



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR MICROBIANA

TESIS

**Estudio de biocontrol de endófitos y rizobacterias sobre hongos
endófitos cultivables de semillas de *Pinus chiapensis*.**

**Tesis presentada para obtener el título de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLÓGICAS)**

**PRESENTA
MONICA MUÑOZ FLORES**

**DIRECTOR:
D. C. Ricardo Carreño López**

Diciembre

2020

ÍNDICE

Resumen	- 5 -
Abstract	- 5 -
INTRODUCCIÓN	- 6 -
<i>Pinus</i>	- 6 -
<i>Pinus chiapensis</i>	- 6 -
ANTECEDENTES	- 8 -
JUSTIFICACIÓN	- 16 -
HIPÓTESIS	- 16 -
OBJETIVOS	- 17 -
Objetivo general	- 17 -
Objetivos específicos	- 17 -
Materiales y Métodos	- 18 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 23 -
CONCLUSIONES	- 55 -
BIBLIOGRAFÍA	- 56 -
Anexos	- 66 -

Resumen

En esta tesis se trabajaron con hongos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Diaporthe* y bacterias del género *Bacillus* y *Paraburkholderia* previamente aisladas de la semilla y la rizosfera de *P. chiapensis*. Se hicieron ensayos de antagonismo de bacterias contra hongos en donde el género *Bacillus* inhibió el crecimiento de los hongos, principalmente a *Diaporthe* y *Cladosporium*. En el caso particular del aislado *Bacillus* E presentó el mayor espectro de acción antagonista ya que también disminuyó el crecimiento no solo de los antes mencionados, sino también de los hongos *Penicillium* y cinco aislados identificados como *Trichoderma* sp. Por otra parte, aislamientos pertenecientes al género *Paraburkholderia*, por el contrario, el efecto antagonista fue nulo sobre aislados de los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*. Así mismo, se llevaron a cabo co-inoculaciones, de todas las bacterias, en donde la dinámica bacteriana que se da en co-cultivo o juntando las bacterias inhiben de manera similar el crecimiento de los hongos. Dentro de las bacterias que se trabajaron, *Bacillus* E presentó el mayor biocontrol sobre los hongos por lo que se estudió algunos de los probables mecanismos de biocontrol, dando positivo a producción de metabolitos secundarios, producción de compuestos volátiles, lipopéptidos, proteasas, celulasas, lipasas y glucanasas.

Abstract

In this thesis we worked with fungi of the genus *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Diaporthe* and bacteria of the genus *Bacillus* and *Paraburkholderia* previously isolated from the seed and rhizosphere of *P. chiapensis*. Bacteria antagonism trials were made against fungi where the genus *Bacillus* inhibited the growth of fungi, mainly *Diaporthe* and *Cladosporium*. In the particular case of the isolated *Bacillus* E presented the biggest spectrum of antagonistic action since it also diminished the growth not only of the above mentioned, but also of the fungi *Penicillium* and five isolated identified as *Trichoderma* sp. On the other hand, isolates belonging to the genus *Paraburkholderia*, on the contrary, the antagonistic effect was null on isolates of the genus *Penicillium* and *Cladosporium*. Likewise, were carried out co-inoculations, of all the bacteria, where the bacterial dynamics that occurs in co-culture or joining the bacteria inhibit in a similar way the growth of the fungi. Among the bacteria that were worked, *Bacillus* E presented the greatest biocontrol over the fungi so it was studied some of the probable mechanisms of biocontrol, giving positive to the production of secondary metabolites, production of volatile compounds, lipopeptides, proteases, cellulases, lipases and glucanases.

INTRODUCCIÓN

Pinus

El género *Pinus* incluye más de 100 especies reconocidas, siendo así el más grande de la familia Pináceas (Farjon, 2005; Gernandt *et al.*, 2005). Los pinos, perteneciente al grupo de las coníferas, se consideran el género de árboles más importante, tanto desde una perspectiva ecológica como económica. Muchas especies de pino son de alto valor económico como fuentes de madera, pulpa, nueces, resina y una variedad de otros productos (Richardson y Rundel, 1998).

Ecológicamente, los pinos son a menudo un componente dominante de los bosques del hemisferio norte, proporcionando una fuente esencial de alimento, hábitat para una amplia variedad de especies de animales y aves, además de desempeñar un papel crucial en los procesos biogeoquímicos (Richardson y Rundel, 1998). El cambio global está provocando un aumento en la incidencia de perturbaciones naturales y antropogénicas en los bosques, que frecuentemente interactúan de manera sinérgica y promueven cambios en la estructura, composición y funcionamiento de los bosques (Alfaro *et al.* 2019). Los ecosistemas forestales están actualmente sujetos a una amplia gama de perturbaciones naturales y antrópicas que representan una amenaza en las poblaciones forestales (Prävālie, 2018), la tasa de mortalidad de los árboles ha aumentado temporalmente con el cambio climático; acompañado de un crecimiento reducido o un mayor crecimiento a una tasa inferior a la pérdida de mortalidad real (Brecka *et al.* 2018), por lo que afecta severamente la población pinácea.

Pinus chiapensis

P. chiapensis (Martínez) Andresen, taxonómicamente ubicado hasta 1964 como *Pinus strobus* var. *chiapensis* Martínez, se denomina con varios nombres comunes en los que se incluye pinabete, tonatzin, cuctoj y pino gretado (CONAFOR, 2020); es un árbol nativo de Guatemala y México. En nuestro país, es más abundante en los estados de Oaxaca y Chiapas, aunque también se encuentra en pequeñas poblaciones aisladas en los estados de Guerrero, Puebla y Veracruz (Perry, 1991; Farjon & Styles, 1997; Del Castillo *et al.* 2009).

El árbol puede alcanzar una gran altura hasta más de 50 m con un diámetro hasta de 1 m, y se encuentra tanto en suelos fértiles como infértiles en ambientes tropicales y subtropicales, generalmente en sitios húmedos con una precipitación anual de 1500–2000 mm (Dvorak *et al.*, 1996).

