encontramos a la secadera de trigo, se caracteriza principalmente por la pudrición de raíz en la planta trigo, ésta representa un problema serio en la región del Bajío mexicano, sobre todo en las primeras etapas del cultivo, debido a las pérdidas económicas. Se han identificado principalmente dos especies de hongos como agentes etiológicos en la

secadera del trigo a *Fusarium proliferatum* y *Fusarium graminearum*, (CESAVEG., 2019; Leyva et al., 2017). En la agricultura la actividad devastadora de *Fusarium* sp. reduce la calidad, el rendimiento de los cultivos y dado que algunas especies presentan cepas micotoxigénicas llegando a ser responsables de intoxicaciones graves en los seres humanos y los animales (Nicolaisen et al., 2009).

Los miembros del género *Fusarium* son polifacéticos, en cuanto a que en relación con la planta son capaces de afectar diversas estructuras, como son: la semilla, la espiga, los tallos, las raíces. Su propagación se debe al cultivo de un solo tipo de semilla a lo largo de varios ciclos de cultivo. *F. proliferatum* presenta dos tipos de reproducción, tanto asexual como sexual. La reproducción asexual es la más común y se asocia con las infecciones en plantas principalmente en maíz, esto se debe a que las conidia sobreviven por años en el ambiente y son más resistentes a condiciones adversas, constituyendo una forma de propagación y al mismo tiempo de resistencia (Villa et al., 2014).

Existen tres vías por el cual el hongo puede infectar a la planta: semillas contaminadas con micelio, suelo contaminado con micelio a cierta profundidad o por conidia presentes en la superficie del suelo proveniente de plantaciones anteriores (Villa et al., 2014). El proceso de infección de *Fusarium* se divide en varios pasos, el primero se lleva a cabo el reconocimiento de la especificidad de la planta huésped lo que determina el éxito del hongo en llevar a cabo la colonización de la planta por conidia, los cuales van a germinar una vez que se lleva a cabo el contacto con la planta ( Li et al., 2022). El tubo germinativo se extiende y hace contacto con las raíces de las plantas facilitando la densa ramificación de las hifas. Esto va a desencadenar la producción de micotoxinas que van a ser la causa principal de infección en la planta huésped como son: aflatoxinas, fumonisinas, terpenos, toxina T-2 (Li et al., 2022). *Fusarium* además secreta lo que se conoce como tricótecenos que son toxinas que causan daño en la membrana de las células vegetales por medio de la liberación de especies reactivas de oxígeno (Muñiz, 2021). Este hongo es una de las pocas especies que desarrollan peritecios en campo, además forma micelio blanquecino en las glumas de trigo. Los síntomas

más comunes por una infección de *F. proliferatum* en plantas de trigo es la pudrición de las raíces, de la espiga y la poca o nula formación de granos; finalmente puede ocasionar la muerte de la planta. En la etapa de semilla, se reduce la capacidad germinativa y a su vez el vigor de la plántula. Hasta ahora los tratamientos que mostraron un control eficaz en la infección producida por este hongo es la combinación de tiabendazol y carbendazim (Leyva et al., 2017).

En México, en los últimos años la producción de trigo ha oscilado entre los 2.8 a 3.2 millones de toneladas métricas. El año 2019 tuvo la mayor producción de trigo superando las 3.2 millones de toneladas, caso contrario el 2020 que se redujo a 2.99 millones de toneladas. La producción se ve afectada en un 30 % por hongos que producen la secadera del trigo que son alrededor de 8.9 millones de toneladas afectadas al año (Franco et al., 2020). Cabe mencionar que tanto *F. proliferatum* al igual que *F. graminearum* son los responsables del 30 % de pérdida en maíz, arroz y 15 % en trigo en toda América Latina (Leyva et al., 2017).

Dado que la manera más común de controlar a *F. proliferatum*, como se mencionó es la aplicación de fungicidas químicos, las nuevas tecnologías y alternativas, muestran una clara tendencia al uso de microorganismos. Destacan las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las cuales se pueden mezclar para formar consorcios y mejorar su actividad. En este caso utilizamos a las bacterias provenientes de una huerta de fresa de manejo orgánico *Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, se determinó su efectividad para en condiciones *in vitro* controlar el crecimiento de *F. proliferatum*, así como promover el crecimiento de plantas como el trigo, el sorgo y el maíz, así mismo, estas bacterias fueron capaces de colonizar las raíces de estas plantas, en conjunto nuestros resultados denotan la factibilidad que en un futuro cercano podría tener implementar estas bacterias como un paquete biotecnológico para mejorar la producción de trigo en el Bajío.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Las plantas

Son organismos multicelulares eucariotas compuestos por células vegetales las cuales presentan núcleo, organelos y una pared celular compuesta de celulosa, poseen un pigmento llamado clorofila las cual les da el color verde característico, así como cloroplastos donde realizan la fotosíntesis, la cual es la transformación de dióxido de carbono en fuentes de carbono asimilables utilizando energía luminosa (Espinoza-Velázquez et al., 2012). Para su desarrollo la planta alterna entre un esporófito que tiene células diploides y un gametofito que tiene células haploides, además cuentan con órganos especializados como la raíz, tallo y hojas, además algunas plantas pueden generar flores (espermatofitas) y fruto (angiospermas). Su tejido se clasifica en tres tipos: el tejido fundamental, las células de éste forman lo que es el parénquima, la colénquima y el esclerénquima, tejido epidérmico: es la capa externa de la planta (una sola capa de células epidérmicas con pequeñas proyecciones conocidas como tricomas), por lo general suele estar cubierta de una capa cerosa (cutícula) gruesa que la protege de lesiones y de la pérdida del agua y tejido vascular (Espinoza-Velázquez et al., 2012; Villaseñor Ortiz et al., 2014).

Las plantas angiospermas pertenecen a la división *Magnoliophyta* que se divide a su vez en dos grandes grupos, las monocotiledóneas y las dicotiledóneas ya que producen flor y fruto con aroma que atrae a polinizadores, además cuentan con un mecanismo de dispersión del fruto y la semilla (Villaseñor Ortiz et al., 2014). Los frutos están formados por un pericarpo que es la pared del ovario y puede tener tres capas: exocarpo que es la capa externa, el mesocarpo que es la capa intermedia y el endocarpo que es la capa interna y todo esto es un ovario maduro (Villaseñor Ortiz et al., 2014).

El trigo pertenece a la familia de las gramíneas, es una planta autógama en la cual la fecundación de la flor se produce antes de su apertura y es uno de los tres granos más cultivados en todo el mundo, se producen anualmente unos 760 millones de toneladas, la especie más consumida en el mundo es *Triticum aestivum*



que constituye más del 90 % del trigo producido, este crece en una temperatura templada entre los 25 a 33 °C (Villaseñor- Ortiz et al., 2014).

El sorgo es también una gramínea oriunda de las regiones de África oriental y las zonas tropicales, su cultivo se da principalmente en Asia oriental, América y Europa para consumo humano y animal. Es uno de los cereales más importantes a nivel mundial por sus diferentes usos y su resistencia a la falta de humedad y cambios bruscos de temperatura además su fisiología es parecida a la del maíz (Villaseñor- Ortiz et al., 2014).

El maíz es una gramínea hermafrodita ya que produce flores femeninas y masculinas en la misma planta, la flor productora de polen se le conoce como panoja (masculina) y la mazorca es la encargada de producir óvulos los cuales se convierten en semillas (flor femenina). Los primeros usos de esta planta en la agricultura son de hace casi doce mil años atrás en Mesoamérica y con la llegada de los españoles al continente Americano esta planta se ha introducido en otros países iniciando por España. Su explotación y facilidad para cultivar la colocan actualmente como uno de los cereales más producidos y consumidos a nivel mundial como el trigo y el arroz (Villaseñor- Ortiz et al., 2014).

## **2.2 Los hongos**

Los hongos son organismos eucariotas con pared celular compuesta de quitina la cual les provee forma y rigidez a la célula. Existen hongos tanto unicelulares como pluricelulares. Los hongos filamentosos están compuestos por células alargadas microscópicas conocidos como hifas que se ramifican y un conjunto de estas hifas forman un micelio, las células de los hongos cuentan con organelos y un núcleo definido. Estos organismos son heterótrofos puesto que requieren de otros organismos para poder obtener su alimento, esto lo realizan por la descomposición del alimento en moléculas que el hongo puede metabolizar, en otros éstos se alimentan de materia muerta o suelen ser parásitos como la mayoría de los hongos de importancia clínica y en el área de la fitopatología (Espinoza-Ahumada et al., 2019).

### 2.2.1 La importancia de los hongos

En la ecología contribuyen al reciclaje esencial de nutrientes como es el caso de los hongos micorrizógenos, que en varios casos son esenciales para el crecimiento óptimo de las plantas, ya que establecen una relación simbiótica entre la planta y el hongo estableciéndose en las raíces de la planta. Otro uso es el control poblacional tanto de plantas como insectos, en este último caso suelen ser parásitos (Espinoza-Ahumada et al., 2019). Los hongos tienen dos tipos de reproducción, asexual y sexual. La asexual se da por la segmentación o fragmentación del micelio o por esporas que favorecen su dispersión a nuevos hábitats, estas esporas además de tener la función de dispersión (Espinoza-Ahumada et al., 2019).

Entre los hongos que tienen relevancia en la agricultura está los fitopatógenos, los cuales comprenden varios tipos de hongos microscópicos filamentosos presentes principalmente en suelo y asociados a plantas. Entre los más destacados se encuentra el género *Fusarium*, estos crecen en climas templados alrededor de los 37 °C son oportunistas, comúnmente atacan a los cereales, los cuales son usados como base en la alimentación humana. Disminuyen la producción del cereal debido al daño que ocasionan en la planta, el grano obtenido en algunas ocasiones está contaminado con micotoxinas como es el caso de *F. proliferatum* conocido por ser los agentes causantes de la secadera de trigo (Arratia-Castro et al., 2019).

*Fusarium* habita principalmente en el suelo donde yacen restos de plantas previamente infectadas, dicho suelo tiene que permanecer húmedo para que promueva el crecimiento del micelio o que haya presencia de materia orgánica como son frutos en pudrición, lo cual permitirá que las esporas sean el mecanismo idóneo de dispersión, a su vez también se propaga por corrientes de agua al igual que por herramientas usadas en la agricultura que funcionan como fómites al transportar esporas, cabe mencionar que el suelo una vez infectado por *Fusarium* puede permanecer así por un largo tiempo, lo cual vuelve al suelo inutilizable para la actividad agrícola (Agrios et al., 2005; Mendoza-Vargas et al., 2021; Sun et al.,

2022). El proceso de infección de *Fusarium* se divide en varias etapas que van desde la dispersión, la colonización y la penetración de la raíz por parte del hongo, hasta llegar al daño sistémico, éste se da por el transporte de conidia por el xilema de la planta.

### **2.2.2 La dispersión de *Fusarium***

Se lleva a cabo por tres diferentes tipos de esporas asexuales: las macroconidias son las esporas más comunes de *Fusarium*, son puntiagudas y curvas, se desarrollan en la superficie de las plantas muertas por el patógeno o en los frutos que esta planta tira el marchitarse. Las clamidosporas son redondas y presentan una o dos células estas tienen una pared gruesa, se producen dentro o en la parte terminal del micelio más viejo o en los macroconidios, por último los microconidios que se presentan principalmente en el periodo de infección del hongo en la planta por lo general se encuentran en el xilema y éstas al igual que las clamidosporas solo presentan una o dos células. La forma de dispersión más común de *Fusarium* y la más resistente son las clamidosporas, estas suelen permanecer viables varias semanas incluso meses en el suelo o en plantas o frutos marchitos, el hongo infecta las flores con clamidosporas las cuales son dispersas por las lluvias, las rachas de viento, el agua y los insectos herbívoros que causan heridas en las plantas (Agrios et al., 2005; Sun et al., 2022; Rocher et al., 2022).

### **2.2.3 Penetración de la raíz**

*Fusarium* infecta las raíces de las plantas por medio de daño mecánico inducido por factores externos al hongo, como daños producidos por insectos o por actividades de labranza es posible generar daño en las raíces. Esto ocurre en suelo contaminado por *Fusarium*, para que haya una penetración del hongo a la raíz, primero se tiene que dar el reconocimiento entre la planta y el hongo, en este caso es mediado por diferentes tipos de moléculas, una de ellas es la cutina. Para ello el factor de transcripción CTF1 $\beta$  y CTF1 $\alpha$  activan al gen cut1 que secreta la cutinasa extracelular, ésta degrada la cutina localizada en la epidermis de la planta, liberando así los monómeros de cutina. Posteriormente por vías de señalización de MAPK se transcriben varios genes de virulencia que codifican a enzimas que

degradan la pared celular de las plantas como la pectinasa, las celulasas, las hemicelulasas y las xilanasas (Martyn et al., 2014; Rocher et al.,2022; Rana et al.,2017; Mendoza-Vargas et al., 2021).

#### **2.2.4 Transporte de *Fusarium* a través del xilema**

El hongo habiendo penetrado la raíz por vía ascendente a través del tallo usando el xilema (transporte acropétalo) llegará a la corona de la planta, aquí empezará a producir bloques que taponan el paso de agua y nutrientes, esto es uno de los principales factores que darán lugar a la marchitez de la planta así como la visualización de otros signos de infección (Chretien et al.,2020; Rana et al., 2017; Arriata-Castro et al.,2017). Una vez infectadas las plantas, en sus raíces se retrasa el crecimiento, además de pudrir las raíces laterales, si se presentan estos signos en la etapa de plántula, estas se van a marchitar y morirán a los pocos días de mostrar los primeros síntomas de marchitamiento. De manera general los primeros signos que se pueden apreciar en la planta son: un ligero aclaramiento de las venas en los folíolos más jóvenes y externos, en las hojas viejas se presenta la caída de los peciolo esto hace que las hojas muestren epinastia, en el caso de las plantas viejas se presentan más síntomas, como retraso en el crecimiento, coloración amarillenta en las hojas inferiores seguido de un marchitamiento y deflación en los tallos más jóvenes, los síntomas se van presentando de abajo en la base de la planta en la cual se presenta un anillo marrón hacia arriba hasta matar al tallo (Rana et al., 2017 ; Arriata-Castro et al., 2019 Chretien et al., 2020).

Una vez dentro utiliza al xilema como medio de transporte para dispersarse a lo largo de la planta, obstruyendo los vasos adyacentes del xilema por micelio o esporas lo cual produce una interferencia en el transporte del agua a las hojas produciendo que éstas se marchiten por el cierre de los estomas, esto en un tiempo prolongado produce la muerte de la planta. Cada vez que una hoja se marchita el hongo se desplaza a esa zona de la planta para esporular y diseminar sus esporas (Martyn et al., 2014; Chretien et al., 2020).

Para que la infección se de en el fruto de la planta, requiere la presencia de esporas, para llegar a ese sitio utilizan ya sea heridas causadas por insectos o la lluvia, como es el caso del granizo, aunque en algunos casos suelen atravesar la cutícula de la planta y entrar a los estomas. Una vez dentro del fruto, el hongo comienza a secretar enzimas que maceran los tejidos infectados. Días después del inicio de la infección el fruto podrido cae al suelo o puede quedar colgado, secarse y arrugarse este es idóneo para el desarrollo de los microconidios (Martyn et al.,2014).

### **2.3 Las rizobacterias**

Son microorganismos procariotas cosmopolitas de diversas formas como son los cocos, bacilos, cocobacilos, espiroquetas y vibrios de un tamaño que oscila entre 0.5 a 5 micrómetros. De manera general a diferencia de las células eucariotas, éstas no cuentan con un núcleo definido para encapsular el DNA y ningún tipo de organelo, pero sí con una pared celular formada por peptidoglicano la cual le da forma y rigidez a la célula, algunas bacterias son móviles por la presencia de flagelos. Al igual que los hongos, las bacterias forman parte fundamental de los ecosistemas, como son los ciclos biogeoquímicos, además de formar parte fundamental de la microbiota y metabolismo de animales y humanos, así como de las plantas, ya sea endófitas o en la zona radicular, así como en la filósfera (Khan et al., 2022; Win et al., 2022).

Las rizobacterias tienen una estrecha relación con las plantas, una relación mutualista, estas bacterias colonizan las raíces de las plantas, también son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), no solo promueven el crecimiento de las plantas si no también mejoran la respuesta inmune contra agentes fitopatógenos como hongos y bacterias (Ha-Tran et al.,2021). Otras funciones beneficiosas que realizan es sintetizar fitohormonas que facilitan el enraizamiento, secretar compuestos que mejoran la estructura del suelo, facilitar la absorción de nutrientes. Algunos ejemplos de rizobacterias son *Pseudomonas putida*, *Azospirillum fluorescens* y *Azospirillum lipoferum*,

*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* (Lugtenberg et al., 2009).

### **2.3.1 El género *Pantoea***

Está formado por bacterias Gram-negativas en forma de bastón que se encuentran por lo general en el suelo, los últimos años han tenido un uso destacable en la industria agrícola por su versatilidad y maleabilidad para explotarlos y adaptarlos a nichos específicos o usos comerciales relevantes como la síntesis de moléculas antimicrobianas, productos de biocontrol de plagas, así como la biorremediación. Los primeros registros de bacterias dentro de este género fueron bacterias que infectan a plantas, posteriormente se descubrió que algunas especies tienen una fuerte asociación a animales, insectos y humanos, así como ser benéficas para plantas (Walterson et al., 2015).

### **2.3.2 El género *Variovorax***

Son bacterias Gram-negativas, oxidasa y catalasa positivo, aerobias y anaerobias facultativas, son bacterias flageladas con un metabolismo quimioorganotrofo utilizando el H<sub>2</sub> como fuente de energía y su hábitat es por lo general en suelo favoreciendo el crecimiento de las raíces de las plantas aumentando la cantidad y captación de nutrientes y por otro lado reduce el crecimiento de los microorganismos patógenos, principalmente los que parasitan la raíz (Satola et al., 2013; Garcia Teijeiro et al., 2020).

*Variovorax* al igual que *Pantoea* su principal uso en la agricultura es el control de enfermedades en plantas, en el caso de *Variovorax* controla la secreción de toxinas o enzimas producidas por hongos y bacterias para el proceso de invasión en las raíces en el caso de algunos hongos y bacterias, o el desarrollo del apresorio en hongos (Flores-Duarte et al., 2022; Lv et al., 2022). *V. paradoxus* otorga ciertas ventajas a las plantas que son colonizadas en las raíces por esta bacteria como son: la tolerancia a la sequía ya que interfiere en la producción de etileno, produciendo  $\alpha$ -cetobutirato y amoniaco esto favorece el crecimiento de las raíces,

en algunas plantas bajo condiciones de estrés promueven la nodulación en raíces (Flores-Duarte et al.,2022; Sun et al.,2018).