Como con muchas otras especies de pinos en México, la mayoría de las poblaciones de *P. chiapensis* han sido fuertemente explotadas para obtener madera (Perry *et al.*, 1998). El árbol es cosechado por al menos 11 grupos étnicos nativos en el sur de México, que usan la madera para la construcción, fabricación de muebles y leña; la resina del árbol también se usa con

fines medicinales (Newton *et al.*, 2002). La madera es suave, notablemente uniforme, estable y muy adecuada para fines de construcción, paneles, tallados en madera, muebles y pequeños objetos de madera, como palitos de fósforos, palillos de dientes y pinzas para la ropa, aunque puede no ser adecuada para fines estructurales donde la fuerza es requerida. Sin embargo, en los pueblos rurales, los troncos se usan como vigas en los techos de casas y edificios. La madera se usa como leña para cocinar y para la fabricación de muebles, y puede preferirse a la de otras especies de pinos coexistentes. La resina es una fuente de combustible y se usa en humanos y animales domésticos como ungüento en heridas y fracturas óseas. Se dice que un extracto de resina es útil como analgésico para el dolor (Del Castillo *et al.*, 2009). El cambio de uso de suelo y explotación inadecuada, han favorecido a que dicha especie esté desapareciendo rápidamente de muchas zonas. Por lo anterior, *Pinus chiapensis* esté incluida en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL como especie protegida (SEMARNAT, 2010). *P. chiapensis* una especie de importancia económica, sin embargo, algunas poblaciones han sido severamente reducidos o desaparecidos en los últimos años debido a los cambios de uso del suelo y la sobreexplotación de su calidad de la madera. Esta especie está clasificada como 'vulnerable' según los criterios de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), y necesita 'protección especial' por parte de la agencia ambiental del Gobierno de México (Domínguez *et al.*, 2020).

Genéticamente, los pinos se encuentran entre los organismos más variables y se caracterizan por una alta variación entre poblaciones (Newton *et al.*, 2002). La alta diversidad genética generalmente registrada dentro de las poblaciones de pinos es atribuible a características reproductivas como la polinización por viento, alta capacidad reproductiva, mecanismos efectivos de dispersión de semillas y sistemas de apareamiento flexibles (Ledig, 1998; Richardson y Rundel, 1998). Newton y colaboradores en 2002 evaluaron el grado de variación genética dentro y entre poblaciones de esta especie, en el sur de México y noroeste de Guatemala, obtuvieron muestras de todo el rango natural y se analizaron utilizando marcadores de RFLP de ADN de semillas, donde pudieron observar dos mitotipos (Figura 1). La proporción de bandas polimórficas fue inusualmente baja (24.5%) en comparación con otras especies de árboles lo que podría indicar que su población se ha fragmentado como resultado del impacto humano y el cambio climático. Del Castillo *et al.* (2009) recalcan la importancia de considerar que el riesgo de extinción se incrementa en una población pequeña, ya que decrece la variabilidad genética generando problemas de regeneración.

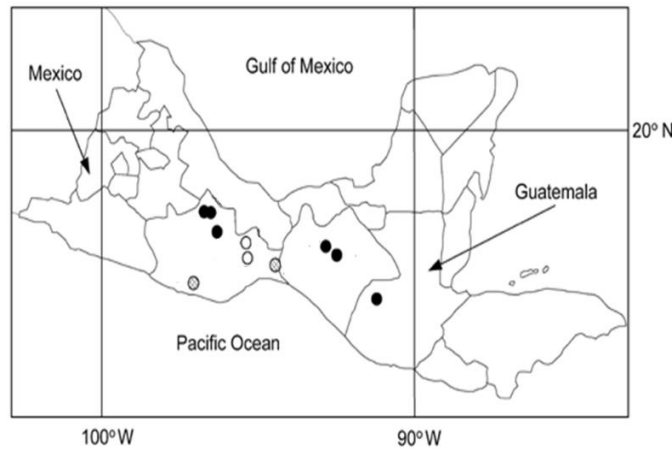


Figura 1. Distribución de mitotipos de *Pinus chiapensis* detectados por análisis RFLP. Las poblaciones representadas por círculos rellenos son el mitotipo A, las poblaciones representadas por círculos vacíos son el mitotipo B. Las poblaciones representadas por círculos sombreados contenían ambos mitotipos. Mapa modificado de Newton *et al*, 2002.

Todos los tejidos vegetales, incluidas las raíces, las hojas y las semillas, están colonizados por una gran diversidad de microorganismos (microbiota). Estos microorganismos se relacionan con las plantas parasitariamente, mutualistamente, etc., con interacciones complejas microbio-microbio y microbio-planta. El crecimiento y la salud de las plantas (incluido el desarrollo, la nutrición, la fisiología y la defensa) están influenciados por estas complejas redes microbianas alojadas. De hecho, la microbiota puede estimular la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas, ayudar a las plantas a combatir enfermedades, promover la resistencia al estrés e influir en la aptitud de las plantas. Así, la microbiota vegetal amplía la capacidad de las plantas para adaptarse a su entorno y contribuir a dar forma al fenotipo vegetal (Lebreton *et al*, 2019, Domínguez-Castillo *et al.*, 2020), por lo cual, es pertinente estudiar la dinámica poblacional bacteriana y fúngica autóctona de *P. chiapensis*.

ANTECEDENTES

Los microorganismos del suelo coexisten en asociación con las raíces de las plantas e interfieren con el crecimiento de la planta, formando entre ellas una estructura microbiana. Se estima que las bacterias ocupan entre el 7% y el 15% de la superficie total de la raíz (Gray & Smith., 2005). De éstas, algunas bacterias afectan positivamente a las plantas y han sido designadas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés **P**lant **G**rowth **P**romoting **R**hizobacteria) (Kloepper & Schroth 1978).

Las PGPR pueden promover directa o indirectamente efectos positivos en las plantas. Indirectamente, suprimen los patógenos mediados por la competencia y la producción de compuestos antimicrobianos y enzimas líticas. Directamente, solubilizan minerales y causan una amplia gama de cambios en la rizosfera, lo que promueve una mayor eficiencia en la absorción de agua y macro y micronutrientes por parte de las plantas y cambios en las

concentraciones de fitohormonas, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos (Salete, et al, 2017).