Esta bacteria se ha demostrado que es excelente colonizadora de las raíces de las plantas, como el maíz y el tomate, al hacer esto mejora la absorción de nutrientes, fijación de nitrógeno además de promover el crecimiento de las plantas en temporadas de sequía o en suelos con pocos nutrientes (Flores-Duarte et al.,2022; Lv et al.,2022).

Por otro lado, *Pantoea* promueve el crecimiento de la planta principalmente por la solubilización de fosfatos, además de la producción de fitohormonas y ácido abscísico, también sintetiza antibióticos y antifúngicos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, como es el caso del ácido D-alanilgriseolúteico, glucanasas, quitinasas y fenazinas (Dutkiewicz et al.,2016; Lv et al.,2022).

### **2.3.3 El género *Pseudomonas***

En lo que respecta a los miembros de este género, éstas son bacterias Gram negativas cosmopolitas ya que se encuentran ampliamente distribuidas en una amplia gama de nichos. Son aerobias que no tienen la capacidad de fermentar, presentan forma de bastón además estas bacterias son móviles. Son catalasa y oxidasa positivo, sobre su membrana externa tienen una cubierta de lipopolisacárido, esta molécula está relacionada con la resistencia a antibióticos y evasión del sistema inmune (Uzaibar et al.,2018).

Este género es de importancia clínica ya que muchas especies son patógenas tanto en humanos como en animales. En la agricultura también resalta su importancia porque algunas especies resultan ser patógenos de plantas, como es el caso de *P. syringae*, aunque algunas otras al formar una simbiosis con la planta, esta relación se vuelve mutualista y en algunos casos hasta benéfica para la planta, como es el caso de *Pseudomonas fluorescens*. También suelen tener uso biotecnológico como biorremediadores, estas bacterias pueden degradar cloratos, nitratos y algunos hidrocarburos (Uzaibar et al., 2018).

Las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera como *Pseudomonas mediterranea* son utilizadas en su mayoría en la agricultura como agentes promotores del crecimiento vegetal, ya que mejoran en la planta la absorción de nutrientes, aumenta el contenido de clorofila, la tasa fotosintética y la producción de fitohormonas relacionadas con el estrés. Además, que se ha demostrado que la aplicación de esta bacteria también funciona como tratamiento contra patógenos principalmente los que dañan la raíz como es el caso de *Fusarium* sp (Flockton et al.,2019; Cesar-Luna et al.,2020).

Se demostró que la aplicación de *Pseudomonas* aumenta el rendimiento del cultivo de las plantas como maíz y sorgo aumentando la calidad de las semillas, además de influir positivamente en la fijación del nitrógeno. Esto está relacionado con su capacidad para secretar al medio sideróforos y algunas moléculas como el ácido ortohidroxibenzoico, el HCN (cianuro de hidrógeno). *Pseudomonas* también produce antimicóticos como: fenazinas que dañan las membranas celulares de los hongos, pioluteorina y pirrolnitrina que inhibe la biosíntesis de ADN y ARN (Flockton et al.,2019).

#### **2.3.4 Consorcios bacterianos**

Los consorcios bacterianos o microbianos son grupos formados por dos o más microorganismos que viven en una relación mutualista o en simbiosis. Los microorganismos que conforman el consorcio pueden ser ambos ectosimbiontes o endosimbióticos. Esto dependerá de las especies microbianas que forman el consorcio y mantienen en su mayoría una estrecha relación con plantas, sobre todo si dichos consorcios bacterianos son aislados de muestras de suelo, además de desempeñar alguna función de mejor manera como pudiera ser la fijación nitrógeno al formar esta relación se nota la diferencia en función en comparación cuando estos microorganismos se encuentran de manera individual (Romero et al.,2021; Yixian Lin et al.,2022).

La obtención de los consorcios bacterianos se puede encuadrar en dos vertientes, una es la asociación que se de manera natural en el ecosistema, es



decir con aislados obtenidos de comunidades bacterianas provenientes de muestras ambientales, bacterias o microorganismos aislados de suelo o sustratos donde ya formaban de manera natural consorcios con otros microorganismos. Una alternativa para su obtención es de manera sintética en condiciones de laboratorio, en este caso se determina que no exista inhibición o competencia entre las bacterias que se utilizaran para formular los consorcios, es decir que sean compatibles entre sí (Romero et al.,2021).

Algunas de las bacterias que se han usado en la preparación de consorcios bacterianos como sustitutos de fertilizantes químicos es el caso de *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp, el cual se utilizó en el maíz. Estos aislados bacterianos inhiben la síntesis de etileno y producen ácido indol-3-acético (IAA), el cual promueve el crecimiento de la planta en temporada de sequía o en situaciones de estrés (Yixian Lin et al.,2022). Otro consorcio formado por 6 microorganismos entre ellos 4 bacterias las cuales son *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus licheniformis*, *Paraburkholderia. tropica* y *Pseudomonas fluorescens* en conjunto con dos hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae*, este consorcio se utilizó ya sea para promover el crecimiento de las plantas como tomate melón por dar algunos ejemplos o como tratamientos para infecciones por agentes patógenos como *Fusarium oxysporum*. Otros ejemplos de consorcios bacterianos son las cepas de *Serratia marcescens* SRM, estas bacterias promueven el crecimiento de las plantas en ambientes fríos dando tolerancia a la planta, también solubiliza fósforo y produce AIA (Ácido Indol -3-Acético), además de promover el crecimiento de la raíz, estos resultados se obtuvieron de plantas de trigo (Romero et al.,2021). *Rhizobium* se asocia con leguminosas, la cual da lugar a nódulos en las raíces en cuyo interior se realiza la fijación de nitrógeno, lo cual se refleja en un crecimiento de la planta (Romero et al.,2021).

## **2.4 Bioinoculantes**

Los bioinoculantes son una herramienta utilizada por la agricultura verde la cual se compone de formulaciones preparadas a base de microorganismos como pueden ser: *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Variovorax*

y hongos micorrizógenos por mencionar algunos, los cuales son benéficos para tener un suelo libre de microorganismos patógenos, a la vez favorecen el crecimiento y optimiza el desarrollo de la planta, Los bioinoculantes benefician de diferentes formas a la planta, ya sea por medio de la acción que estimulan el crecimiento, el biocontrol que ejercen en contra de patógenos, así como la fitorremediación. La promoción de crecimiento está dada por la producción de fitohormonas. Estos microorganismos son productores de cianuro de hidrógeno y producen sideróforos (Chaudhary et al.,2018; Shukla et al.,2019; Maitra et al., 2022). Los bioinoculantes se componen de dos partes, las cepas que beneficiarán a la planta y un vehículo de transporte que apoye al microorganismo a beneficiar a la planta dando almacenamiento y protección a la cepa, existen en forma de gránulos o bien en forma líquida (Chaudhary et al., 2020). Por último, los bioinoculantes contienen metabolitos microbianos que favorecen el desarrollo de la planta, en este caso son nutrientes y moléculas que favorecen la respuesta contra fitopatógenos. (Chaudhary et al., 2020; Selvakumar et al., 2008; Méndez-Santiago et al., 2021).

### 3 HIPÓTESIS

Los consorcios bacterianos formados por *Pseudomonas mediterranea* (745)-*Varivorax paradoxus* (752c) y *Pseudomonas mediterranea* (749)-*Pantoea antophila* (751) controlan el crecimiento de *Fusarium proliferatum* y tienen potencial uso como agente bioinoculante en trigo, maíz y sorgo.

### 4 OBJETIVO GENERAL

Analizar la efectividad de consorcios bacterianos formados por las bacterias *Pseudomonas mediterranea* (745)-*Pseudomonas mediterranea* (749) *Varivorax paradoxus* (752c)-*Pantoea antophila* (751) como estrategia de control de crecimiento de *Fusarium proliferatum in vitro* y su efecto benéfico en plantas de trigo, maíz y sorgo.

#### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

4.1.1.- Analizar el efecto antagónico ejercido por los consorcios bacterianos formados por *P. mediterranea*, *V. paradoxus* y *P. antophila* contra *F. proliferatum* en condiciones *in vitro*.

4.1.2.- Determinar el efecto benéfico que tienen los consorcios bacterianos en el desarrollo radicular de las plantas de trigo, maíz y sorgo.

4.1.3.- Analizar la capacidad de colonización de la raíz que tienen los consorcios bacterianos formados por *P. mediterranea*, *V. paradoxus*, *P. antophila* en las plantas de trigo, maíz y sorgo.

4.1.4.- Determinar el efecto bioprotector de estos consorcios bacterianos en las plantas de trigo retadas con *F. proliferatum*.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas por utilizar

Las bacterias *Pseudomonas mediterranea* (cepas 745 y 749), *Variovorax paradoxus* (752c) y *Pantoea antophila* (751), el número entre paréntesis indica el orden que corresponde al cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO). Estas cepas se aislaron de una huerta de fresa de manejo orgánico (Torres, 2020) y se conservaron a -80 °C en glicerol al 20 % en caldo nutritivo. Para su uso, se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 28 °C por 24 h.

Las cepas de *F. proliferatum* (1144, 1145 y 1447) cuyo código corresponde al cepario del LAMIMO fueron donadas por el Dr. Luis Antonio Mariscal Amaro (INIFAP-Celaya). Posterior a su inoculación en agar Papa Dextrosa (PDA) sobre una membrana de celofán, se incubó la placa a 28 °C durante una semana a temperatura ambiente (30 °C). Posteriormente, se recuperó el celofán con pinzas estériles, se secó a 28 °C durante una semana. El celofán se cortó en fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> y se conservaron el celofán/hongo a -80 °C. Para su uso, una porción del celofán se sembró en placa de PDA, se incubó a temperatura ambiente durante una semana. Para recolectar las conidia se utilizó el buffer PBS (buffer de fosfatos salino pH 7.5), una vez crecido el hongo se vertió sobre la caja de PDA con micropipeta 7 ml de PBS, con un asa acodada se extendió el PBS por toda la caja Petri para después recuperar el buffer con micropipeta, éste se colocó en tubos de plástico estéril de 50ml, para determinar la cantidad de conidia/ml se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer y con el microscopio LEICA DM750, se contaron las conidia presentes en 5 cuadrantes, el valor obtenido se multiplicó por 5, por 10,000 y en su caso por la dilución utilizada para realizar el conteo.

### 5.2 Formación de consorcios bacterianos

La compatibilidad de las bacterias que forman los consorcios fue determinada previamente por Mendoza Jiménez (2022). Para preparar el consorcio, las cepas bacterianas 745, 749, 751 y 752c posterior a las 24 h de incubación a 28 °C en agar nutritivo, se tomó con el asa bacteriológica una muestra, se inocularon 5 ml de caldo nutritivo (CN) en tubos de plástico cónicos estériles de 50 ml y se

incubaron en agitación a 28 °C durante 72 h. Pasados los tres días de incubación de cada bacteria se tomó 1 ml para medir la densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro Genesis-10s UV-SIS. Posteriormente se ajustó la densidad del cultivo a 1.0, y se preparó una mezcla en proporción 1:1 de cada bacteria que forman el consorcio. Consorcio 1, cepas: 745-752c y el consorcio 2, cepas: 749-751. Estos consorcios se utilizaron para aplicar en planta o bien para realizar las pruebas de antagonismo de los hongos fitopatógenos.

### **5.3 Determinación de la huella molecular de los hongos 1144, 1145 y 1147**

Se cultivaron las cepas de hongo en cuestión en agar PDA sobre celofán estéril (una cepa por caja) a 28 °C por una semana. A continuación utilizando unas pinzas estériles se retiró el celofán sobre el cual creció el micelio del hongo y se congeló a 80 °C. Posteriormente se molió en nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino, el cual se utilizó para purificar el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico, para ello se empleó el Kit Fungal/Bacterial DNA miniprep de la marca Zymo [https://files.zymoresearch.com/protocols/ d6007\\_quick-](https://files.zymoresearch.com/protocols/ d6007_quick-bacterial_miniprep_kit.pdf) ([https://files.zymoresearch.com/protocols/ d6005\\_quick-dna fungal bacterial\\_miniprep\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/ d6005_quick-dna_fungal_bacterial_miniprep_kit.pdf)). El ADN así obtenido se visualizó en gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, como buffer de corrida se utilizó TAE (Tris-acetato a 0.04M, EDTA 1mM, pH 8). La electroforesis se llevó a cabo durante 45 min a 100 voltios. El gel se observó en el fotodocumentador Gel Doc XR+ de BIO-RAD. Se cuantificó el ADN por medio de la lectura de 1 µL en el nanodrop Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, para determinar su concentración e integridad. Posteriormente se preparó una alícuota de 25 ng/µL para ser utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se preparó una reacción PCR de cada muestra de ADN con un volumen final de 25 µL según las condiciones de la casa comercial (Thermo Fisher). Para la reacción se utilizó la enzima DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher, no se usó mezcla maestra), y los oligonucleótidos ITS1 (2117) 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' e ITS4\_5 (2118) 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3', para la muestra de ADN de la cepa 1145, en el caso de las cepas 1144 y 1147 se usó el marcado Ef1α con los oligonucleótidos

2242 (5'ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC3') y 2243 (5'GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT3). El Programa de amplificación utilizado para las muestras de ADN de las cepas 1144 y 1147 fue: 35 ciclos con las siguientes especificaciones: 94 °C- 5 min, 94 °C 30 s, la temperatura de alineamiento 55 °C- 30 s, 72 °C 1 min finalmente 72 °C por 5 min. Para la cepa 1145; 35 ciclos con las siguientes especificaciones: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 55°C 30 s, 72 °C 2 min finalmente 72 °C 5min. Una vez realizada la reacción se tomaron 5 µL para confirmar la amplificación del fragmento esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 1 kb y 1.5 kb (Thermo Fisher) según sea el caso. Una vez confirmado la amplificación de una sola banda, se realizaron 3 reacciones de PCR de 25 µL cada muestra en las condiciones antes mencionadas. Finalizado el ciclo de amplificación, se juntaron las tres reacciones en un solo tubo, se utilizaron 5 µL para correr una electroforesis. Posteriormente el remanente se purificó utilizando el Kit Zymoclean Gel DNA Recovery kit, se cuantificó y se secuenciaron por el método de Sanger en las instalaciones Langebio, Cinvestav-Irapuato.

#### **5.4 Análisis tipo BLAST y elaboración del árbol filogenético**

Las secuencias obtenidas, se alinearon y de cada una se obtuvo la secuencia consenso usando <https://megasoftware.net/>; éstas se sometieron a un análisis tipo Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtener su identidad. Posteriormente de la base de datos del NCBI se descargaron las secuencias similares reportadas en otros hongos en formato Fasta en función del resultado obtenido. Con estas secuencias se realizó el árbol filogenético usando <https://megasoftware.net/> y validar así la identidad del hongo.

#### **5.5 Efecto de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en el crecimiento de *F. proliferatum***

##### **5.5.1 Inhibición del crecimiento por metabolitos difusibles al medio de cultivo.**

Se evaluó la inhibición en el crecimiento del hongo fitopatógeno en las cepas 1144 y 1147, por efecto de los metabolitos secundarios difusibles al medio de

cultivo secretados por los consorcios bacterianos. Se preparó el consorcio como se indica en el apartado 5.2, a continuación, se sembraron 160 µL en la caja de PDA que previamente se colocó un disco de celofán estéril. Las bacterias se distribuyeron homogéneamente en la superficie de la caja utilizando un hisopo de algodón estéril y se incubaron 48 h a 28 °C, pasado el tiempo de incubación se retiró el celofán de la caja Petri utilizando unas pinzas obteniendo así una caja impregnada de metabolitos secretados al medio de cultivo. Se inoculó en el centro de la caja Petri un disco de 0.5 cm<sup>2</sup> de micelio fresco del hongo 1144 y 1147 de manera independiente. Como control de comparación de crecimiento, se inoculó un disco de micelio en el centro de una caja de PDA sin metabolitos. Las placas se incubaron durante una semana a temperatura ambiente (Syed, 2019). Las placas se fotografiaron con la cámara Canon Rebel, cada ensayo se realizó por triplicado utilizando tres cajas por experimento. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial se calculó utilizando la siguiente fórmula

$$\% \text{ inhibicion} = \left[ \frac{D1 - D2}{D1} \right] \times 100$$

Dónde:

D1: Diámetro de la colonia de *Fusarium* sp creciendo en la 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.

### **5.5.2 Inhibición del crecimiento fúngico por compuestos volátiles (COVs)**

Se utilizaron cajas de Petri con una división con agar PDA, en la parte A de la caja se sembró el consorcio y se incubó la placa a 28 °C por 48 h, pasado el periodo se sembró un disco del hongo fitopatógeno en la parte B. Las cajas se sellaron y se incubaron a 28 °C por una semana. Como control, se utilizó una caja de Petri similar, en la que no se sembró bacteria. Una vez que en la caja control, el hongo cubrió la mitad de la caja, se comparó el crecimiento obtenido en las placas que contienen el consorcio. Las placas se fotografiaron con la cámara Canon

Rebel, cada ensayo se realizó por triplicado utilizando tres cajas por experimento (Syed et al., 2019).

### **5.5.3 Metabolitos con actividad antifúngica recuperados del medio de cultivo por los consorcios bacterianos**

En cajas de agar PDA con celofán se cultivaron los consorcios bacterianos (200 µL) en 4 cajas para cada consorcio. Las placas se incubaron a 28 °C durante 4 días. Posteriormente el agar se fraccionó y se colocó en frascos Schott de 0.5 L (Sureshkumar, 2021). Las muestras se congelaron durante 48 h a -20 °C, a continuación, a cada frasco se le agregaron 300 ml del solvente (hexano, acetato de etilo y cloroformo de manera independiente). La mezcla se agitó por 24 h a 28 °C. El solvente se recuperó por filtración, la fracción sólida (PDA) se eliminó. A continuación, con un embudo de separación se recuperó la fase orgánica y el solvente se eliminó en el rotavapor utilizando la temperatura de ebullición específica para cada solvente. Posteriormente se recuperaron 2 ml de cada tratamiento (metabolitos producidos por el consorcio bacteriano/solvente) en frascos ámbar cuyo peso fue determinado previamente. En baño maría se buscó evaporar a sequedad para eliminar totalmente el solvente. Por diferencia de peso se determinó la cantidad en mg de los metabolitos secundarios obtenidos, éstos se disolvieron con metanol y se pasó a tubos de plástico de 1.5 ml cubiertos en papel aluminio para proteger los compuestos de la luz (Sureshkumar et al., 2021).