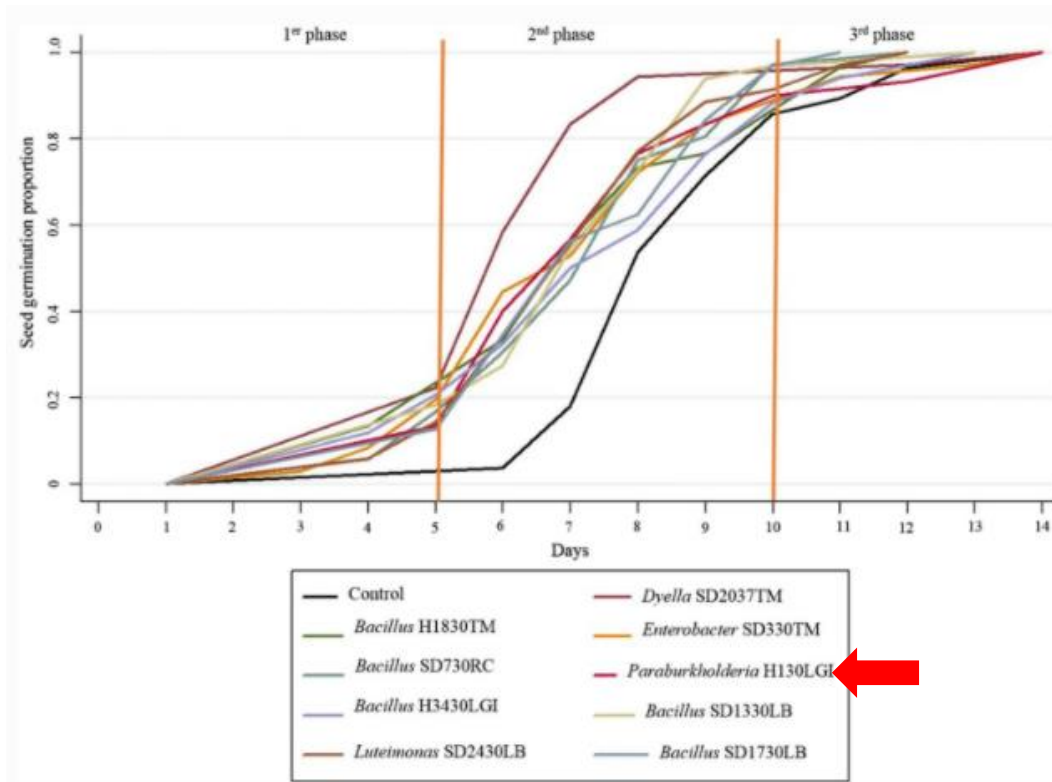
En los últimos años las enfermedades y plagas que afectan a la producción forestal en Sudamérica se han expandido alarmantemente. Ejemplos claros de esta tendencia son la identificación reciente de una nueva especie de *Phytophthora* causante de la pérdida de 60.000 ha de pinos exóticos en Chile (Durán et al., 2008)

Las enfermedades constituyen uno de los cuatro factores principales que determinan la dinámica de los ecosistemas forestales junto con las plagas, el fuego y las condiciones climáticas. Los hongos son los principales agentes causantes de enfermedades forestales pudiendo atacar diferentes partes de las plantas afectando su funcionamiento en varias formas: por ejemplo, aquellos hongos que causan defoliación provocan una disminución en la tasa fotosintética; los causantes de chancros debilitan el tronco o reducen el transporte desde y hacia las raíces; los pudridores de raíz incrementan el riesgo a la caída por viento y reducen la absorción de agua y minerales. El registro de las principales enfermedades causadas por hongos en plantaciones de pinos en la región patagónica ha sido muy bien caracterizado por Gómez et al. (2011).

En un estudio previo se aislaron bacterias autóctonas de la rizosfera de *P. chiapensis*, capaces de tener un efecto en el proceso de germinación al disminuir el tiempo de germinación y aumentar el tamaño del germinado de *P. chiapensis* (Domínguez-Castillo et al, 2020). Entre las bacterias se encuentran el género *Paraburkholderia*, cepa potencial como PGPR (Domínguez-Castillo et al, 2020; Sawana et al., 2014). *Paraburkholderia* se ha descrito como anaerobios facultativos, quimiolitótrofos facultativos, tolerantes a ácidos y álcalis, a metales, meteorización mineral y solubilizan fosfatos, degradan hidrocarburos poliaromáticos y xenobióticos, que promueven el crecimiento de las plantas y fijan el nitrógeno (Wilhelm et al., 2020). Domínguez-Castillo y col., demostraron que esta cepa tenía la capacidad de disminuir el tiempo de germinación y aumentaba el porcentaje de germinados de semillas de *P. chiapensis* (Gráfica 1). También analizo el probable mecanismo con que ejercía ese efecto, ya que se observó que producía ácido indol-3-acético (AIA), giberelinas; que son fitohormonas que ayudan a regular el crecimiento de las plantas, además de que tiene la capacidad de solubilizar fosfatos (Tabla 1).

Tabla 1: Evaluación de posibles mecanismos PGPRs de *Paraburkholderia* con un efecto benéfico en la germinación de *Pinus chiapensis*. P= 0.001. Modificado de Domínguez- Castillo, 2020.

CEPA	GENERO	Indoles (µg de indol / ml proteína)		Giberelinas (µg de giberelina / ml proteína)	Solubilización de fosfatos (µg de fosfato / ml proteína)		LONGITUD (mm)	GERMICACIÓN (días)
		24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	24 hrs.	48 hrs.		
H130° LGI	<i>Paraurkholderia</i>	0.41 ± 0.073	0.27 ± 0.047	0.396 ± 0.014	9.43 ± 0.01	26.34 ± 1.37	86.10 ± 4.95	6.13 ± 0.37
Control	--	--	--	--	31.81 ± 0.73	23.79 ± 1.60	69.17 ± 3.04	7.58 ± 0.31



Gráfica 1: Dinámica de la proporción de germinación de semillas análisis de regresión logística multinivel del tiempo hasta las parcelas de eventos ($P < 0.05$). Tomado de Domínguez-Castillo *et al*, 2020.