### **5.5.4 Evaluación del efecto antifúngico contra *F. proliferatum* de los metabolitos producidos por los consorcios bacterianos**

Para realizar las pruebas de inhibición de crecimiento en *F. proliferatum* se utilizó agar PDA. Las conidia 1144 y 1147 se prepararon como se indicó en el apartado 5.1. Se prepararon varios tubos de tratamiento, en el cual se incluyó en cada tubo 345,000 conidia en 25 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se agregó a cada tubo 15 µL, 10 µL y 5 µL de solución fisiológica en ese orden, de manera independiente se agregaron 5 µL, 10 µL y 15 µL de cada uno de los metabolitos obtenidos a partir de los dos consorcios y los tres solventes: hexano, acetato de etilo y cloroformo. La concentración de metabolitos secundarios acetato de etilo (0.045 mg/ml) con los



consorcios 745-752c y 749-751, hexano (0.049 mg/ml) con los consorcios 745-752c y 749-751 y con cloroformo (0.048 mg/ml) con los consorcios 745-752c y 749-751). La reacción así preparada se homogeneizó utilizando el vortex y se incubó 24 h a 28 °C en agitación. Posteriormente en caja Petri con agar PDA se depositó una gota de 15 µL de cada tratamiento, se permitió que la gota se secará en la campana de flujo laminar y posteriormente se incubó en temperatura ambiente hasta por 2 semanas, el experimento se realizó por triplicado (Sureshkumar et al., 2021).

### **5.6 Medición del efecto benéfico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en las plantas de maíz, trigo y sorgo**

Se utilizaron las semillas comerciales de la variedad Aspros y Pioneer para sorgo. Ocelote y Zeus para maíz y Bernardo para el caso del trigo. Previo al tratamiento las semillas se sanitizaron con cloro. Para ello se seleccionaron las semillas y se sumergieron en una solución de cloro comercial (5ml diluido en 250 ml de agua destilada) se agitaron por 5 min, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril durante 30 min. Finalmente se dejaron en agua por 24 h. Los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 se prepararon como se indicó en el apartado 5.2. A continuación, en la campana de flujo laminar se colocaron de manera independiente en matraces de 250 ml 60 semillas para cada cereal a cada uno se le agregaron 30 ml del consorcio correspondiente y, se dejaron en contacto durante 24 h. A la mañana siguiente se eliminó el exceso de cultivo, como control se utilizó un grupo de semillas que solo fue tratada con medio de cultivo (caldo nutritivo). Las semillas se sembraron en macetas con suelo (mezcla general-Cinvestav-Unidad Irapuato) previamente esterilizado y se evaluó la tasa de germinación. Las plantas se regaron constantemente con agua corriente durante un periodo de 4 semanas, en el caso de las semillas tratadas con consorcio, se realizó una aplicación semanal del consorcio durante 4 semanas, para ello se dispensó 1ml de consorcio preparado como se mencionó anteriormente para cada una de las plántulas, en el caso del control se adicionó la misma cantidad de medio de cultivo. Pasadas las 4 semanas, se recuperaron cada una de las plantas, a éstas se les

midió el tamaño de las raíces y el alto del tallo desde la corona hasta la punta (Islam et al., 2019). Las plantas se envolvieron en papel estraza, para determinar el peso seco éstas se colocaron a 70 °C en una estufa durante 10 días. Posteriormente se determinó el peso seco de la raíz, tallo y follaje, comparando el control y tratamiento de cada planta, con unidades experimentales de 15 plantas (Islam et al., 2019).

### **5.7 Colonización de la raíz de las plantas de trigo, sorgo y maíz por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751**

De un grupo de plantas del experimento anterior se colectaron las raíces después de las 4 semanas de crecimiento. Un par de plantas para cada tratamiento, así como el control, éstas se conservaron en tubos de plástico cónicos de 50 ml estériles de manera independiente. Las raíces se sanitizaron de la siguiente forma: se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo, se usó alcohol al 70 % y cloro al 5 %, las raíces estuvieron en contacto por tres minutos con cloro, se eliminó el agente sanitizante. Se lavaron posteriormente con buffer PBS y con agua destilada estéril para eliminar el exceso de agente sanitizante. De esta forma se eliminaron las bacterias que se encuentran sobre las raíces o en el exterior de estas con el objetivo de solo recuperar bacterias endófitas que hayan sido capaces de colonizar las raíces. Para determinar la efectividad del proceso de sanitización, del último enjuague con agua destilada estéril, se tomó 1 ml y se inoculó en caldo nutritivo durante 24 h a 28 °C en agitación constante, en este caso no deberá observarse crecimiento en el caldo nutritivo (Sánchez et al., 2018).

Al comprobar que no hubo crecimiento en el caldo nutritivo, en condiciones de esterilidad las raíces fueron cortadas en segmentos de 2 cm, se colocaron en tubos de plástico cónicos estériles (50 ml) con caldo nutritivo (5 ml), se incubaron a 28 °C por 24 a 72 h para obtener el crecimiento de bacterias endófitas recuperadas a partir de las plantas con el tratamiento de los consorcios 745-752c o 749-751 en las raíces de las plantas con tratamiento, en todos los casos se incluyeron como control plantas sin consorcio bacteriano. Del caldo nutritivo donde crecieron las

bacterias endófitas se prepararon diluciones seriadas, se sembraron 100  $\mu$ L en agar nutritivo, se incubaron a 28 °C por 24 a 48 h y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas (Sánchez et al., 2018).

### **5.8 Efecto bioprotector de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas de trigo retadas con *F. proliferatum***

Se obtuvieron las conidia de las dos cepas de *F. proliferatum*, 1144 y 1147 como se indicó en el apartado 5.1. se utilizaron las variedades Maya y Urbana donadas por el Dr. Mariscal del INIFAP, ambas susceptibles a *F. proliferatum*. Para determinar el número de conidia necesarias para producir signos de la infección se inocularon plantas de trigo de 5 días posteriores a la germinación, se prepararon las siguientes cantidades de conidia en un volumen final de 5 ml;  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  el cual se inoculó en la base del tallo de la planta usando una jeringa sin ejercer daño mecánico, este experimento se realizó por triplicado con una n (unidades experimentales) de 20 plantas.

En este experimento se manejaron tres grupos, el control con un total de 32 plantas, 16 inoculadas con la cepa 1144, y 16 plantas con la cepa 1147. El grupo dos, consistió en 32 plantas, 16 infectadas con la cepa 1144 y las otras 16 con la cepa 1147, la diferencia en este caso es que estas 32 plantas se inocularon con el consorcio 745-752c una vez por semana durante las 4 semanas que duró el experimento. El tercer grupo se manejó de la misma manera que el grupo 2, pero se inoculó con el consorcio 749-751.

Los consorcios se prepararon como se indicó en el apartado 5.1, el tratamiento de las semillas y su siembra se realizó como en el apartado 5.6. Las semillas tratadas con cada consorcio se inocularon con  $1 \times 10^7$  conidia como se indicó en el párrafo anterior. El consorcio se suministró una vez a la semana. Transcurridas las 4 semanas, las plantas se manipularon como en el apartado 5.6, este ensayo se realizó por triplicado, para el análisis de datos se realizó un anova y una comparación de Tukey (95 %) para el análisis se usó el programa MINITAB

usando las medias, las diferencias entre medias se señalan en las gráficas con letras. (Islam et al., 2019).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Identificación molecular de las cepas de hongos

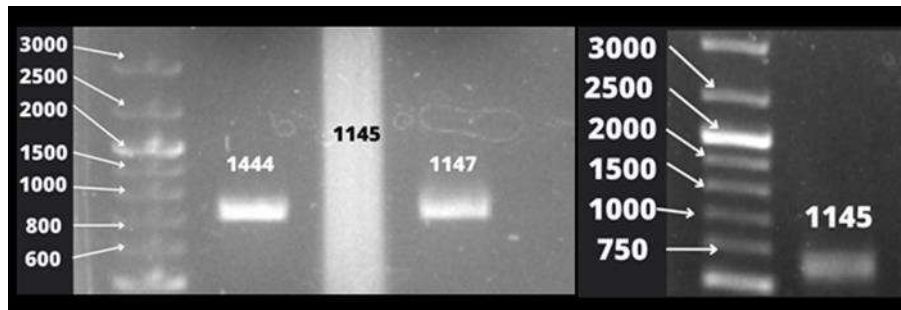
Las cepas donadas por el Dr. Mariscal correspondieron al genero *Fusarium*, debido a las características que presentó el cultivo, así como el crecimiento en la caja de agar PDA, estas cepas a nivel morfológico de la colonia corresponden a hongos del género *Fusarium* (Fig. 1)



**Figura 1.** Cepas de *Fusarium sp* crecidas en agar PDA. Las placas se incubaron a 28 °C durante 1 semana.

Para identificar a nivel molecular a estos fitopatógenos, procedimos a amplificar los marcadores moleculares ITS y el EF1 $\alpha$ . El marcador ITS es un fragmento de ADN conocido como espaciador ubicado entre la subunidad pequeña y la subunidad grande del ADNr. Es utilizado en la filogenética ya que por su tamaño es una región fácil de amplificar, esto se debe a su alto número de copias presentes en el genoma además de ser suficientemente informativa para identificar. El marcador EF1 $\alpha$  es un gen que codifica para el factor de elongación de la traducción, la secuencia de este gen entra en el complejo de especies de *Fusarium incarnatum* y estos datos ya están verificados en una base de datos, este factor de elongación se utiliza constantemente para la identificación molecular de especies de hongos fitopatógenos haciendo énfasis en hongos del género *Fusarium* en el que es ampliamente utilizado, los datos de identificación obtenidos con este marcador se han comparado con los obtenidos con el marcador ITS1-5.8S-ITS2, se observó que se obtuvieron resultados de identificación similares, clasificando así 30 especies de hongos diferentes del género *Fusarium* (Raja et al., 2017).

De la reacción de PCR realizada con las muestras de hongos a caracterizar obtuvimos un producto de amplificación de 900 pb con los oligonucleótidos 2243 y 2244 que corresponden al marcador EF1 $\alpha$  para las cepas 1144 y la 1147 (Fig. 2, panel A cepas 1144 y 1147), en el caso de la cepa 1145 se usó el marcador ITS (700 pb).



**Figura 2. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares. Gel de agarosa, marcador molecular EF1 $\alpha$  (panel izquierdo) cepas 1144 y 1147, ITS (panel derecho) cepa 1145. Marcador de peso molecular GenRuler 1kb DNA Ladder.**

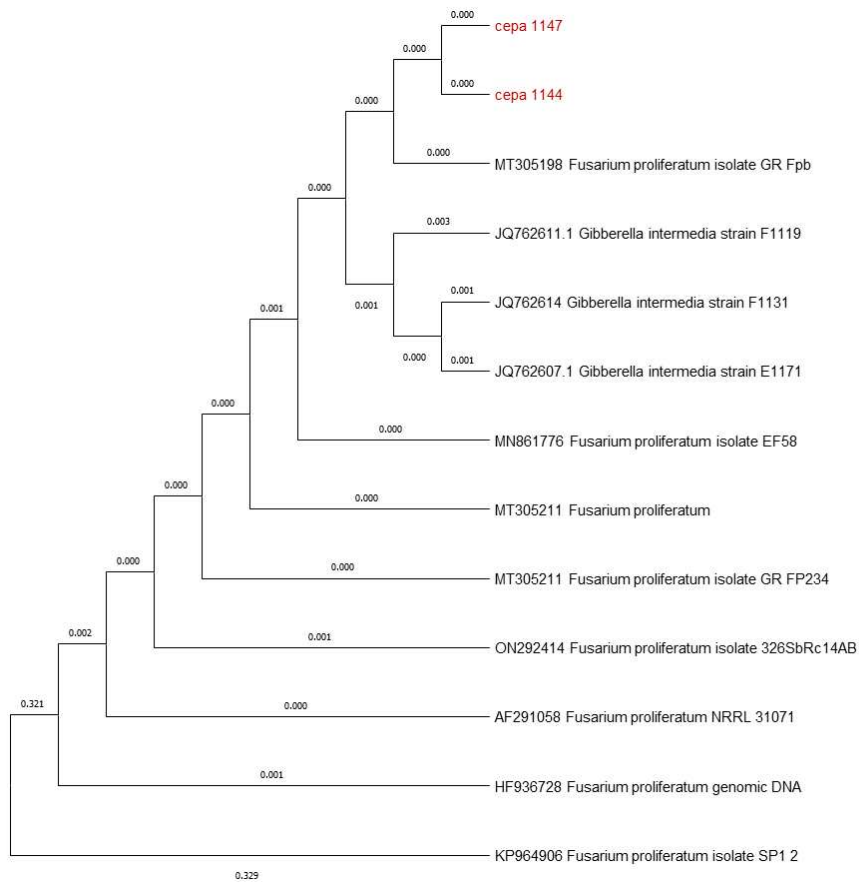
Estos marcadores moleculares son ampliamente utilizados en la identificación molecular de diferentes géneros de hongos tanto fitopatógenos como no fitopatógenos, al igual que benéficos como son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma* entre otros, aunque esta identificación va de la mano con la caracterización morfológica de las cepas. Para identificar correctamente al hongo se considera el sitio de su aislamiento. Al analizar la secuencia obtenida para cada una de las muestras en cuestión realizado en la página del NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, encontramos que los tres hongos pertenecen al género *Fusarium*, dato que correlaciona con lo previamente indicado por el Dr. Mariscal, dado que estos hongos se aislaron precisamente en el Bajío en sembradíos de trigo que presentaron signos de la enfermedad de la secadera del trigo, aunado a que la morfología colonial corresponde a *Fusarium* (Fig. 1). En cuanto al análisis realizado, los datos indican que corresponden a la especie *F. proliferatum* para las cepas 1144 y 1147, mientras que la cepa 1145 correspondió a la especie *F. fujikuroi* (Tabla 1). De las tres cepas caracterizadas solo continuamos

los experimentos con las cepas 1144 y 1147, puesto que corresponden a la especie *F. proliferatum*, la cual está directamente relacionada con la producción de enfermedad en diferentes cereales (Cordero et al., 2014).

Las secuencias obtenidas con los marcadores ITS y EFT1 $\alpha$  (apéndice 1) de los aislados se compararon utilizando la base de datos del Genbank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> para buscar niveles de homología entre el 96 y 100% con secuencias correspondientes previamente registradas, se identificó un género con mayor relación a las cepas en este caso *Fusarium* y al menos 6 especies diferentes de *Fusarium* emparentadas con las secuencias obtenidas de las cepas 1445, 1144 y 1147 que cabe mencionar, en su mayoría corresponde a especies de *Fusarium* fitopatógenos, con esta información se realizó un árbol filogenético con secuencias obtenidas de NCBI y las secuencias obtenidas para nuestras cepas (Tabla 1; Fig. 3 y 4).

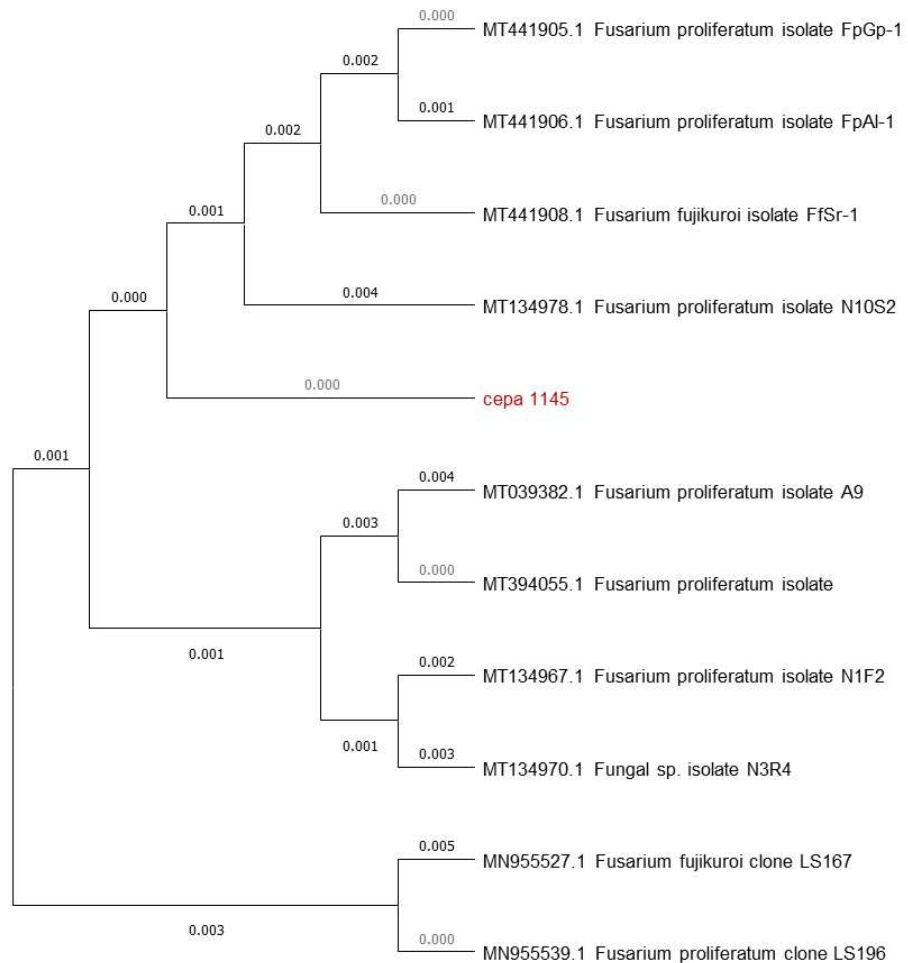
**Tabla 1.** Identificación molecular de las cepas de *Fusarium* basada en el análisis del marcador molecular ITS (1145); EF1 $\alpha$  (1144 y 1147).