Domínguez y colaboradores al trabajar con semillas tratadas con una esterilización superficial, no germinaban y presentaban signos de pudrición, observándose a simple vista la presencia de posibles hongos (Figura 2), por lo que se asilaron e identificaron, obteniendo un total de 8 hongos y 5 bacterias. Se identificaron que los 8 hongos pertenecían a 4 géneros diferentes, *Trichoderma* (5 cepas), *Penicillium*, *Diaporthe* y *Cladosporium*, y las 5 bacterias correspondían al género *Bacillus* (Domínguez-Castillo *et al*, 2020; Muñoz-Flores, 2017).



Figura 2: Daño de semillas y germinados de *P. chiapensis* por microorganismos endófitos de las semillas. Tomado de Domínguez-Castillo, 2020.

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Tabla 2: Lipopéptidos de *Bacillus*.

<i>Lipopéptidos</i>	<i>Actividad</i>	<i>Género</i>	<i>Biocontrol</i>	<i>Referencia</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Akpa et al. 2001</i>
			<i>C. gloeosporioides</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phytophthora capsici</i>	
		<i>B. thuringiensis</i> CMB26	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Colletotrichum coccodes</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Fusarium solani.</i>	<i>Kim et al., 2004</i>
		<i>Bacillus megaterium</i>		<i>Pueyo et al., 2009</i>
		<i>Bacillus subtilis</i> IB	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Wang et al., 2007</i> <i>Raaijmakers et al., 2010</i>
<i>Fengicina</i>	<i>Interactúa con esteroides y fosfolípidos en la membrana celular fúngica, alterando su estructura y permeabilidad.</i>		<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Alternaria sp.</i>	
		<i>Bacillus subtilis</i> GA1	<i>Aspergillus flavus</i> MUCL14109 <i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Gaeumannomyces sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma reesei</i>	<i>Touré et al., 2004</i>
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Podospaera fusca</i> <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Romero et al., 2007</i>
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>F. oxysporum</i>	<i>Hanif et al., 2019</i>
<i>Inturina</i>	<i>Interactúa con moléculas de esteroides principalmente con colesterol, interrumpe la</i>	<i>B. subtilis</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> del <i>Bacillus subtilis</i> NT02 <i>Bacillus megaterium</i>		<i>Raaijmakers et al., 2010</i> <i>Akpa et al. 2001</i> <i>Akpa et al. 2001</i> <i>Pueyo et al., 2009</i>

	<p>membrana citoplasmática fúngica creando canales transmembrana, que permiten la liberación de iones vitales como K⁺.</p>	<p><i>Bacillus subtilis</i> GA1</p>	<p><i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Aspergillus flavus</i> MUCL14109 <i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Gaeumannomyces sp.</i> <i>Mucor sp.</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Trichoderma harzanium</i> <i>Trichoderma reesei</i></p>	<p><i>Touré et al., 2004</i></p>
		<p><i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RC-2 <i>B. subtilis</i> YM 10-20 <i>Bacillus subtilis</i> AU195 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B94 <i>Bacillus coagulans</i> <i>B. pumilus</i></p>	<p><i>Podospaera fusca</i> <i>Colletotrichum demiatium</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Rhizoctonia solani</i></p>	<p><i>Romero et al., 2007</i> <i>Hiradate et al., 2002</i> <i>Chitarra et al., 2003</i> <i>Moyne et al., 2001</i> <i>Yu et al., 2002</i> <i>Huszczka & Burczyk, 2006</i> <i>Kalinovskaya et al., 2002</i> <i>Li et al., 2008</i> <i>Akpa et al. 2001</i> <i>Kakinuma et al., 1969</i></p>
Surfactina	<p>Lipopéptido ácido, biosurfactante, desestabiliza la bicapa lipídica.</p>	<p><i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>del <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus mojavensis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus polyfermenticus</i> <i>Brevibacillus brevis</i></p>	<p><i>Fusarium verticillioides</i></p>	<p><i>Snook et al., 2009</i> <i>Pueyo et al., 2009</i> <i>Kim et al., 2009</i> <i>Haddad et al., 2008</i></p>

	<i>Fusarium graminearum</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	
	<i>Pythium ultimum</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	
	<i>Rhizopus sp.</i>	
	<i>Alternaria sp.</i>	
	<i>Aspergillus flavus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> GA1	MUCL14109	<i>Touré et al., 2004</i>
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Botrytis cinerea</i>	
	<i>Gaeumannomyces sp.</i>	
	<i>Mucor sp.</i>	
	<i>Penicillium expansum</i>	
	<i>Trichoderma harzanium</i>	
	<i>Trichoderma reesei</i>	
<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> BC98	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Tendulkar et al. 2007</i>

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos ya que producen una amplia variedad de compuestos antimicóticos y antimicrobianos (Wang et al., 2014; Li et al., 2015, Sarwar et al., 2018). Los principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus* es la producción de lipopéptidos cíclicos (CLP), que se clasifican en surfactina, inturina y fengicina, estas pueden ser producidas por diferentes especies de *Bacillus*, así como tener efecto en diferentes hongos patógenos, como se muestra en la Tabla 2. (Raaijmakers *et al.*, 2010, Lou *et al.*, 2014), sideróforos como ejemplo, *B. cereus* secretan bacilibactina (BB), un sideróforo de trilactona 2,3-dihidroxibenzoil-Gly-Thr, *B. anthracis* y *B. cereus* producen principalmente petrobactina (PB) (Zawadzka *et al.*, 2009), enzimas líticas, la producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos especialmente contra patógenos de origen fúngico (Villarreal *et al* 2017). *Bacillus* produce enzimas líticas como quitinasas y β -glucanasas (Compant *et al.*, 2005), δ -endotoxinas e induciendo la resistencia sistémica de la planta (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Otros compuestos que también produce *Bacillus* son los Compuestos Volátiles (VOC, Volatile Organic Compounds, por sus siglas en inglés) los cuales pueden inducción de resistencia y tolerancia sistémicas en la planta, lo cual reduce el estrés biótico y abiótico en los sistemas agronómicos y mejora la salud vegetal. Adicionalmente, los VOCs pueden actuar de manera directa sobre microorganismos patógenos produciendo daño en el ADN (Tabla 3). En este contexto, merecen destacarse el benzotiazol, el benzaldehído, el fenilacetaldehido, el ciclohexanol, 2-etil-1-hexanol, el 2,3-butanodiol, el n-decanal y el nonanal entre otros, de los que se ha comprobado poseen actividad antimicrobiana (Pedraza *et al.*, 2020).