Cepa	Cepa con mayor similitud	% similitud	Acceso
1144	<i>Fusarium proliferatum</i> isolate EF58	99	MN861776.1
1145	<i>Fusarium fujikuroi</i> isolate FfSr-1	99	MT441908.1
1147	<i>Fusarium proliferatum</i> isolate GR-FP120	99	MT305206.1



**Figura 3. Árbol filogenético de las cepas 1144 y 1147. Las secuencias del marcador molecular Ef1 $\alpha$  se alinearon utilizando el método de Muscle, la filogenia se realizó utilizando el método Maximum likelihood.**





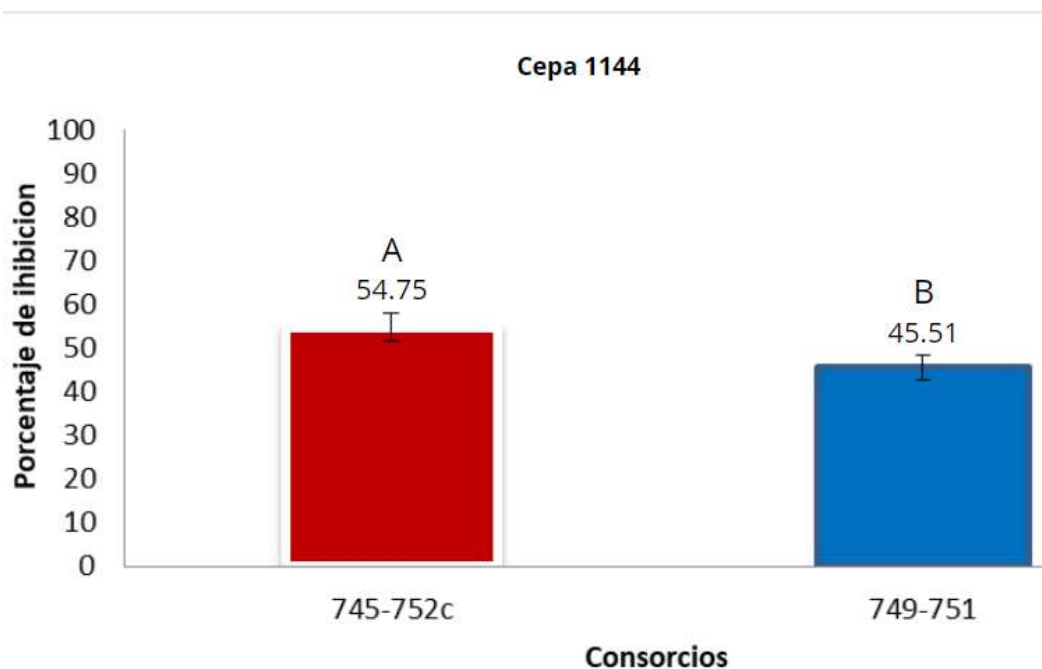
**Figura 4. Árbol filogenético de la cepa 1145. Las secuencias del marcador molecular ITS se alinearon utilizando el método de Muscle, la filogenia se realizó utilizando el método Maximum likelihood.**

## **6.2 Efecto antagónico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en *F. proliferatum***

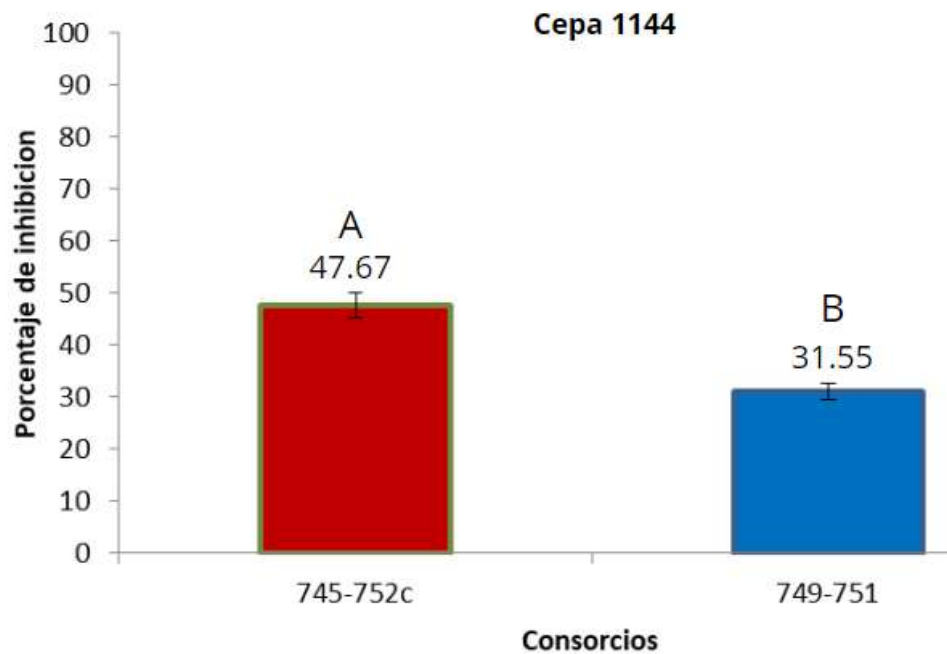
### **6.2.1 Antibiosis de los consorcios bacterianos en *F. proliferatum***

Para determinar la capacidad inhibitoria del crecimiento en *F. proliferatum* que tienen los consorcios bacterianos, se midió la reducción del crecimiento por acción de los metabolitos que estos consorcios 745-752c (*P. mediterranea* y *V. paradoxus*) y 749-751 (*P. mediterranea* y *P. antophila*) secretan al medio de cultivo, dichos metabolitos debido a su naturaleza química y tamaño difunden hacia el

medio de cultivo al atravesar una membrana semipermeable (papel celofán). Observamos una respuesta diferencial por parte de las dos cepas al efecto de los consorcios analizados. En el caso de la cepa 1144 se observó un efecto inhibitorio del crecimiento mejor por parte del consorcio 745-752c, mientras que para la cepa 1147 el consorcio 749-751 mostró mejores resultados de inhibición, aunque no tan alejados de lo obtenido con el consorcio 745-752c, ambos consorcios mostraron porcentajes de inhibición mayores al 50 % posterior a las dos semanas de crecimiento (Figura 5 y 6).

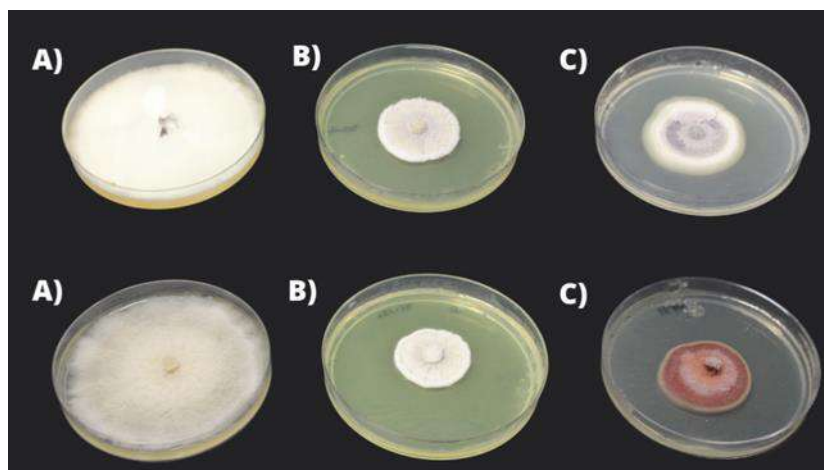


**Figura 5. Efecto antagónico en la cepa 1144 de los metabolitos secundarios producidos por los consorcios bacterianos. La cepa 1144 se inoculó en agar PDA que contiene los metabolitos secretados por los consorcios 745-752c y 749-751. Las placas se incubaron durante 2 semanas a 28 °C. Como control se creció la cepa 1144 en agar PDA libre metabolitos. Se muestra el promedio de tres experimentos realizados. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA.**



**Figura 6. Efecto antagónico en la cepa 1144 de los metabolitos secundarios producidos por los consorcios bacterianos. La cepa 1147 se inoculó en agar PDA que contiene los metabolitos secretados por los consorcios 745-752c y 749-751. Las placas se incubaron durante 2 semanas a 28 °C. Como control se creció la cepa 1147 en agar PDA libre metabolitos. Se muestra el promedio de tres experimentos realizados. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA.**

El análisis de datos con la prueba ANOVA y la comparación por el método Tukey (95 %) podemos inferir cual consorcio bacteriano inhibió mejor a las dos cepas de *F. proliferatum*. Al comparar las medias de inhibición vemos que para la cepa 1144 hay diferencia significativa entre la inhibición producida por el consorcio 745-752c y 749-751, teniendo que el consorcio 745-752c inhibe más el crecimiento de esta cepa que el consorcio 749-751, la diferencia de inhibición es de 10mm, lo que nos da una diferencia significativa entre ambos tratamientos. En el caso de la cepa 1147 la diferencia entre medias no fue significativa, fue una diferencia menor a 2mm, pero si mostró un alto porcentaje de inhibición. Ambos consorcios mostraron inhibir de manera eficaz y similar a la cepa 1147 en las pruebas realizadas. Por otro lado, para la cepa 1147, observamos que con el consorcio 749-751 produjo un cambio de pigmentación en la colonia (Figura 7).



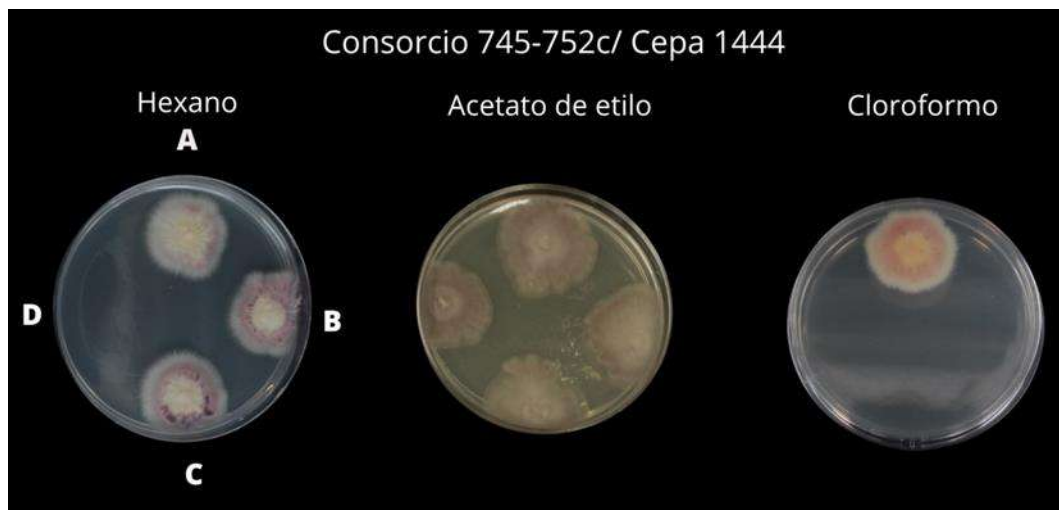
**Figura 7.** Inhibición del crecimiento en *F. proliferatum* por los metabolitos secretados al medio de cultivo por los consorcios 745-752c y 749-751. Crecimiento radial cepa 1144 (panel superior), cepa 1147 (panel inferior). A) Control, B) tratamiento consorcio 745-752c, C) tratamiento consorcio 749-751. Las placas se incubaron a 28 °C durante dos semanas. El experimento se realizó por triplicado.

#### **6.2.2 Efecto antagónico en las cepas 1144 y 1147 ejercido por el extracto de metabolitos de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751.**

Como se mencionó anteriormente son varios los mecanismos por los que las bacterias son capaces de antagonizar a hongos fitopatógenos. Evaluamos la capacidad que tienen los consorcios bacterianos para inhibir el crecimiento de las cepas de *F. proliferatum* por acción de los metabolitos que secretan al medio de cultivo. Para ello, utilizamos estos compuestos extraídos a partir de los consorcios 745-752c y 749-751 crecidos en agar PDA, extraídos con solventes orgánicos. Para ello utilizamos tres diferentes solventes: hexano, acetato de etilo y cloroformo de manera independiente, para obtener así una gama más amplia de compuestos con base a la polaridad de los solventes. Obtuvimos variación en los resultados dada la diferente polaridad, por lo tanto, el tipo de moléculas solubles en dichos solventes es distinto. El mejor resultado antagónico se observó con los compuestos extraídos utilizando el cloroformo, dado que el crecimiento del hongo se inhibió hasta en un

80 %, este valor se registró para los metabolitos obtenidos de ambos consorcios bacterianos, seguido del hexano, cuyo porcentaje de inhibición fue del 62 % para el consorcio 745-752c y para el consorcio 759-751 fue del 59%. Por último, las moléculas obtenidas con acetato de etilo mostraron un porcentaje de inhibición del 55 % pero en este caso tuvo una mejor respuesta el consorcio 749-751 en comparación del consorcio 745-752c cuyo porcentaje inhibición fue de 48 %. Cabe mencionar que la cepa 1147 mostró mayor susceptibilidad en las pruebas realizadas en comparación con la cepa 1144, resultado similar que ya se había obtenido en las pruebas de antibiosis (Figuras 8-11).

No solo se observó inhibición en estas pruebas, además apreció un cambio en la morfología de crecimiento del hongo como es la pigmentación de ambas cepas. En la cepa 1144 se desarrolló un color naranja en el borde de la colonia con un centro blanco, además que la colonia no mostró un aspecto algodonoso, más bien un aspecto áspero y el periodo de crecimiento paso de 2 semanas a 5 semanas para observar resultado. En el caso de la cepa 1147 las colonias crecieron con borde morado y centro de color naranja y en algunos casos la colonia crecía completamente blanca, en ambos casos la colonia mostró aspecto algodonoso, así como un crecimiento ovalado en lugar de circular (Figura 9).



**Figura 8. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 745-752c. Comparamos el efecto de los metabolitos**

extraídos con tres diferentes solventes.  $1.5 \times 10^6$  conidia de *F. proliferatum* se trataron durante 24 h en las siguientes condiciones: A) control (metanol 70 %), B) 5  $\mu\text{L}$  de metabolitos, C) 10  $\mu\text{L}$  de metabolitos, D) 15  $\mu\text{L}$  de metabolitos. Posterior al tratamiento se depositó una gota de 15  $\mu\text{L}$  en PDA, se incubó por 2 semanas a 28 °C y se evaluó el desarrollo de la colonia. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con Anova.

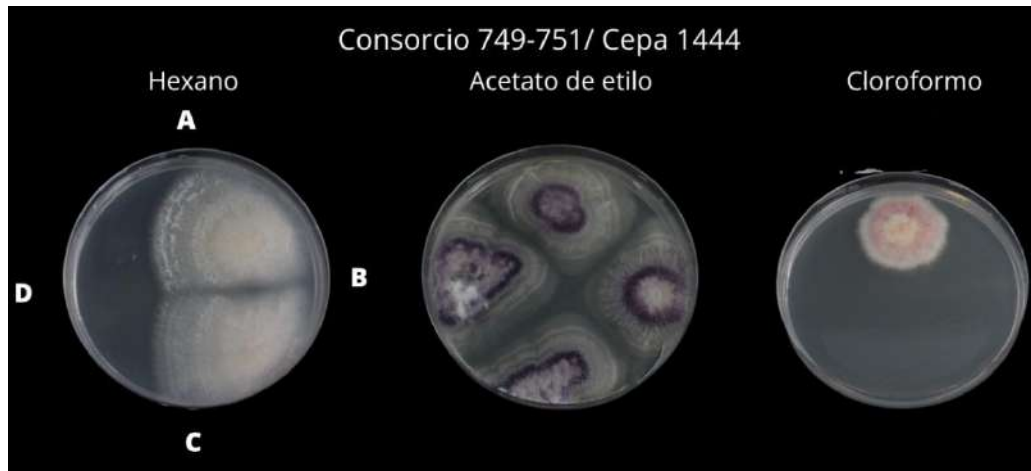
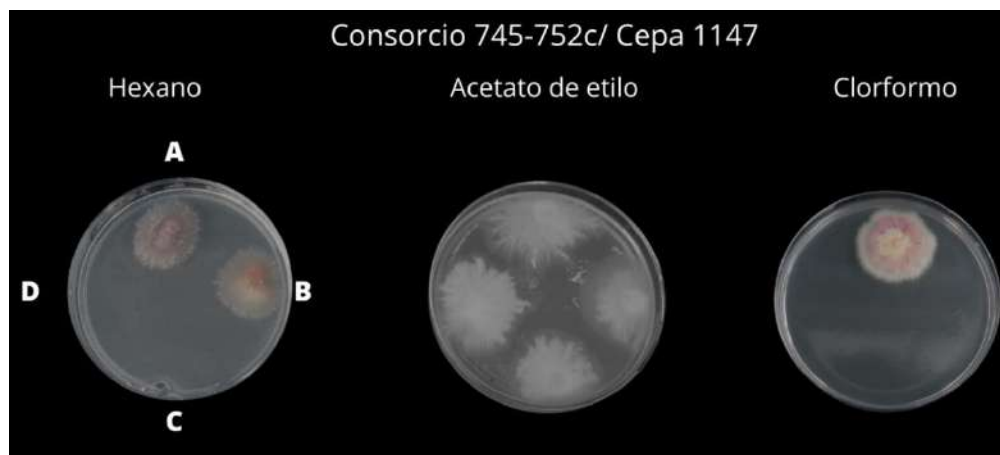


Figura 9. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 749-751. Comparamos el efecto de los metabolitos extraídos con tres diferentes solventes  $1.5 \times 10^6$  conidia de *F. proliferatum* se trataron durante 24 h en las siguientes condiciones: A) control (metanol 70 %), B) 5  $\mu\text{L}$  de metabolitos, C) 10  $\mu\text{L}$  de metabolitos, D) 15  $\mu\text{L}$  de metabolitos. Posterior al tratamiento se depositó una gota de 15  $\mu\text{L}$  en PDA, se incubó por 2 semanas a 28 °C y se evaluó el desarrollo de la colonia. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con Anova.



**Figura 10. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 745-752c. Comparamos el efecto de los metabolitos extraídos con tres diferentes solventes.  $1.5 \times 10^6$  conidia de *F. proliferatum* se trataron durante 24 h en las siguientes condiciones: A) control (metanol 70 %), B) 5  $\mu\text{L}$  de metabolitos, C) 10  $\mu\text{L}$  de metabolitos, D) 15  $\mu\text{L}$  de metabolitos. Posterior al tratamiento se depositó una gota de 15  $\mu\text{L}$  en PDA, se incubó por 2 semanas a 28 °C y se evaluó el desarrollo de la colonia. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con Anova.**



**Figura 11. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por el consorcio 749-751. Comparamos el efecto de los metabolitos extraídos con tres diferentes solventes.  $1.5 \times 10^6$  conidia de *F. proliferatum* se trataron durante 24 h en las siguientes condiciones: A) control (metanol 70 %), B) 5  $\mu\text{L}$  de metabolitos, C) 10  $\mu\text{L}$  de metabolitos, D) 15  $\mu\text{L}$  de metabolitos. Posterior al tratamiento se depositó una gota de 15  $\mu\text{L}$  en PDA, se incubó por 2 semanas a 28 °C y se evaluó el desarrollo de la colonia. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron con Anova.**

En la última década, los metabolitos secretados por bacterias promotoras de crecimiento han empezado a tener un uso más marcado en la agricultura, esto debido a que al ser un producto de origen bacteriano, las cuales de manera natural son antagónicas de algunos hongo patógenos, aunado a su efectividad y sin tener efectos secundarios en la planta y en el ambiente, pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos en este caso la germinación y desarrollo de las conidia de *Fusarium* o en dado caso que el hongo ya esté presente en el suelo, controlar su crecimiento y así evitar la invasión de las raíces, demostrando que tiene gran potencial como biocontrol de fitopatógenos (Cordero et al., 2014).