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de VOCs producidos por cepas de *Bacillus* sp. (Pedraza *et al.*, 2020).

Cepa de <i>Bacillus</i> evaluada	VOCs	Agente Fitopatógeno	Referencia
<i>Bacillus</i> sp. cepa D13	3,5,5-trimetilhexanol Decilalcohol	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	Xie <i>et al.</i> , 2018
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 <i>B. artrophaeus</i> LSSC22	Benzaldehído, 1,2-benzisotiazol-3 (2H y 1,3-butadieno	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Samad <i>et al.</i> , 2016
<i>B. amyloliquefaciens</i> CPA-8	1,3-pentadieno, acetoin (3-hidroxi-2-butanona) y tiofeno	<i>Monilinia fructicola</i>	Gotor-Vila <i>et al.</i> , 2017
<i>B. velezensis</i> ZSY-1	2-tridecanona, pirazidina (2,5-dimetil), benzotiazola, fenol (4-cloro-3-metil).	<i>Botrytis cinérea</i> <i>Alternaria solani</i>	Gao <i>et al.</i> , 2017
<i>B. subtilis</i> FA26	Benzaldehído, nonanal, benzotiazol y acetofenona	<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i>	Rajer <i>et al.</i> , 2017

En el caso de los hongos aún no se sabe realmente el efecto que pudiera tener sobre *P. chiapensis*, pero en la literatura se ha reportado que para el género *Trichoderma* las cepas pueden inducir defensas vegetales y estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas al establecer un diálogo molecular con las raíces. Las interacciones beneficiosas mutuales entre *Trichoderma* spp. y plantas como *Arabidopsis*, tomate, pepino, guisante o canola e incluso se han observado plantas leñosas (Poveda *et al.*, 2019). En el caso de *Cladosporium* es considerados endófitos ya que colonizar los tejidos vegetales internos (Paul & Yu, 2008). Muchas especies son patógenos de las plantas (Kwon *et al.*, 2001). Las especies de *Diaporthe* a menudo se han reportado como patógenos de plantas, endófitos no patógenos o saprobios, comúnmente aislados de una amplia gama de huéspedes. *Diaporthe* spp. son responsables de enfermedades en una amplia gama de plantas hospederas, algunas de las cuales son económicamente importantes, causando pudriciones de raíces y frutos, muerte progresiva, chancros, manchas foliares, tizones, pudrición y marchitez (Gomes *et al.*, 2013). Ha sido reportado como uno de los géneros de hongos endofíticos más frecuentes en varios hospedadores de plantas (Murali *et al.* 2006, Botella y Diez 2011). Y *Penicillium* es un género diverso ya que algunas especies se consideran como patógenas mientras que otras especies tiene varias características que promueven el crecimiento de las plantas, como la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la síntesis de aminoácidos, la secreción de varias enzimas antioxidantes y metabolitos secundarios biológicamente activos (Chaudhary *et al.*, 2018).

JUSTIFICACIÓN

El estado de conservación de *P. chiapensis* es cada vez más preocupante. Las causas de la disminución de la población de este pino aún no son del todo conocidas. Microorganismos tanto benéficos como perjudiciales han mostrado ser importantes en el establecimiento y desarrollo de varias plantas.

Estudios microbiológicos encaminados a estudiar el biocontrol de las poblaciones de hongos endófitos de *P. chiapensis* por *Bacillus* y *Paraburkholderia* contribuirá a entender la influencia de microorganismos en el desarrollo del pino.

HIPÓTESIS

Bacillus y *Paraburkholderia* controlan el crecimiento de hongos endófitos cultivables de *Pinus chiapensis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el biocontrol de bacterias endófitas y PGPR sobre hongos endófitos cultivables de semillas de *Pinus chiapensis*.

Objetivos específicos

- 1.-Determinar el efecto antagónico de *Bacillus* y *Paraburkholderia* sobre hongos provenientes de *Pinus chiapensis*.
- 2.-Determinar el efecto antagónico de un Mix bacteriano sobre los hongos provenientes de *Pinus chiapensis*.
- 3.-Identificar la cepa bacteriana que presenta mayor biocontrol sobre los hongos.
- 4.- Estudiar los posibles mecanismos de biocontrol presentados por la bacteria con mayor biocontrol

Materiales y Métodos

Cepario

Los hongos y las cepas de *Bacillus* se obtuvieron de semillas de *P. chiapensis* esterilizadas superficialmente, *Paraburkholderia* se obtuvo de la rizosfera de *P. chiapensis*. (Domínguez-Castillo 2020, Muñoz-Flores, 2017)

Tabla 4. Bacterias y hongos utilizados y sus características.

Cepa	Características Macroscópicas	Características Microscópicas	Bibliografía
<i>Bacillus</i> A	Colonias irregulares, borde entero, lisa, translúcida, brillante.	Bacilo Gram +	Muñoz, 2017
<i>Bacillus</i> B	Colonias irregulares, con bordes ondulados, rugosa, translúcida, brillante, convexa.	Bacilo Gram +	Muñoz, 2017
<i>Bacillus</i> C	Colonias irregulares con bordes ondulados, rugosa, membranosa.	Bacilo Gram +	Muñoz, 2017
<i>Bacillus</i> D	Colonias aisladas, pequeñas, puntiformes, redondas, bien definidas, convexas, lisas, cremosas, translúcida, opacas.	Bacilo Gram +	Muñoz, 2017
<i>Bacillus</i> E	Colonias irregulares, borde lobulado, convexa, rugosa, cremosa y translúcida.	Bacilo Gram +	Muñoz, 2017
<i>Paraburkholderia</i>	Colonia pequeña y uniforme, Blanca-amarillenta brillante.	Bacilo Gram -	Domínguez, 2020
<i>Penicillium</i>	Colonia filamentosas, vellosas y con surcos radiales, márgenes definidos con textura algodonosa, de color blanco- grisácea.	Hifas septadas hialinas, con conidióforos simples, métulas, fiálides y conidios hialinos.	Muñoz, 2017
<i>Trichoderma</i> 2	Colonia algodonosa, surcos radiales, de color blanco con un anillo verde y centro gris.	Hifas cenocíticas, ramificadas, hialinas, conidióforos, fiálides en forma de botella y conidios globosas	Muñoz, 2017
<i>Trichoderma</i> 3	Colonia algodonosa, surcos radiales, blanca, con un anillo verde.	Hifas cenocíticas, conidióforo hialino, fiálides alargadas con conidios globosos	Muñoz, 2017
<i>Trichoderma</i> 4	Colonia aterciopelada y algodonosa con centro verde y coloración blanca.	Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosas.	Muñoz, 2017
<i>Trichoderma</i> 5	Colonia algodonosa, con vellosidades de color blanco con un centro pequeño verde.	Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosas.	Muñoz, 2017
<i>Trichoderma</i> 6	Colonia algodonosa y aterciopelada de color blanco con el centro verde.	Hifas cenocíticas, conidióforos hialinos, fiálides alargadas en forma de botella con conidios globosas	Muñoz, 2017

<i>Diaporthe</i>	Colonia vellosa aterciopelada de color blanco grisáceo, con un centro beige.	Micelio macrosifonado hialino y tabicado sin presencia de cuerpos fructíferos	Muñoz, 2017
<i>Cladosporium</i>	Colonia aterciopelada, vellosa, con pliegues radiales de color verde oscuro en el centro de la colonia aclarándose en la periferia con márgenes blancos.	Hifas septadas, ramificadas con conidióforos, fiálides alargadas, conidios elipsoides.	Muñoz, 2017

Antagonismo Dual Inverso

Para determinar el efecto antagónico se realizó ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual inverso. Para esto, los hongos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C. Para las cepas bacterianas se hicieron 2 cultivos consecutivos en Caldo LB, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C. La concentración celular se ajustó a 10^{10} cel.ml⁻¹ para inocular superficialmente por estriado masivo de 100 µL de esta suspensión bacteriana en placas Petri de 100 mm con medio PDA. Se extrajo un círculo de 0.5cm de diámetro del hongo previamente crecido utilizando un sacabocados y se colocó en el centro de cada una de las placas inoculadas con los aislados bacterianos. Estas se incubaron a 25°C.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de las bacterias se determinó a través de la medición de 5 radios del mismo crecimiento del hongo en presencia del antagonista bacteriano durante 10 días. Como control negativo se utilizaron placas donde se encontraban solamente los hongos.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del Índice de Inhibición del Crecimiento Radial (IICR) mediante la siguiente ecuación:

$$IICR = (R_1 - R_2) / R_1$$

donde:

R1 es el radio mayor (radio control)

R2 es el radio menor (radio en cultivo dual).

Antagonismo por compuestos volátiles

Los hongos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C. Para las cepas bacterianas se hicieron 2 sembrados consecutivos en Caldo LB, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C. La concentración celular se ajustó a 10^{10} cel.ml⁻¹ para inocular superficialmente por estriado masivo de 100 µL de esta suspensión bacteriana en placas Petri de 100 mm con medio PDA. Se extrajo un círculo de 0.5cm de diámetro del hongo previamente crecido utilizando un sacabocados y se colocó en el centro de placas Petri de 100 mm con medio PDA estériles, posteriormente la placa con el inóculo bacteriano se colocó boca abajo sobre la que tenía el inóculo fúngico, se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25°C.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de los compuestos volátiles se determinó a través de la medición de 5 radios del mismo crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia de los compuestos volátiles de antagonista bacteriano durante 10 días. Como control negativo se utilizaron placas donde se encontraban solamente los hongos en crecimiento.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del Índice de Inhibición del Crecimiento Radial (IICR).

Vertido en doble capa (Metabolitos secundarios)

Para determinar el efecto que tenían los metabolitos secundarios se realizó ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de vertido de doble placa. Para esto, los hongos se sembraron previamente en caldo PD y se incubaron durante 3 días a 25°C en agitación. Para las cepas bacterianas se hicieron 2 sembrados consecutivos en Caldo LB, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C. La concentración celular se ajustó a 10^{10} cel.ml⁻¹ para inocular una gota de 10 µl sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.025 µm de esta suspensión bacteriana en placas Petri de vidrio de 100 mm con medio LB, se incubó durante 72 h. a 30° C, pasando ese tiempo se retiró la membrana de nitrocelulosa. Se agitó la suspensión del hongo previamente crecido y se tomó una alícuota de 1 ml para colocarla en un matraz con medio PDA a 45° C se vertió en las placas que se les retiró la membrana de nitrocelulosa y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de los metabolitos se determinó a través de observar al tercer día del crecimiento del hongo en presencia de los metabolitos secundarios que permanecieron en la placa. Como control negativo se utilizaron placas donde se encontraban solamente los hongos.

Antagonismo en medio líquido

Para determinar el efecto antagónico se realizó ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de antagonismo en medio líquido. Para esto, los hongos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C. Para las cepas bacterianas se hicieron 2 sembrados consecutivos en Caldo LB, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C. La concentración celular se ajustó a 10^{10} cel.ml⁻¹ para inocular en matraces de vidrio de 250 ml con 100 ml de medio PD. Se extrajo un círculo de 0.5cm de diámetro del hongo previamente crecido utilizando un sacabocados estéril y se colocó en el matraz con la bacteria. Estas se incubaron durante 5 días en agitación a 30°C. Posterior a los 5 días, se filtró el medio a vacío, para que los hongos se quedaran en el papel filtro, estos se secaron a 50° C durante 3 días en una estufa.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de las bacterias se determinó pesando la masa fúngica seca que estuvieron en contacto con la bacteria. Como control negativo se pesó la masa fúngica de cada uno de los hongos que no estuvieron en contacto con la bacteria.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del Porcentaje de Inhibición del crecimiento fúngico (PICF)

$$\text{PICF}=(P_1-P_2) / P_1$$

P₁ es pese seco (testigo)

P₂ es el peso seco (cultivo dual).