Las dos pruebas que realizamos con los metabolitos producidos por los consorcios bacterianos fueron diferentes, en una dejamos crecer los consorcios sobre la caja Petri en celofán y los retiramos para crecer el hongo directamente sobre la caja impregnada con los metabolitos secretados. En el segundo ensayo, se realizó la recuperación de los metabolitos producidos por el consorcio que fueron secretados al agar, así como los que pudieron estar presentes en el interior de la bacteria. Debido a que se utilizaron tres solventes con polaridad diferente (acetato de etilo, cloroformo y hexano), los compuestos recuperados se re-suspendieron en metanol 70 %, dado que observamos que en este solvente no se altera la viabilidad de las conidias. Los datos obtenidos mostraron que los metabolitos recuperados con cloroformo resultó ser el mejor solvente, pues en nuestro caso mostró el mejor efecto antifúngico con resultados óptimos en la inhibición de las dos cepas de *F. proliferatum*.

A la fecha, en la literatura no hay descritos compuestos antifúngicos de todos los géneros bacterianos que utilizamos, del que se tiene mayor descripción es de *Pseudomonas* que es la más utilizada para el biocontrol de fitopatógenos como es el caso de *F. proliferatum* (Cordero, 2014). Se menciona que varias especies del género de *Pseudomonas* y *Variovorax* tienen un efecto antagónico contra hongos fitopatógenos, de hecho éstas muestran efecto inhibitorio en hongos del género *Fusarium*, entre los mecanismos para realizarlo, está la producción de antibióticos ya que sintetizan varios metabolitos como lipopéptidos, fenazinas y compuestos volátiles como el ácido cianhídrico que afectan el crecimiento de los hongos fitopatógenos, además de enzimas líticas e hidrolíticas como son: celulasas, quitinasas, proteasas, así como  $\beta$ -glucanasas (Satola et al., 2013; Walterson et al., 2015; Zhou et al., 2021).

Estas enzimas podrían ser el mecanismo de acción para inhibir el crecimiento de *F. proliferatum* dada su actividad hidrolítica en los enlaces  $\beta$ -1, 3 glucano presente en la pared celular de los hongos, al romper estos enlaces de glucano, la composición de la pared celular pierde rigidez afectando así su estabilidad y por ende la capacidad de crecimiento de la célula (Mouyna et al.,



2013; Xu et al., 2016). Algunos otros metabolitos producidos por cepas del género *Pseudomonas* con actividad antifúngica, en especial de hongos, es el ácido fenazina-1-carboxílico, éste inhibe el crecimiento de varios géneros de hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium* y *Gaeumannomyces* al igual que el 2,4-diacetilfloroglucinol inhibe el crecimiento de estos hongos en pruebas *in vitro* (Preston et al., 2019; Vlot et al., 2021).

### **6.3 Los compuestos volátiles (COVs) producidos por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 inhiben el crecimiento de *F. proliferatum***

Las bacterias que son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, como se mencionó anteriormente, presentan varios mecanismos de antagonismo. En hongos fitopatógenos como *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *Botrytis cinerea* su crecimiento es antagonizado por la acción de bacterias pertenecientes a los géneros que usamos en esta investigación. *P. mediterranea* inhibe el crecimiento de los tres hongos mencionados, *V. paradoxus* se tiene registro que inhibe a *F. oxysporum* y *B. cinerea* al igual que *P. antophila*. (Xu et al., 2016). Otro mecanismo que poseen estas bacterias para controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos está dado por la producción de compuestos volátiles (COVs), (Xu et al., 2016). En nuestros experimentos encontramos que los COVs producidos por ambos consorcios, mostraron efecto inhibitorio importante en *F. proliferatum*. Los datos obtenidos de ambos tratamientos para tener un margen más amplio de comparación, entre ambos consorcios, la diferencia fue significativa en la respuesta a los consorcios bacterianos, ambos consorcios inhibieron el crecimiento de las dos cepas de hongos pero la respuesta a cada consorcio fue diferente, el consorcio 745-752c tiene una mejor respuesta inhibitoria en comparación del consorcio 749-751 (P=0.01) respecto a su efecto inhibitoria en la cepa 1147 (Figura 12 y 14). Por otro lado, en el caso de la cepa 1144 siguiendo el mismo de análisis existe diferencia significativa entre las medias de inhibición del consorcio 745-752c con respecto al consorcio 749-751, tomando en cuenta estas diferencias el consorcio con mayor rango de inhibición para la cepa 1144 fue el 745-752c (Figura 12 y 13).

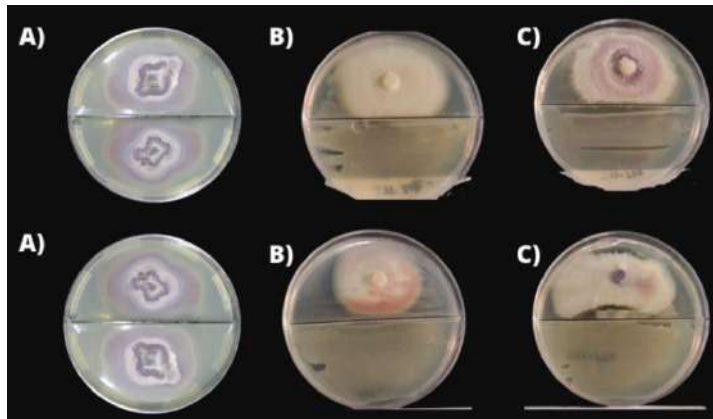


Figura 12. Inhibición de crecimiento en *F. proliferatum* por acción de los COVs producidos por los consorcios bacterianos. En una caja de PDA se inocularon sin contacto tanto el consorcio y el hongo en cuestión 1144 (panel superior) y 1147 (panel inferior) Posterior a las 2 semanas de incubación se fotografiaron las cajas A) Control, B) 745-752c y C) 749-751. El experimento se realizó por triplicado.

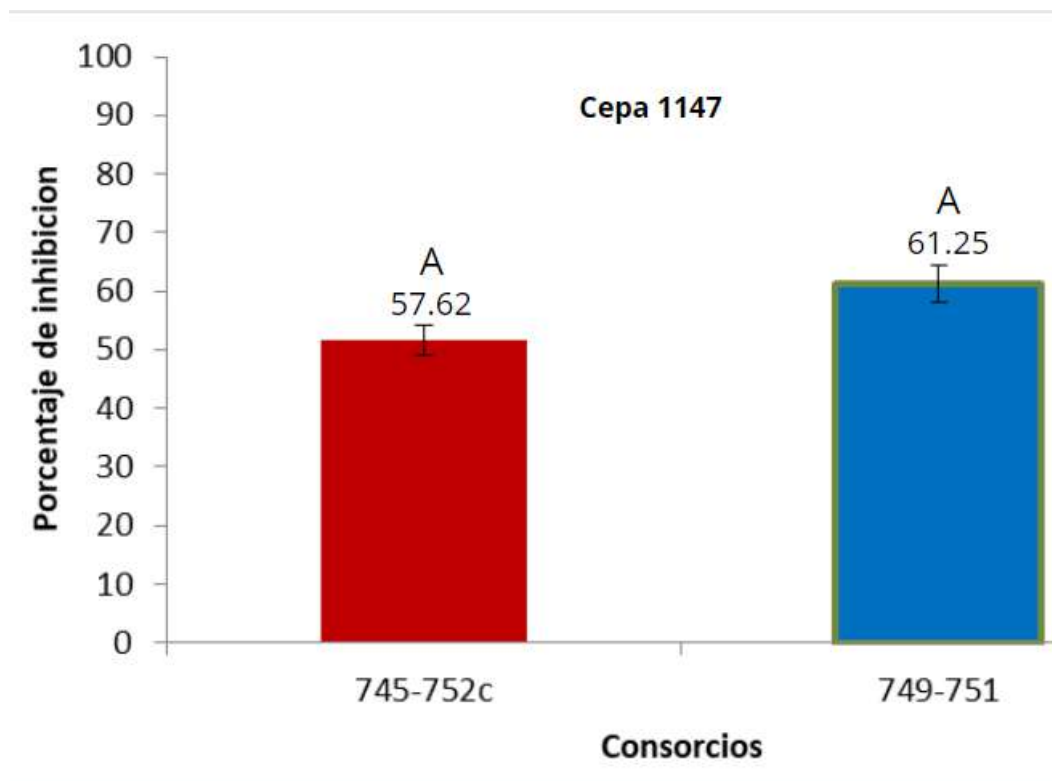
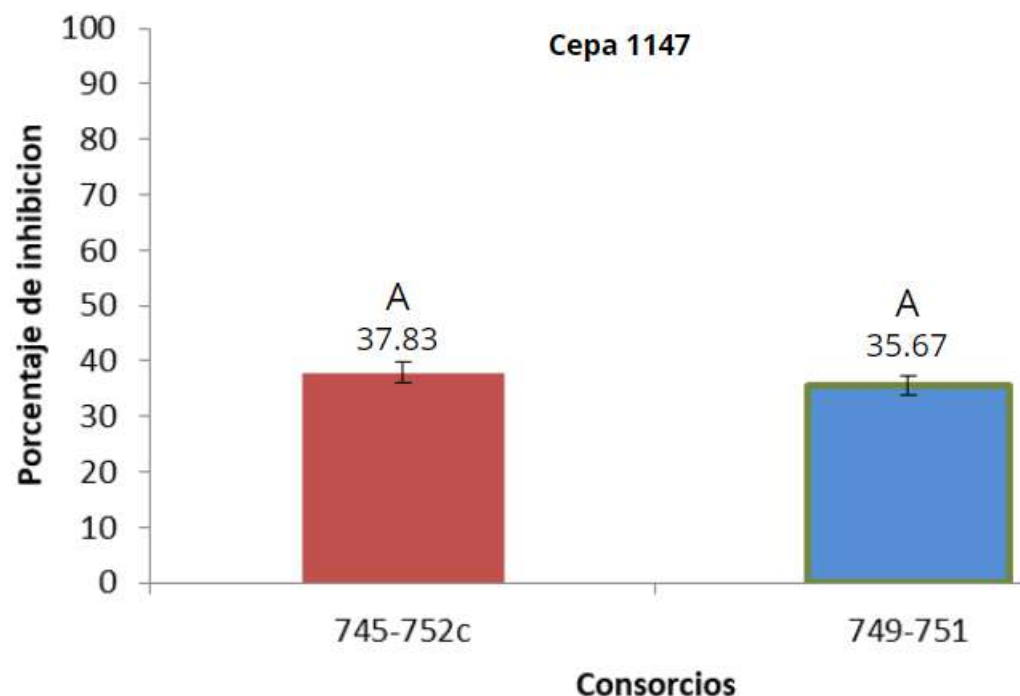


Figura 13. Efecto antagónico en la cepa 1144 por acción de COVs. Se determinó el porcentaje en la reducción del crecimiento en respuesta a los compuestos volátiles sintetizados por ambos consorcios bacterianos en agar PDA. El crecimiento radial de la colonia se midió posterior a dos semanas de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA.

Los COVs se caracterizan por ser moléculas de bajo peso molecular y su producción está relacionada con varios procesos, que incluyen la comunicación, el metabolismo, así como el efecto antagónico sobre otros microorganismos (Borrego-Muños et al., 2021). Un ejemplo de ellos es el ácido cianhídrico (HCN) que afecta el crecimiento de los hongos fitopatógenos, éste interrumpe la respiración celular, dado que es un inhibidor del citocromo oxidasa, evitando que se realice la transferencia de electrones, lo cual disminuye la producción de ATP (Preston et al., 2004; Vlot et al., 2021). En nuestro caso, las bacterias 745, 749 y 752C producen HCN (comunicación personal; Ing. Agroquímico Daniel Mendoza), por lo que el efecto inhibitorio observado en parte podría ser debido a la producción de este compuesto. Además de la inhibición del crecimiento, observamos cambios en la pigmentación del micelio. En condiciones normales las colonias de *F. proliferatum* desarrollan vellosidades blancas y después de cierto tiempo se tornan de color purpura en el centro de la colonia posterior a dos semanas de crecimiento a 28 °C, en las pruebas realizadas observamos que esta pigmentación cambia, se torna color naranja o quedar en color blanco después de dos semanas de incubación (Figura 12). El cambio de la pigmentación puede ser debido a la producción de los carotenos. Estas moléculas tienen bastantes usos, pero en este caso su utilidad está dada por la capacidad para neutralizar los radicales libres, los cuales son producidos como mecanismo de defensa por parte del hongo, en el caso de una inhibición completa se sabe que se ve alterada la producción de una proteína llamada CarS (encargada de regular la síntesis de carotenoides en *Fusarium*) (Ruger-Herreros et al., 2022 y Marente et al., 2020), deteniendo así la producción de estas enzimas y a su vez haciendo más fácil la inhibición de *Fusarium* (Sun et al., 2018 y Parra-Riivero et al., 2020).



**Figura 14. Efecto antagónico en la cepa 1147 por acción de COVs. Se determinó el porcentaje en la reducción del crecimiento en respuesta a los compuestos volátiles sintetizados por ambos consorcios bacterianos en agar PDA. El crecimiento radial de la colonia se midió posterior a dos semanas de incubación a 28 °C. El experimento se realizó por triplicado, los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA.**

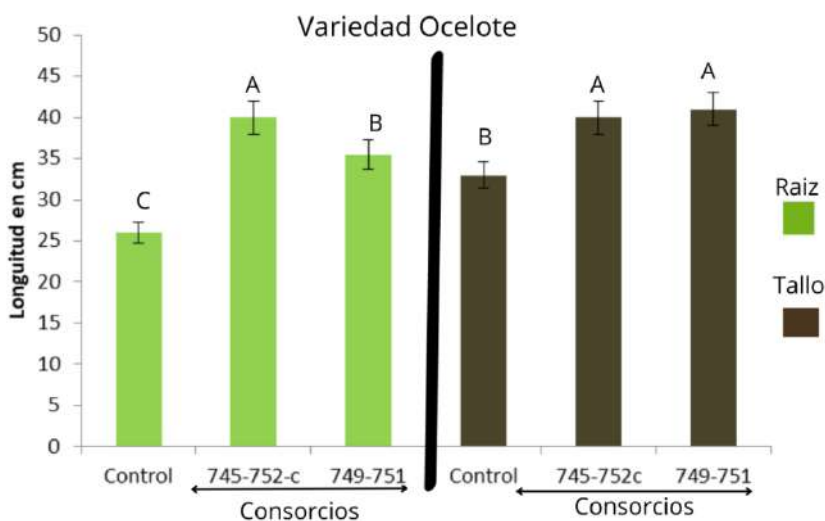
Algunas actinobacterias producen COVs como el 2-metilisoborneol, 2 feniletanol, 2,4-diacetilfloroglucinol producidos por *Streptomyces*, el cual es eficaz en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, ya que muchas de estas moléculas alteran la membrana celular, afectando la viabilidad, a su vez interfieren en la respiración celular reduciendo la producción de ATP, por último y no menos importante, interfieren en la transducción de señales; en conjunto estos mecanismos antagonizan al hongo fitopatógeno (Zhao et al., 2022).

#### **6.4 Efecto benéfico de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en plantas de maíz, trigo y sorgo**

Dado que *F. proliferatum* es capaz de producir enfermedad en cereales importantes como el sorgo, el maíz y el trigo, considerando que los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 antagonizan el crecimiento de este patógeno *in*

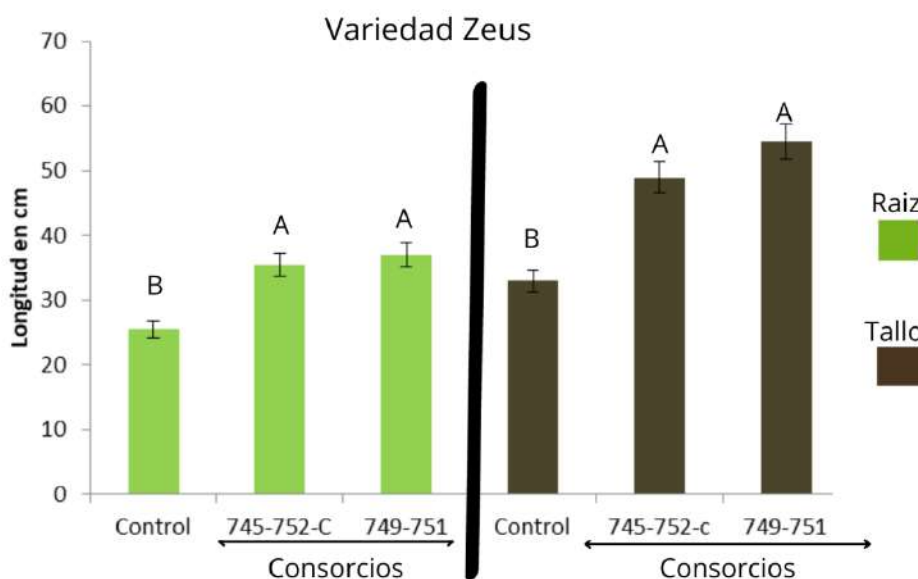
*vitro*, procedimos a determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal que puedan tener estos consorcios bacterianos en dichas plantas. Para ello se trataron las semillas de estos cereales con ambos consorcios de manera independiente (sección 5.6 de materiales y métodos). Los tres tipos de plantas respondieron de manera diferencial ante la presencia de los consorcios bacterianos, mostraron excelentes resultados con alguno de los dos consorcios dependiendo de la variedad de la semilla utilizada, para ello se evaluaron dos parámetros: el alto de la planta y el largo de la raíz.

En el caso del maíz se usaron dos variedades de semilla comerciales Ocelote y Zeus, en ambos casos la presencia de los consorcios potenció el crecimiento del tallo así como el largo de la raíz, existiendo diferencia significativa en comparación con el control al que no se le suministró la bacteria (Figura 15 y 16), cabe destacar que en la variedad Ocelote, la raíz el consorcio 745-752c tuvo un mejor desempeño al obtener raíces de mayor longitud (Fig. 15), en el caso de la variedad Zeus, no se detectó diferencia entre el efecto benéfico obtenido por parte de ambos consorcios (Figura 16).