Antagonismo Dual Inverso (Área)

Para determinar el efecto antagónico se realizó ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual inverso. Para esto, los hongos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C. Para las cepas bacterianas se hicieron 2 sembrados consecutivos en Caldo LB, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C. La concentración celular se ajustó a 10¹⁰ cel.ml⁻¹ para inocular superficialmente por estriado masivo de 100 µL de esta suspensión bacteriana en placas Petri de 100 mm con medio PDA. Se extrajo un círculo de 0.5cm de diámetro del hongo previamente crecido utilizando un sacabocados y se colocó en el centro de cada una de las placas inoculadas con los aislados bacterianos. Estas se incubaron a 25°C.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de las bacterias se determinó a través de la medición del área con el programa ImageJ del crecimiento del hongo en presencia del antagonista bacteriano con fotografías que se tomaron durante 10 días. Como control negativo se utilizaron placas donde se encontraban solamente los hongos.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del Índice de Inhibición del Crecimiento del Área (IICA) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IICA}=(A_1-A_2) / A_1$$

A₁ es el área mayor (área control)

A₂ es el área menor (área en cultivo dual).

Antagonismo con Mix bacteriano (Co- cultivo y juntas)

Se denominó Mix bacteriano 1 y 2, al cultivo de todas las bacterias (*Bacillus* A, B, C, D, E y *Paraburkholderia*), y se definieron dependiendo del momento en el que se juntaron las bacterias para los ensayos de antagonismo. El momento en que se co-cultivaron las bacterias para hacer el Mix bacteriano 1 (MB1) fue desde el inicio, es decir desde el pre-cultivo para hacer el ensayo de antagonismo. En el Mix bacteriano 2 (MB2), las bacterias se juntaron justo antes de hacer el ensayo de antagonismo, es decir se hicieron pre-cultivo de cada una de las bacterias por separado.

Para determinar el efecto antagónico se realizó ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual inverso, por compuestos volátiles, y dual simultáneo., Los hongos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante 4 días a 25°C en obscuridad. Para las cepas bacterianas, en el caso de MB1, se hizo un pre-precultivo de cada una de las cepas bacterianas por separado durante 24h a 30°C en agitación, después se hizo un pre-cultivo, en donde se ajustaron todas las bacteriana a una densidad óptica de 0.001, se colocaron todas juntas en un solo matraz que contenía 100 ml de LB y se incubaron en agitación durante 48h a 30°C y se prosiguió como se ha indicado en los métodos previamente enunciados. Con respecto al MB2, las baterías se juntaron en un mismo tubo justo antes del ensayo de antagonismo. Para este caso, se sembraron por separado cada una de las bacterias

en Caldo LB, haciendo pre-cultivos de 24 h. y 48 h en matraces de vidrio de 250 ml con 100 ml de LB en condiciones de agitación a 30° C. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las bacterias y se colocó en un tubo Falcon se agitó en vortex y se procedió a seguir con los siguientes pasos de las metodologías.

Para el ensayo dual simultáneo se tomó una alícuota de 10 µl de un Mix de bacterias que contiene a *Bacillus* A, B, C, D, E y *Paraburkholderia* en co-cultivo o juntándolas, el mix bacteriano se colocó en un extremo de la placa de PDA, dejando una distancia de 0.5 cm del borde. Se extrajo un círculo de agar del hongo previamente crecido (0.5 cm de diámetro) utilizando un sacabocados estéril y se colocó en el otro extremo de la paca Se incubaron a 25°C a luz y oscuridad de 12h cada uno.

Se realizaron tres réplicas por hongo. La actividad antagónica de las bacterias se determinó a través de la medición radial del hongo en dirección a la colonia del Mix bacteriano, se hicieron estas mediciones durante 10 días. Como control negativo, se utilizó el crecimiento fúngico sin interacción con las bacterias.

Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del IICR.

Medios para probables mecanismos de control biológico

Para determinar los probables mecanismos de control biológico se usaron medios con diferentes sustratos (sangre, yema de huevo, carboximetilcelulosa sódica, clara de huevo, leche semidescremada y gelatina).

Para esto se hicieron dos pre-inóculos consecutivos en Caldo LB de *Bacillus* E, el primero de 24 h. y el segundo de 48 h. en condiciones de agitación a 30° C., se hizo de esta forma ya que se buscaba tener las mismas condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos de antagonismo. La concentración celular se ajustó a 10^{10} cel.ml⁻¹ para inocular una gota de 10 µl sobre cada una de las placas con diferentes sustratos y se incubaron durante 24 h. a 30° C a excepción de las placas con gretina que se incubaron a 25° durante 3 días.

Se realizaron tres réplicas por cada medio. Los metabolitos secundarios producidos por la bacteria se determinaron con el resultado positivo del crecimiento, halos, hemolisis y licuefacción. Como controles se utilizaron placas de MMK sin fuentes de nitrógeno ni carbono.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de antagonismo por crecimiento dual inverso