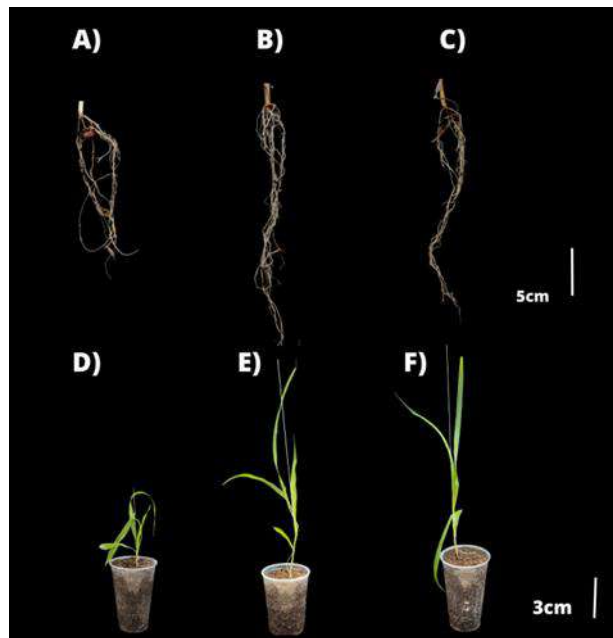
**Figura 15. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de maíz variedad Ocelote. Posterior a 4 semanas de tratamiento se midió la longitud de la raíz y del tallo de plantas de maíz tratadas con los consorcios 745-752c y 749-751 de manera independiente. El experimento se realizó por**

duplicado. La letra diferente sobre la barra indica diferencia estadísticamente significativa.

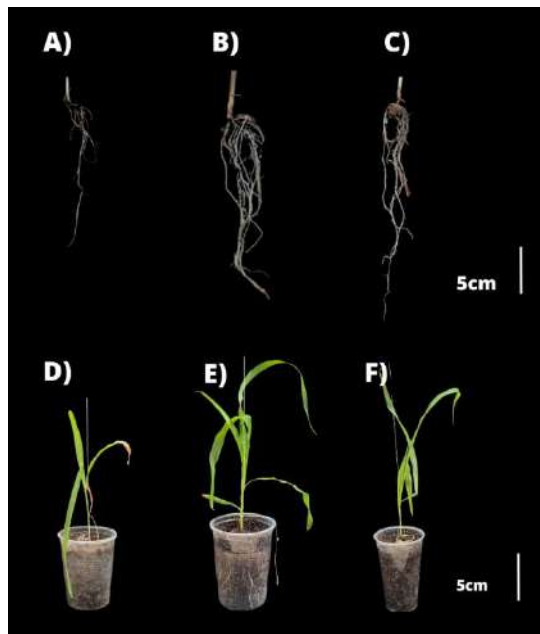


**Figura 16. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de maíz variedad Zeus. Posterior a 4 semanas de tratamiento se midió la longitud de la raíz y del tallo de plantas de maíz tratadas con los consorcios 745-752c y 749-751 de manera independiente. El experimento se realizó por duplicado. La letra diferente sobre la barra indica diferencia estadísticamente significativa.**

Un mejor desarrollo de la raíz se traduce en un aumento en la adquisición de nutrientes y de agua, este efecto benéfico se podrá ver reflejado en el llenado de los granos, así como el tamaño de la planta, permitirá tal vez producción de mazorcas con mayor peso, sería interesante en experimentos posteriores determinar la tasa fotosintética de las plantas tratadas con la bacteria, así como la producción de grano. Como se observa en las figuras 17 y 18, es clara la modificación de la arquitectura radicular propiciado por la acción de los consorcios, así como el tamaño de la planta.



**Figura 17.** Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de maíz variedad Ocelote. Las plantas se colectaron posterior a 4 semanas de tratamiento. A y D (control), B y E (consorcio 745-752c), C y F (consorcio 749-751).

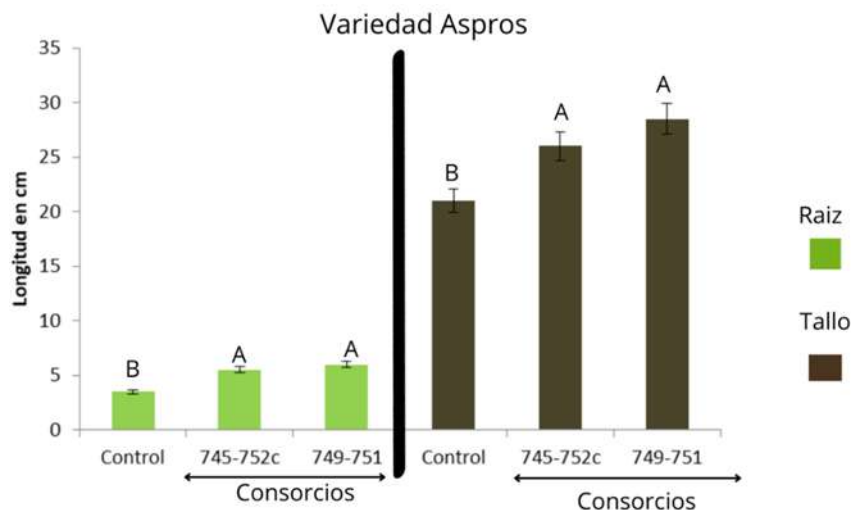


**Figura 18.** Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de maíz variedad Zeus. Las plantas se colectaron posterior a 4

**semanas de tratamiento. A y D (control), B y E (consorcio 745-752c), C y F (consorcio 749-751).**

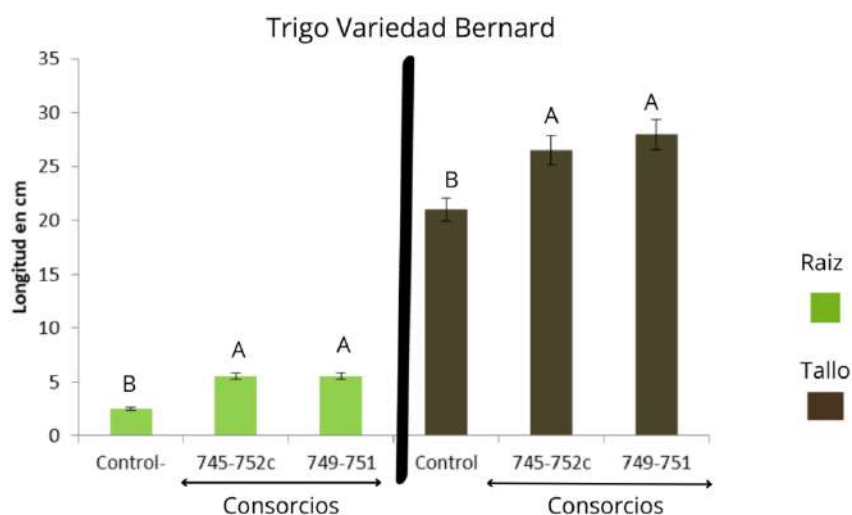
Se ha demostrado que el aumento del tamaño de la raíz y los nutrientes que esta capta conduce a una mejor producción del fruto, en tomate y pepino aumentó el crecimiento de la raíz con tratamiento bacteriano, en comparación con los controles si hubo diferencia en el crecimiento del fruto y el estado de éste (Sun et al., 2018 y Abdel et al 2021).

Por otro lado, en el caso del trigo, observamos un resultado similar puesto que hay mejor desarrollo de la planta en presencia de los consorcios bacterianos al ser comparado con el control. Se utilizó la variedad Bernard, es claro el efecto benéfico ejercido por los dos consorcios (Figuras 19 y 20).



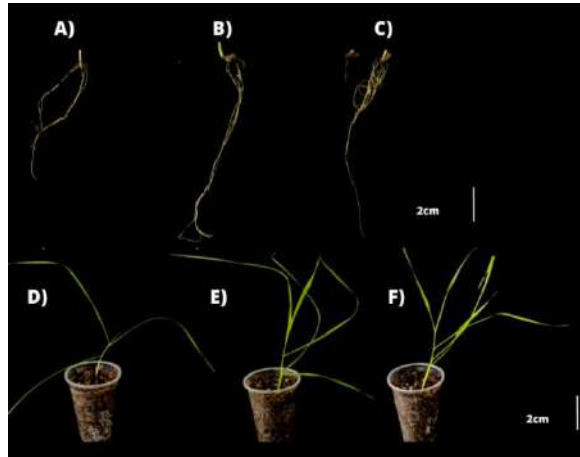
**Figura 19. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de trigo variedad Bernard. Posterior a 4 semanas de tratamiento la longitud de la raíz y del tallo de plantas de trigo tratadas con los consorcios 745-752c y 749-751 de manera independiente. El experimento se realizó por duplicado, la letra diferente sobre la barra representa diferencia estadísticamente significativa.**



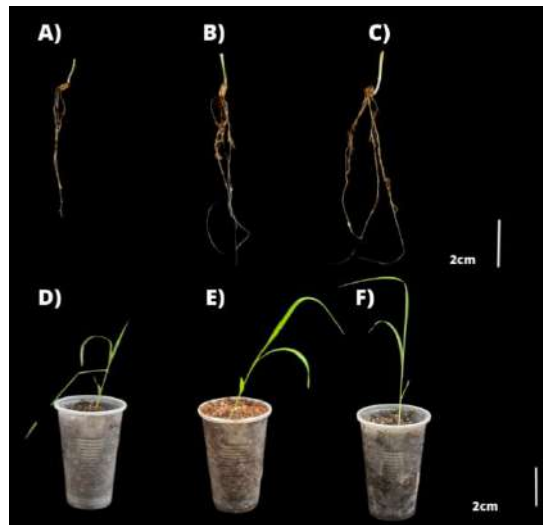


**Figura 20. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de sorgo variedad Bernard. Las plantas se colectaron posterior a 4 semanas de tratamiento. A y D (control), B y E (consorcio 745-752c), C y F (consorcio 749-751).**

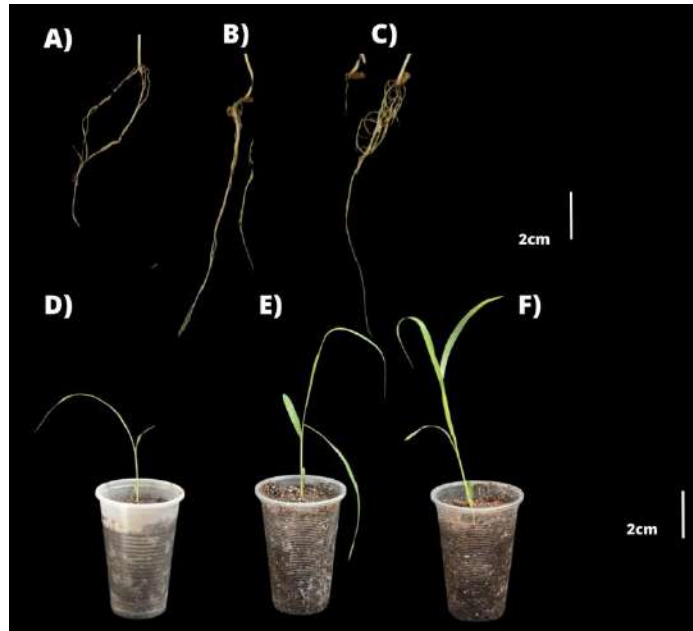
El efecto de los consorcios bacterianos también fue probado en otro cereal de importancia agronómica, el sorgo. En este caso se utilizaron dos variedades, Pioneer y Aspros. De nueva cuenta, ambos consorcios producen claros efectos benéficos en el desarrollo de la raíz, así como del tallo de la planta. En este caso, observamos que el consorcio formado por las bacterias 745-752C, mostró un mejor desempeño en cuanto al desarrollo de la raíz en la variedad Aspros (Figuras 21 y 22). Para la variedad Pioneer, ambos consorcios fueron eficaces en cuanto al desarrollo de la raíz y el tamaño del tallo (Figuras 23 y 24).



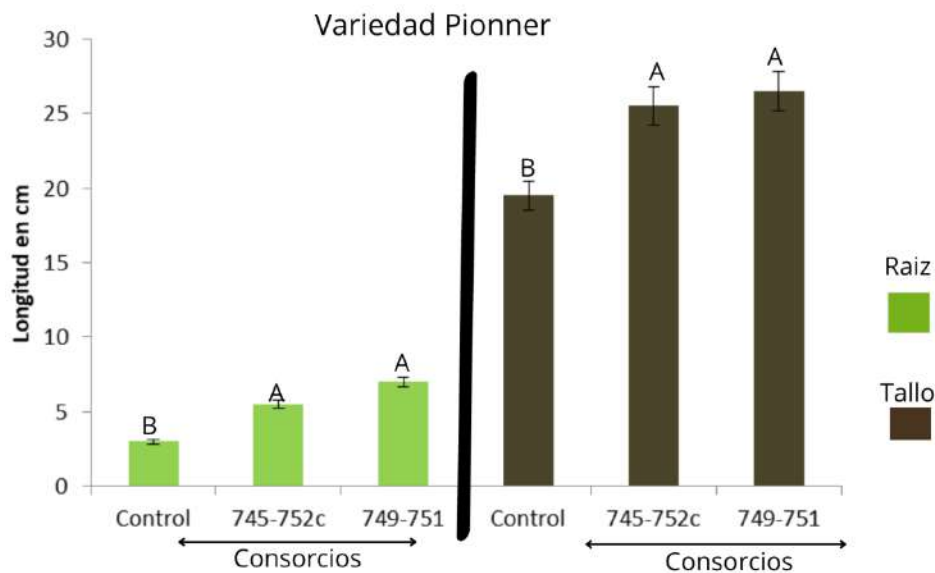
**Figura 21. Efecto benéfico ejercido por el consorcio bacteriano en plantas de sorgo variedad Aspros. Posterior a 4 semanas de tratamiento longitud de la raíz y del tallo de plantas de sorgo tratadas con los consorcios 745-752c y 749-751 de manera independiente. El experimento se realizó por duplicado. La letra diferente sobre la barra representa diferencia estadísticamente significativa.**



**Figura 22. Efecto del consorcio bacteriano en el crecimiento de la raíz y del tallo en planta de sorgo de la variedad Aspros. Las plantas se colectaron posterior a 4 semanas de tratamiento. A y D (control), B y E (consorcio 745-752c), C y F (consorcio 749-751).**



**Figura 23. Incremento en el crecimiento de la raíz y tallo el consorcio bacteriano en plantas de sorgo variedad Pioneer. Posterior a 4 semanas de tratamiento se midió la longitud de la raíz y del tallo de plantas de sorgo tratadas con los consorcios 745-752c y 749-751 de manera independiente. El experimento se realizó por duplicado. La letra diferente sobre la barra indica diferencia estadísticamente significativa.**



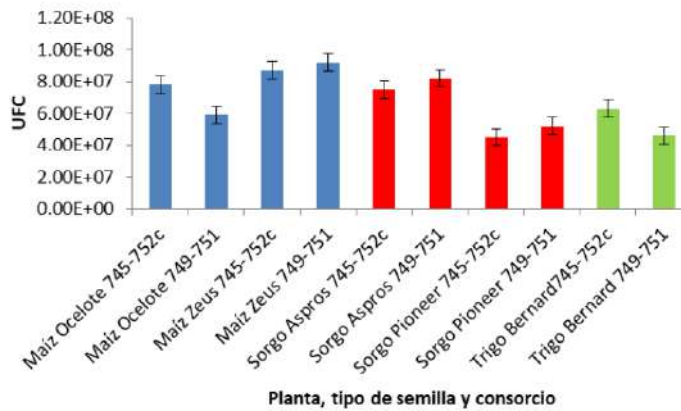
**Figura 24. Efecto promotor de crecimiento del consorcio bacteriano en la planta de sorgo de la variedad Pioneer. Las plantas se colectaron posterior a 4 semanas de tratamiento. A y D (control), B y E (consorcio 745-752c), C y F (consorcio 749-751).**

Sabemos que la interacción planta-bacteria se lleva a cabo en la rizosfera, la cual es colonizada por algunas bacterias que por quimiotaxis son atraídas hacia la planta, para esto existe especificidad que permite dicha asociación, la cual es mediada por moléculas químicas. Una vez que las bacterias colonizan las raíces de la planta, se ha demostrado que actúan como promotoras del crecimiento, ya que las bacterias hacen accesible el fósforo, el zinc que se encuentran en formas insolubles, es decir, poco accesibles para la planta. La producción de ácidos orgánicos acidifica el pH del suelo favoreciendo así la solubilización de nutrientes para la planta, esto lo realizan las bacterias en la raíz de la planta como es el caso de *Pseudomonas* lo cual a su vez atrae más bacterias a las raíces (Figuroa-López et al., 2016; Sánchez-Bautista et al., 2018).

### **6.5 Colonización de las bacterias de los consorcios 745-752c y 749-751 en las raíces de sorgo, maíz y trigo**

Como se reportó en el apartado anterior, los consorcios bacterianos ejercieron efecto benéfico en las plantas de maíz, sorgo y trigo. Una característica deseable en este tipo de bacterias es la capacidad para asociarse con la planta, es decir colonizar y comportarse como endófitas. Es por ello que se analizó si de las plantas tratadas con los consorcios, es posible recuperar las bacterias a partir de las raíces, como un indicativo de la capacidad de colonización.

Para ello, de cada tratamiento se eligió al azar cada planta la cual pasó por un proceso de sanitización descrito en el apartado 5.6 materiales y métodos. Posterior a comprobar la ausencia de bacterias en la superficie de la raíz, se procedió a macerar y a inocular en caldo y agar nutritivo las raíces. En el control (sin inocular), no se obtuvieron bacterias posteriores a 48 h de incubación a 28 °C, mientras que en las raíces provenientes de las plantas tratadas con bacteria, se obtuvo crecimiento bacteriano posterior a las 24 h de incubación a 28 °C (Figura 25).



**Figura 25. UFC obtenidas a partir de raíz colonizada. Se sembró en agar nutritivo las raíces maceradas provenientes de los tratamientos de las plantas de trigo con los consorcios bacterianos.**

La identificación de las bacterias obtenidas se corroboró con algunas pruebas bioquímicas y tinción de Gram realizadas a algunas colonias recuperadas de cada una de los tratamientos, de manera general se observó que hubo correspondencia de las bacterias inoculadas con las recuperadas (datos no mostrados).

La colonización de las bacterias en las raíces de la planta depende de tres factores importantes para que se pueda dar ese tipo de simbiosis: El *Quorum sensing*, las moléculas de señalización como el AHL (N-acil homoserina lactonas), vitaminas, aminoácidos, iones inorgánicos, y compuestos fenólicos que están muy relacionados con el desarrollo de la respuesta inmune de en las plantas, suprimiendo el crecimiento de fitopatógenos y aumentando la colonización de bacterias en las raíces como es el caso de las bacterias del género *Pseudomonas* (Deshwal et al., 2020). La adhesión de varias bacterias a la raíz por medio de interacción con receptores en la superficie de la raíz de la planta, por último la formación del biofilm de la colonia bacteriana en la superficie de la raíz dada la capacidad de secreción de exopolisacárido (Adeleke et al., 2021; Sánchez-Bautista et al., 2018).

Es importante que la bacteria presente mecanismo de locomoción como el uso de flagelos y de pili, así se moverá a regiones dentro de la planta óptimas para su crecimiento. Para que la colonización sea exitosa, las bacterias secretan

moléculas MAMP (Patrones moleculares asociados a patógenos) que inhiben la respuesta inmune de la planta contra las bacterias que las producen, también secretan enzimas que las defienden contra el estrés oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno que la planta genera para evitar la colonización de patógenos (Adeleke et al., 2021; Kumar et al., 2020).

La presencia de estas bacterias en las raíces después de 4 semanas de tratamiento resalta la relación mutualista entre estas plantas y las bacterias que estamos manejando, obviamente observamos diferentes concentraciones de las bacterias en los diferentes tipos de semillas utilizadas, esto está relacionado con los mecanismos que utilizan para formar dicha relación mutualista, así como el genotipo de la semilla utilizada (Eldridge et al., 2021; Adeleke et al., 2021; Afzal et al., 2019).

#### **6.6 Efecto bioprotector de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas de trigo en contra del hongo de *F. proliferatum***

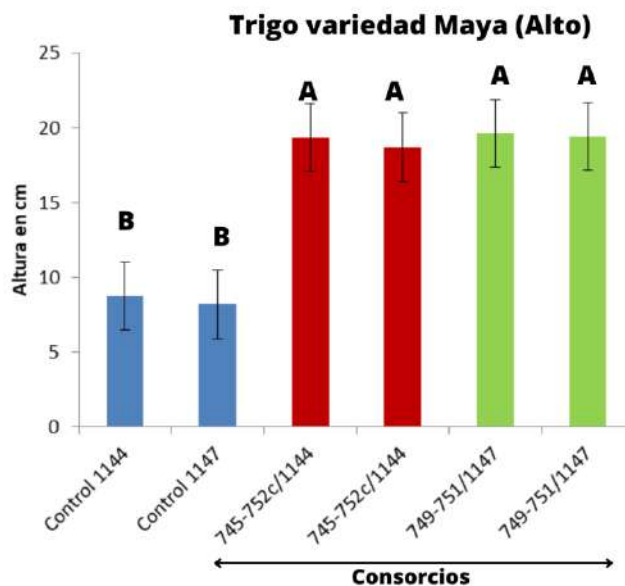
Una vez que determinamos que las bacterias de los consorcios son capaces de promover el crecimiento vegetal, de colonizar la planta, así como de inhibir el crecimiento del *F. proliferatum in vitro*, procedimos a investigar si estas bacterias son capaces de proteger a la planta cuando es retada con el hongo en cuestión. Para ello se analizó el efecto de los consorcios 745-752c y 749-751 en las plantas de trigo. Este experimento consistió en infectar las semillas de trigo una vez cultivadas con 10 millones de conidia (punto 5.7 de materiales y métodos). En este caso utilizamos de primera instancia la variedad comercial Berdard posterior a un mes después del tratamiento, no observamos signo alguno de la enfermedad (datos no mostrados).

En este experimento se manejaron tres grupos, el control con un total de 32 plantas, 16 inoculadas con la cepa 1144, y 16 plantas con la cepa 1147. El grupo dos, consistió en 32 plantas, 16 infectadas con la cepa 1144 y las otras 16 con la cepa 1147, la diferencia en este caso es que estas 32 plantas se inocularon con el consorcio 745-752c una vez por semana durante las 4 semanas que duró el

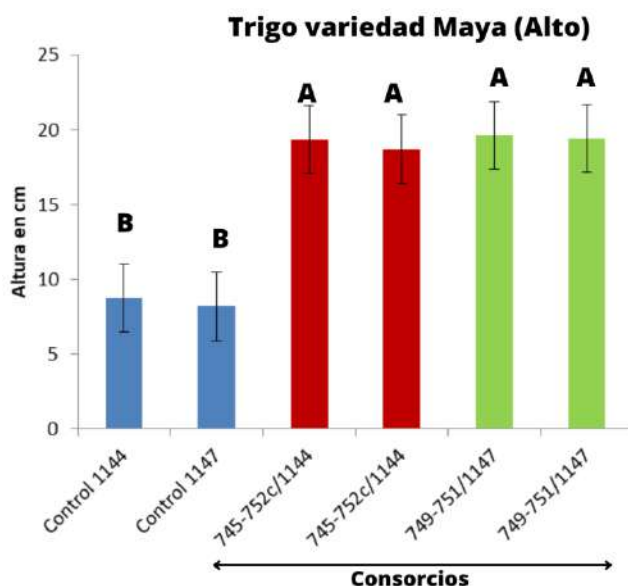
experimento. El tercer grupo se manejó de la misma manera que el grupo 2, pero se inoculó con el consorcio 749-751.

Durante el periodo de experimento se observaron diferencias entre los controles y las plantas tratadas con los consorcios, la que más resaltó fue que el control de las plantas infectadas con la cepa 1144 al final del experimento se secaron el 40 %, mientras que de las plantas infectadas con la cepa 1147 se secó el 20 % de las plantas. En el caso de las plantas con tratamiento inoculadas con el consorcio 745-752c, se secaron el 13% de las plantas inoculadas con la cepa 1144, mientras que de las plantas tratadas con la cepa 1147 no se secó ninguna. De manera similar en el tratamiento con el consorcio 749-751 y la cepa *F. proliferatum* 1144, se secó el 18% de mientras que de las plantas infectadas con la cepa 1147 ninguna planta se secó.

Así mismo, en este ensayo también determinamos el efecto promotor de crecimiento ejercido por los consorcios bacterianos en esta variedad de trigo. Las plantas con tratamiento de los consorcios crecieron mucho más rápido que los controles sin bacterias, además el tallo de la planta correspondiente al tratamiento se observó que este presentó un color verde más intenso y fue más grueso que los controles. En cuanto a la altura de la planta, observamos que éstas crecieron más debido a la presencia de las bacterias (Figuras 26, 27 y 28).



**Figura 26. Efecto promotor de crecimiento en tallo en plantas de trigo variedad Maya por los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751. Posterior a 4 semanas de tratamiento, se tomaron las medidas de la altura del tallo de las plantas con y sin tratamiento. Las plantas se infectaron con *Fusarium proliferatum* (1144 y 1147). El experimento se realizó por duplicado. La letra diferente sobre la barra indica diferencia estadísticamente significativa.**



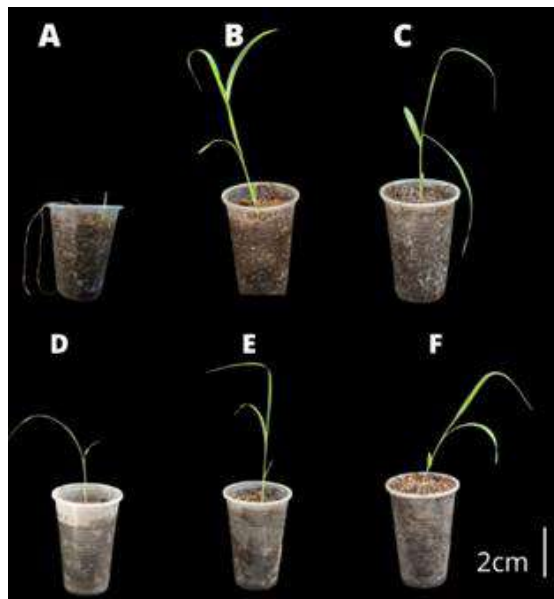
**Figura 27. Efecto promotor de crecimiento en raíz por parte de los consorcios bacterianos 745-752c y 749-751 en la variedad Maya. Posterior a 4 semanas de tratamiento, se midió la longitud de la raíz de las plantas con y sin tratamiento. Las plantas se infectaron con *Fusarium proliferatum* (1144 y 1147). El experimento se realizó por duplicado. La letra diferente sobre la barra indica diferencia estadísticamente significativa.**

Por otro lado, en el caso de las plantas control, en las que no se inoculó ningún consorcio bacteriano, se observó el crecimiento del micelio algodonoso del hongo, ya que éste creció sobre el tallo y se observó a simple vista (Figura 29). En este caso las plantas una vez que inició el fenómeno de la marchitez, éstas se secaron por completo.

Como se ha mencionado previamente, las plantas están en constante interacción con una gran gama de microorganismos, en este caso las bacterias presentan una vital importancia en el desarrollo de la planta, ya que además de



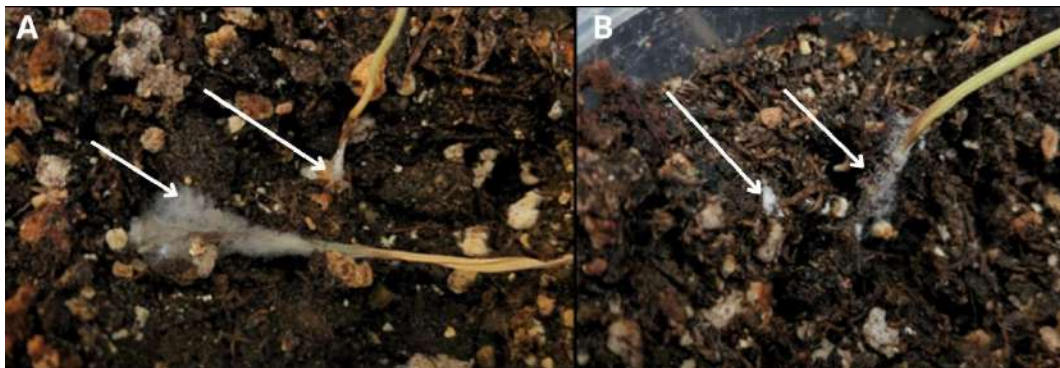
proporcionar nutrientes para su óptimo desarrollo o activar rutas metabólicas que propician el crecimiento de las raíces, también les ayuda a ser más resistentes en situaciones de estrés constante, como suelo falto de nutrientes, sequía o resistencia a patógenos como bacterias o hongos, ayudando al sistema inmune de la planta a desarrollar una respuesta óptima y agresiva contra las infecciones por microorganismos.(Kumar et al., 2020).



**Figura 28. Efecto de los consorcios 745-752c y 749-751 en plantas infectadas con *F. proliferatum*. Panel superior plantas infectadas con la cepa 1144, panel inferior con la cepa 1147. A y D controles sin tratamiento, B y E plantas tratadas con el consorcio 745-752c, C y F plantas tratadas con el consorcio 749-751. El periodo de crecimiento fue de 4 semanas.**

Esta interacción planta-bacteria esta mediada por una molécula llamada acil-homoserina lactona (AHL) esta molécula se une a un receptor tipo LuxR, estos forman un complejo que desencadena la comunicación por *Quorum Sensing*

química, mediando la óptima colonización de las bacterias en las raíces de la planta, esta señalización permite la producción de especies reactivas de oxígeno en la planta como  $H_2O_2$  y el NO, estas moléculas están relacionadas a la respuesta inmune adquirida. Otro mecanismo que desarrollan las bacterias en la planta es la Resistencia sistémica inducida, ya que, por medio de moléculas como los flavonoides, activando de manera indirecta la respuesta del sistema inmune sin desencadenar una respuesta excesiva para la defensa de los patógenos (Kumar et al., 2020; Preston et al., 2004; Vlot et al., 2021).



**Figura 29. Crecimiento de *F. proliferatum* en planta de trigo variedad Maya. Las plantas control que no se trataron con consorcios bacterianos presentaron crecimiento del hongo en la base del tallo Panel (A) cepa 1144; panel (B) cepa 1147. Las plantas se fotografiaron posterior a 4 semanas de iniciado el experimento.**

Las moléculas que producen las bacterias endófitas ayudan a generar una respuesta inmune óptima contra fitopatógenos. De algunas bacterias endófitas como *Pseudomonas* se conocen estas moléculas tales como: fenazinas, las pioluteorinas, las pirrolnitrinas, el 2,4-diacetilfloroglucinol y los lipopéptidos. Algunos de estos desencadenan respuestas asociadas a MAMP (Patrones asociados a patógenos) o activan receptores como el DAMP en la pared celular en células vegetal (Kumar et al., 2020; Vlot et al., 2021).

## 7 CONCLUSIONES

1. Las cepas de *F. proliferatum* presentaron alta susceptibilidad al antagonismo ejercido por los consorcios formados por *P. mediterranea*, *V. paradoxus* y *P. antophila*.
2. Los metabolitos producidos por los consorcios presentaron actividad antifúngica en contra de *F. proliferatum* en el tratamiento de las conidias.
3. Las bacterias que forman los consorcios son capaces de colonizar las plantas de maíz, trigo y sorgo indicando el establecimiento de una relación simbiótica mutualista.
4. Los compuestos volátiles que producen los consorcios 745-752c y 749-751 son capaces de inhibir el crecimiento de *F. proliferatum* en experimentos *in vitro*.
5. Estos consorcios podrían tener una aplicación directa en los cultivos de trigo para tratar las infecciones producidas por *F. proliferatum* al sur del país donde se ve más afectados por este patógeno.
6. Se podría aplicar de manera periódica en cultivos de maíz, sorgo y trigo para poder resistir temporadas extensas de sequía en las tierras de cultivo y la falta de nutrientes en suelo, ya que en pruebas *in vivo* demostraron mejorar el crecimiento radicular y el tallo de la planta.
7. El mayor desarrollo radicular y del tallo en plantas de maíz, sorgo y trigo se es el resultado de la actividad metabólica de los consorcios bacterianos formados por *P. mediterranea*, *V. paradoxus* y *P. antophila*. Demostrando así el efecto promotor de crecimiento de estos consorcios.
8. Los consorcios 745-752c y 749-751 proporcionan excelente bioprotección contra *F. proliferatum* a la vez que promueven el crecimiento de la planta.
9. Las bacterias que conforman los consorcios 745-752c y 749-751 colonizan la raíz de la planta, lo cual indica una relación más estrecha y asegura la persistencia de la bacteria en estado metabólicamente activo.

## **PERSPECTIVAS**

- 1.- Caracterizar la relación simbiótica entre los consorcios bacterianos con las plantas de trigo, maíz y sorgo.
- 2.- Identificar las moléculas que inhiben el crecimiento de *F. proliferatum* producidas por los consorcios bacterianos, tanto los metabolitos obtenidos con los diferentes solventes, así como los COVs.
- 3.- Realizar ensayos con los metabolitos producidos por los consorcios bacterianos en plantas para observar si la relación simbiótica es necesaria o solo depende de la presencia de los metabolitos.
- 4.- Realizar pruebas de bioprotección *in vivo* en tierras de cultivo con los consorcios 745-752c y 749-751 para determinar su efecto promotor de crecimiento en un ambiente natural.

## 8 REFERENCIAS

Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>

· Arratia-Castro, Alda A., Fernández-Herrera, Ernesto, Gómez-Espinoza, María G., Herrera-Flores, Teresa S., Moreno-Contreras, María G., Anda, Eva M. Licea-de, & Ramírez-Bustos, Irene I.. (2022). *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides* identified as causal agents of broccoli head rot in Mexico. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 28(3), 175-188. Epub 13 de diciembre de 2022. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2022.0-3.003>

· Abdel-Sattar, M., Aboukarima, A. M., & Alnahdi, B. M. (2021). Application of artificial neural network and support vector regression in predicting mass of ber fruits (*Ziziphus mauritiana* Lamk.) based on fruit axial dimensions. *PloS one*, 16(1), e0245228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245228>

· Biessy A, Filion M. (2021) Phloroglucinol Derivatives in Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, Regulation, and Functions. *Metabolites*. Mar 20;11(3):182. doi: 10.3390/metabo11030182. PMID: 33804595; PMCID: PMC8003664.

· Borrego-Muñoz, P., Ospina, F., & Quiroga, D. (2021). A Compendium of the Most Promising Synthesized Organic Compounds against Several *Fusarium oxysporum* Species: Synthesis, Antifungal Activity, and Perspectives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(13), 3997. <https://doi.org/10.3390/molecules26133997>

Bartholomew Adeleke, Olubukola Babalola, Bernard R. Glick, Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes, *Rhizosphere*, Volume 20, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>.

· Cesa-Luna, C., Baez, A., Aguayo-Acosta, A., Llano-Villarreal, R. C., Juárez-González, V. R., Gaytán, P., Bustillos-Cristales, M. D. R., Rivera-Urbalejo, A., Muñoz-Rojas, J., & Quintero-Hernández, V. (2020). Growth inhibition of

pathogenic microorganisms by *Pseudomonas protegens* EMM-1 and partial characterization of inhibitory substances. *PloS one*, 15(10), e0240545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240545>

- Chaudhary T, Shukla P. (2018). Bioinoculant capability enhancement through metabolomics and systems biology approaches. *Brief Funct Genomics* ;18(3):159-168.

- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., & Hutton, S. F. (2021). Breeding for Resistance to Fusarium Wilt of Tomato: A Review. *Genes*, 12(11), 1673. <https://doi.org/10.3390/genes12111673>

- Chrétien, P.L., Laurent, S., Bornard, I., Claire, Troulet, Maâtaoui, M.E., & Leyronas, C. (2020). Unraveling the infection process of garlic by *Fusarium proliferatum*, the causal agent of root rot.

- Cordero, P., Príncipe, A., Jofré, E., Mori, G., & Fischer, S. (2014). Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. *Archives of microbiology*, 196(11), 803–809. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1019-6>

- Costa-Gutierrez, S. B., Adler, C., Espinosa-Urgel, M., & de Cristóbal, R. E. (2022). *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(9-10), 3351–3367. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11881-7>

- Dalia Molina-Romero, S. J.-S.-G.-G.-R. (2021). A bacterial consortia interacts with diferent varieties of maize, promotes plants growth and reduces the applications of chemical fertilizes. *Frontiers* .

Deshwal, V.K., Vig, K., & Kumar, P. (2020). *Pseudomonas*. *Color Atlas of Medical Bacteriology*.

- Duc, N. H., Vo, H. T. N., van Doan, C., Hamow, K. Á., Le, K. H., & Posta, K. (2022). Volatile organic compounds shape belowground plant-fungi

interactions. *Frontiers in plant science*, 13, 1046685.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1046685>

· Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Kinga Lemieszek, M., Golec, M., & Milanowski, J. (2016). *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 23(2), 197–205.  
<https://doi.org/10.5604/12321966.1203878>

· Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environmental science and pollution research international*, 26(19), 19804–19813.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05284-x>

· Espinoza-Ahumada, César Alejandro, Gallegos-Morales, Gabriel, Hernández-Castillo, Francisco Daniel, Ochoa-Fuentes, Yisa María, Cepeda-Siller, Melchor, & Castillo-Reyes, Francisco. (2019). Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 6(16), 45-55. Epub 01 de octubre de 2019.  
<https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>.