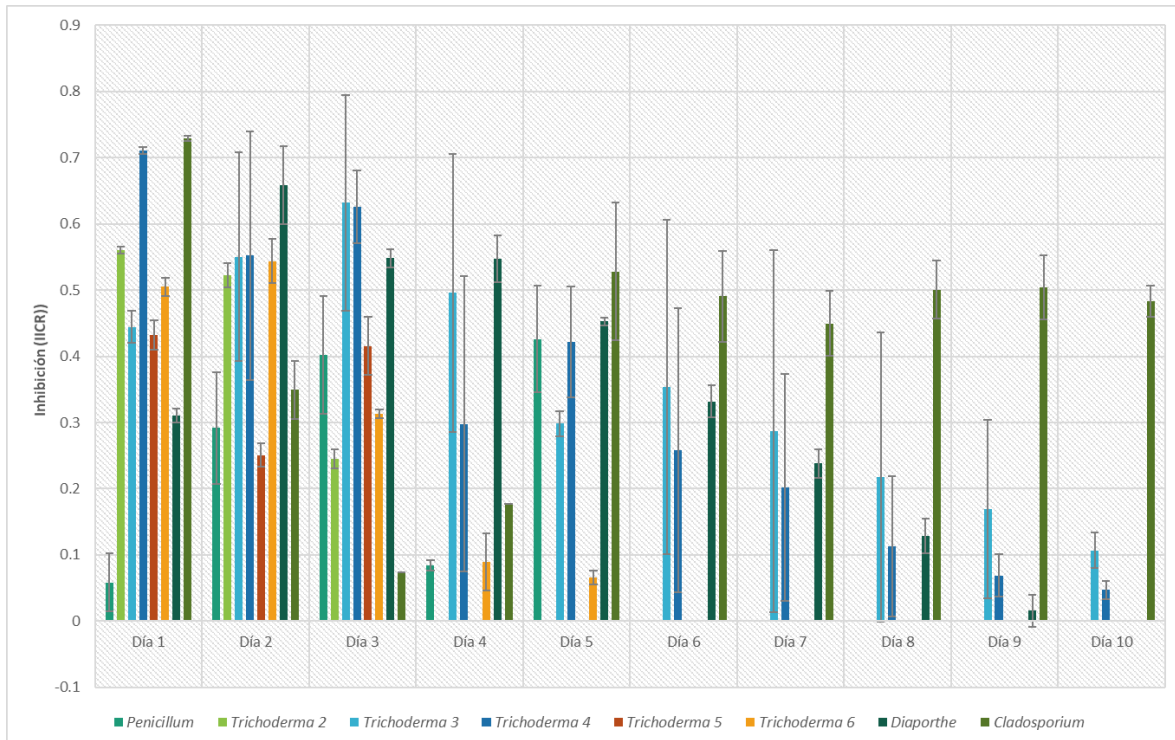
Fueron diversos los resultados que se obtuvieron cuando se evaluó el efecto antagónico de las cinco cepas de *Bacillus* sp. (A, B, C, D, E) y una cepa de *Paraburkholderia* sp. frente a los hongos *Penicillium*, *Diaporthe*, *Cladosporium* y *Trichoderma* 2, 3, 4, 5 y 6 mediante la metodología de crecimiento dual inverso.

En primer lugar, *Bacillus* A mostró una variación en el índice de inhibición de cada hongo y conforme pasan los días, también exhibe una variación. Cuando *Bacillus* A se enfrenta a *Penicillium* el índice de inhibición es menor al .6 en el primer día, y en el tercer día es del .40, sin embargo, en el cuarto día disminuyó drásticamente a un 0.8. No obstante, al siguiente día alcanza nuevamente un porcentaje alto (0.42) como se muestra en la tabla 5 y gráfica 2; y posteriormente, ya no se pudo monitorear debido a que ya se encontraban dispersas más colonias del mismo hongo en las placas, esto debido a la esporulación del hongo, por lo que se esparcen esporas en toda la placa y hay crecimiento fúngico, por lo cual ya presentaba una interferencia en el crecimiento de los hongos que se estaban midiendo. Con respecto a la morfología, aparentemente *Bacillus* A interfiere en el color de la colonia de *Penicillium*, ya que es más clara a comparación del hongo control, como se muestra en la figura 3. En el caso de *Trichoderma* 2, al ser de crecimiento rápido solo en los primeros tres días se pudo observar una notable disminución de su crecimiento en co-cultivo con *Bacillus* teniendo índices de .56 y .52 en los primeros 2 días al tercer día disminuye a la mitad el índice siendo de .28 y posteriormente disminuyó su capacidad antagónica (no mayor al 10%) como se puede observar en la tabla 5 y la gráfica 2. Se observó que el hongo abarcó casi en su totalidad la superficie de la placa, llegando a la totalidad en el sexto día, por lo cual ya no se pudo seguir midiendo la disminución del crecimiento, también se vio afectado el color de la colonia de *Trichoderma* ya que en co-inoculación con *Bacillus* A, este presentaba colores más claros. El índice de inhibición de *Bacillus* A sobre *Trichoderma* 3 en los primeros 4 días presenta mayor inhibición que va de 0.44 a 0.63, después del quinto día la inhibición va siendo menor llegando a un índice de 0.1 en el décimo día como se observa en la tabla 5 y gráfica 2, también afectó el color de la colonia ya que en su mayoría se observa blanca y en los bordes un anillo como se muestra en la figura 3. Dentro del género de los *Trichoderma* el 3 y el 4 son los que presentan mayor inhibición, para el caso de *Trichoderma* 4, los índices de inhibición que presentó durante los primeros 3 días fueron los más altos de 0.5 a 0.7, en posteriormente la inhibición fue disminuyendo hasta el día 10 presentando un índice de 0.04 como se observa en la tabla 5, también afectó el color de la colonia fúngica ya que la mayor parte de esta tiene una coloración blanca, casi transparente y en los bordes tiene un color verde claro. Los resultados en el co-cultivo de *Bacillus* A con *Trichoderma* 5 se presentó una inhibición mayor dentro de los primeros 3 días siendo los índices mayores a 0.25 pero menores a 0.45 (Tabla 5, gráfica 2), posteriormente ya no se pudo seguir con las mediciones debido a que la colonia fúngica ya abarcaba la totalidad de la placa, afectó también el color de la colonia (figura 3) presentado un color blanco transparente en su mayoría, y partes en las que se encuentra un color verde. *Trichoderma* 6 en co-cultivo con *Bacillus* A el índice de

inhibición de los primeros dos días son los más altos siendo de 0.50 el primero y de 0.54 el segundo con un porcentaje mayor al 50%, posteriormente va disminuyendo debido al el crecimiento del hongo va abarcando la totalidad de la placa (tabla 5, gráfica 2), al igual que los otros *Trichoderma* el 6 también fue afectado en su color, siendo este un blanco transparente con bordes verdes. El índice de Inhibición de *Diaporthe* en co-inoculación con *Bacillus A* el primer día presenta un índice bajo de 0.31 a comparación del segundo al sexto día en donde la bacteria inhibió más al hongo, teniendo índices de 0.33 a 0.65, después del sexto 23%, (tabla 5, gráfica 2), también hubo cambio en el color de *Diaporthe* siendo esta de un color gris claro. día la inhibición va siendo menor del día 1 al día 4 va de 