· Espinoza-Velázquez, José, Valdés-Reyna, Jesús, & Alcalá-Rodríguez, José Manuel. (2012). Morfología y anatomía de radículas múltiples en plántulas de maíz derivadas de cariopsis con poliembrionía. *Polibotánica*, (33), 207-221. Recuperado en 23 de junio de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682012000100013&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682012000100013&lng=es&tlng=es)

· Eldridge, D.J., Travers, S.K., Val, J., Ding, J., Wang, J., Singh, B.K., & Delgado- Baquerizo, M. (2021). Experimental evidence of strong relationships between soil microbial communities and plant germination. *Journal of Ecology*, 109, 2488 - 2498.

- Fernandes, L. B., & Ghag, S. B. (2022). Molecular insights into the jasmonate signaling and associated defense responses against wilt caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 174, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.032>
- Flockton, T. R., Schnorbus, L., Araujo, A., Adams, J., Hammel, M., & Perez, L. J. (2019). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Surface Modified Polymeric Nanoparticles. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(2), 55. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020055>
- Flores-Duarte, N. J., Pérez-Pérez, J., Navarro-Torre, S., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Pajuelo, E., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2022). Improved *Medicago sativa* Nodulation under Stress Assisted by *Variovorax* sp. Endophytes. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1091. <https://doi.org/10.3390/plants11081091>
- Garcia Teijeiro R, Belimov AA, Dodd IC. (2020) Microbial inoculum development for ameliorating crop drought stress: A case study of *Variovorax paradoxus* 5C-2. *N Biotechnol.* 2020;56:103-113. doi: 10.1016/j.nbt.2019.12.0060. PMID: 31899322.
- Haber, W. (2014). *Las plantas y la vegetación. Monteverde: ecología y conservación de un bosque nuboso tropical.* Oxford University Press (versión actualizada y ampliada en español). Available from: <http://digitalcommons.bowdoin.edu/scholarsbookshelf/3/>. (Accessed December 2015), 56-138.
- Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M., Hung, S. H., Huang, E., & Huang, C. C. (2021). Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating Salinity Stress Defense in Plants: A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
- Kour D, Khan SS, Kaur T, Kour H, Singh G, Yadav A, Yadav AN. (2022). Drought adaptive microbes as bioinoculants for the horticultural crops. *Heliyon.*;8(5):e09493.



- Li, L., Zhu, T., Song, Y., Feng, L., Kear, P. J., Riseh, R. S., Sitohy, M., Datla, R., & Ren, M. (2022). Salicylic acid fights against *Fusarium* wilt by inhibiting target of rapamycin signaling pathway in *Fusarium oxysporum*. *Journal of advanced research*, 39, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.10.014>
- Lozano, C. M., DIOS, M., BODEGA, J., & GARRIDO, G. (1984). Relaciones entre los estados de desarrollo apical y características morfológicas en plantas de trigo. *Revista da Facultad de Agronomía*, 5, 51-63.
- Lugtenberg, B. J., & Dekkers, L. C. (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent?. *Environmental microbiology*, 1(1), 9–13. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00005.x>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Lv, L., Luo, J., Ahmed, T., Zaki, H. E. M., Tian, Y., Shahid, M. S., Chen, J., & Li, B. (2022). Beneficial Effect and Potential Risk of *Pantoea* on Rice Production. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(19), 2608. <https://doi.org/10.3390/plants11192608>
- Lv, L., Luo, J., Ahmed, T., Zaki, H. E. M., Tian, Y., Shahid, M. S., Chen, J., & Li, B. (2022). Beneficial Effect and Potential Risk of *Pantoea* on Rice Production. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(19), 2608. <https://doi.org/10.3390/plants11192608>
- Maitra S, Brestic M, Bhadra P, Shankar T, Praharaj S, Palai JB, Shah MMR, Barek V, Ondrisik P, Skalický M, Hossain A. (2021). Bioinoculants-Natural Biological Resources for Sustainable Plant Production. *Microorganisms* ;10(1):51
- Sauste Maria del pilar, G. I.-d.-M.-P.-P.-A. (2020). Resistance to *Fusarium* causing rots in wheat: topicality and prospects for its use in Mexico. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*.

- Martyn, R.D. (2014). Fusarium Wilt of Watermelon: 120 Years of Research.
- Mauchline, T. H., & Malone, J. G. (2017). Life in earth - the root microbiome to the rescue?. *Current opinion in microbiology*, 37, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.005>
- Mendoza-Vargas, L. A., Villamarín-Romero, W. P., Cotrino-Tierradentro, A. S., Ramírez-Gil, J. G., Chávez-Arias, C. C., Restrepo-Díaz, H., & Gómez-Caro, S. (2021). Physiological Response of Cape Gooseberry Plants to *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali*, Fusaric Acid, and Water Deficit in a Hydroponic System. *Frontiers in plant science*, 12, 702842. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.702842>.
- Méndez-Santiago, E. W., Gómez-Rodríguez, O., Sánchez-Cruz, R., Folch-Mallol, J. L., Hernández-Velázquez, V. M., Villar-Luna, E., Aguilar-Marcelino, L., & Wong-Villarreal, A. (2021). *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Archives of microbiology*, 203(2), 549–559. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>
- Marente, J., Avalos, J., & Limón, M. C. (2020). Controlled Transcription of Regulator Gene *carS* by Tet-on or by a Strong Promoter Confirms Its Role as a Repressor of Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *Microorganisms*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010071>
- Namwongsa, J., Jogloy, S., Vorasoot, N., Boonlue, S., Riddech, N., & Mongkolthananuk, W. (2019). Endophytic Bacteria Improve Root Traits, Biomass and Yield of *Helianthus tuberosus* L. under Normal and Deficit Water Conditions. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(11), 1777–1789. <https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03062>
- Parra-Rivero, O., Barros, M. P., Prado, M. D. M., Gil, J. V., Hornero-Méndez, D., Zacarías, L., Rodrigo, M. J., Limón, M. C., & Avalos, J. (2020). Neurosporaxanthin Overproduction by *Fusarium fujikuroi* and Evaluation of Its

Antioxidant Properties. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(6), 528. <https://doi.org/10.3390/antiox9060528>

· Patel, J. K., Gohel, K., Patel, H., & Solanki, T. (2021). Wheat Growth Dependent Succession of Culturable Endophytic Bacteria and Their Plant Growth Promoting Traits. *Current microbiology*, 78(12), 4103–4114. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02668-6>

· S. L. (2018). Microbial Consortia: Promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*.

· Ponsankar, A., Senthil-Nathan, S., Vasantha-Srinivasan, P., Pandiyan, R., Karthi, S., Kalaivani, K., Chellappandian, M., Narayanaswamy, R., Thanigaivel, A., Patcharin, K., Mahboob, S., & Al-Ghanim, K. A. (2023). Systematic induced resistance in *Solanum lycopersicum* (L.) against vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by *Citrullus colocynthis* and *Trichoderma viride*. *PLoS one*, 18(5), e0278616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278616>

· Raja, Huzefa A., Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, and Nicholas H. Oberlies. (2017). “Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community.” *Journal of Natural Products* 80(3): 756–70.

· Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B.N. (2017). *Fusarium oxysporum*: Genomics, Diversity and Plant–Host Interaction.

· Rocher, F., Alouane, T., Philippe, G., Martin, M. L., Label, P., Langin, T., & Bonhomme, L. (2022). *Fusarium graminearum* Infection Strategy in Wheat Involves a Highly Conserved Genetic Program That Controls the Expression of a Core Effectome. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms23031914>.

· Ruger-Herreros, M., Nordzieke, S., Vega-Álvarez, C., Avalos, J., & Limón, M. C. (2022). Relation between CarS expression and activation of carotenogenesis by stress in *Fusarium fujikuroi*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 1000129. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1000129>

· Santos Gerardo Leyva-Mir, H. E.-P.-M.-B.-H.-T.-P. (2017). CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DE PUDRICIÓN

· Satola B, Wübbeler JH, Steinbüchel A. (2013). Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97(2):541-60. doi: 10.1007/s00253-012-4585-z. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23192768.

· Sharma, A., Raina, M., Kumar, D., Singh, A., Chugh, S., Jain, S., Kumar, M., & Rustagi, A. (2022). Harnessing phytomicrobiome signals for phytopathogenic stress management. *Journal of biosciences*, 47, 6.

· Sun, S. L., Yang, W. L., Fang, W. W., Zhao, Y. X., Guo, L., & Dai, Y. J. (2018). The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 Regulates the Level of Indole-3-Acetic Acid Synthesized from Indole-3-Acetonitrile. *Applied and environmental microbiology*, 84(16), e00298-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00298-18>

· Sun, S., Lui, Q., Han, L. et al. Identification and Characterization of *Fusarium proliferatum*, a New Species of Fungi that Cause Fungal Keratitis. *Sci Rep* 8, 4859 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23255-z>

· Sun, W., Lei, T., Yuan, H., & Chen, S. (2022). Occurrence of root rot caused by *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum* on peanut in China. *Plant disease*, 10.1094/PDIS-02-22-0438-PDN. Advance online publication. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0438-PDN>.

· Sureshkumar, S., Merlin, I., Prasai, J. R., Rajapriya, P., & Pandi, M. (2022). Antioxidant, antibacterial, cytotoxicity, and phytochemical potentials of fungal bioactive secondary metabolites. *Journal of basic microbiology*, 62(11), 1379–1392. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100680>

· Syed-Ab-Rahman Sharifah Farhana, Carvalhais Lilia C., Chua Elvis T., Chung Fong Yi, Moyle Peter M., Eltanahy Eladl G., Schenk Peer M. (2019). “Soil

Bacterial Diffusible and Volatile Organic Compounds Inhibit *Phytophthora capsici* and Promote Plant Growth.” *Science of The Total Environment* 692: 267–80.

· Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A. D., Joshi, P., Nazim, S., & Gupta, H. S. (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in applied microbiology*, 46(2), 171–175. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02282.x>

· Sun, Y.R., Holm, P.E., & Liu, F. (2018). Alternate partial root-zone drying irrigation improves fruit quality in tomatoes. *Horticultural Science*, 41, 185-191.

· Torres Lara A. 2020. Caracterización fisiológica y actividad antagónica de bacterias aisladas de huerta de fresa con manejo orgánico contra hongos fitopatógenos [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]

· Usuda, Y., Nishio, Y., Nonaka, G., & Hara, Y. (2022). Microbial Production Potential of *Pantoea ananatis*: From Amino Acids to Secondary Metabolites. *Microorganisms*, 10(6), 1133. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061133>

· Uzair B, Kausar R, Bano SA, Fatima S, Badshah M, Habiba U, Fasim F. (2018). Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging In Vitro Plant Growth Promoting Characteristics. *Biomed Res Int*.m2018:6147380. doi: 10.1155/2018/6147380. PMID: 29568759; PMCID: PMC5820566.

· van den Broek, D., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. (2005). The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental microbiology*, 7(11), 1686–1697. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00912.x>

· Vega-Gutiérrez, T. A., López-Urquídez, G. A., Allende-Molar, R., Amarillas-Bueno, L. A., Romero-Gómez, S. J., & López-Orona, C. A. (2019). Aggressiveness and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with

foot rot and wilt in Tomato in Sinaloa, Mexico. *3 Biotech*, 9(7), 276. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1808-3>

· Verma, S. K., Kingsley, K. L., Bergen, M. S., Kowalski, K. P., & White, J. F. (2018). Fungal Disease Prevention in Seedlings of Rice (*Oryza sativa*) and Other Grasses by Growth-Promoting Seed-Associated Endophytic Bacteria from Invasive *Phragmites australis*. *Microorganisms*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010021>

· Vlot, A. C., Sales, J. H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A., Chen, Y., Wenig, M., & Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *The New phytologist*, 229(3), 1234–1250. <https://doi.org/10.1111/nph.16953>

· Walterson AM, Stavriniades J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Rev*. 39(6):968-84. doi: 10.1093/femsre/fuv027. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26109597.

· Win, K. T., Kobayashi, M., Tanaka, F., Takeuchi, K., Oo, A. Z., & Jiang, C. J. (2022). Identification of *Pseudomonas* strains for the biological control of soybean red crown root rot. *Scientific reports*, 12(1), 14510. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18905-2>

· Wu, H., Hu, P., Xu, Y., Xiao, C., Chen, Z., Liu, X., Jia, J., & Xu, H. (2021). Phloem Delivery of Fludioxonil by Plant Amino Acid Transporter-Mediated Polysuccinimide Nanocarriers for Controlling *Fusarium* Wilt in Banana. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(9), 2668–2678. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07028>.

· Yang, W. T., Yi, Y. J., & Xia, B. (2023). Unveiling the duality of *Pantoea dispersa*: A mini review. *The Science of the total environment*, 873, 162320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162320>

· Yixian Lin, H. Z. (2022). The bacterial consortia promote plant growth and secondary metabolite accumulation in *Astragalus mongholicus* under drought stress. *BMC Plant Biology*.

- Yixian Lin, H. Z. (2022). The bacterial consortia promote plant growth and secondary metabolite accumulation in *Astragalus mongholicus* under drought stress. *BMC Plant Biology*.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in microbiology*, 13, 922450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>
- Zhou, L., de Jong, A., Yi, Y., & Kuipers, O. P. (2021). Identification, Isolation, and Characterization of Medipeptins, Antimicrobial Peptides From *Pseudomonas mediterranea* EDOX. *Frontiers in microbiology*, 12, 732771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.732771>
- Islam, A., Md. Shahinur Kabir, and Abul Khair. (2019). Molecular Identification and Evaluation of Indigenous Bacterial Isolates for Their Plant Growth Promoting and Biological Control Activities against *Fusarium* Wilt Pathogen of Tomato. *The Plant Pathology Journal*, 35(2), 137-148.
- Sánchez Alma, León-García de Alba, Carlos De, Aranda-Ocampo, Sergio, Zavaleta-Mejía, Emma, Nava-Díaz, Cristian, Goodwin, Paul H., & Leyva-Mir, Santos G. (2018). Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 35-55. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-3>

## Apéndice 1: Secuencias

### Secuencia de la cepa 1144

TCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGATGAGCTTATCT  
GCCATCGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAATATG  
CTGACATCGCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGAC  
AAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATCGCGC  
GTCCTCTGCCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGCTACCCCGCT  
CGAGACCAAAAATTTTGGGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCC  
CGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTCCCTGTCCACAACCTCAATG  
AGCGCATTGTACAGTGTCAAGCAACGACTAACCATTGACAATAGGAAGCCGC  
TGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGG  
CCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACT  
CCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCTTACTTCATCCTACTT  
CCTCATACTAACATATCATTGAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTATCAAGAA  
CATGATCACTGGTACCTCCACGTCTGATGATATGTTAGTATGAGGAAGTAGGAT  
GAAGTAAGAGCGACAACATACCAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCG  
AACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAG  
CTTGTCAAGAACCAGGCGTACTTGAAGGAACCCTTACCGAGCTCAGCGGCTT  
CCTATTGTGCAATGGTTAGTCGTTGCTTGACACGTGACAATGCGCTCATTGAG  
GTTGTGGACAGGAAAGGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAA  
ATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCAATATCGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGG  
GTAGCAGGCACGTTTTGCAATCGCAAGTGAAATCGGTGGGCAGAGGACGCGCG  
ATCGAAGGGAAAGTGAATAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTCGCTTGTGAT  
ACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAGCGATGTCAGCATATT  
GTCTTCCAAGATGTACCCCGCCAGATCTTGGTCAGGATCACGATGGCAGATAA  
GCTCATCGTCCAGGGTAGTACTCACAGTGGTTCGACTTGCCAGAGTCGACGTG  
GCCGATGACGACGACGTTAAGGTGAGTCTTGTCTCCTTACCCATA

### Secuencia de la cepa 1147

TCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGATGAGCTTATCT  
GCCATCGTGATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGAAGACAATATG  
CTGACATCGCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGAC  
AAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATCGCGC  
GTCCTCTGCCCACCGATTTCACTTGCGATTGAAACGTGCCTGCTACCCCGCT  
CGAGACCAAAAATTTTGGGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCC  
CGCCACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTTGCCTTTCCCTGTCCACAACCTCAATG



AGCGCATTGTCACGTGTCAAGCAACGACTAACCATTTCGACAATAGGAAGCCGC  
TGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGG  
CCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACT  
CCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCTTACTTCATCCTACTT  
CCTCATACTAACATATCATTACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAA  
CATGATCACTGGTACCTCCACGTCTGATGATATGTTAGTATGAGGAAGTAGGAT  
GAAGTAAGAGCGACAACATAACCAATGACGGTGACATAGTAGCGAGGAGTCTCG  
AACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAG  
CTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCCTTACCGAGCTCAGCGGCTT  
CCTATTGTGCAATGGTTAGTCGTTGCTTGACACGTGACAATGCGCTCATTGAG  
GTTGTGGACAGGAAAGGGCAAAAACGCGCCCATCGCTCGAGTGGCGGGGTAA  
ATGCCCCACCAAAAAAATTACGGTTCATATCGCAAAATTTTTGGTCTCGAGCGGG  
GTAGCAGGCACGTTTTGCAATCGCAAGTGAAATCGGTGGGCAGAGGACGCGCG  
ATCGAAGGGAAAGTGATAACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTTTCGCTTGTGATA  
CCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTGAAGCGATGTCAGCATATTG  
TCTTCCAAGATGTACCCCGCCAGATCTTGTGAGGATCACGATGGCAGATAAGC  
TCATCGTCCAGGGTAGTACTCACAGTGGTCGACTTGCCAGAGTCGACGTGGCC  
GATGACGACGACGTTAAGGTGAGTCTTGTCTC

### **Secuencia de la cepa 1145**

TGTGACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGG  
ACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAA  
ACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCGGATTTCTGGCGGGCATGCCTGTT  
CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGA  
GCCCTTGCGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTC  
CATTGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCCAAGCCGT  
TAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGA  
ACTTAAGCATATCAATATGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGGTTTAAACG  
GCTTGGCCGCGCCGCGTACCAGTTGCGAGGGTTTTACTACTACGCAATGGAA  
GCTGCAGCGAGACCGCCACTAGATTTGCGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCG  
CCGATCCCCAACACCAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAAC  
AGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGAT  
GATCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTGTGCTGCGTTCTTCAT  
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTA  
CTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGTCTCTGGCGGGCCGTC

GTTTTACGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAG  
GGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTCCCCTACGGAA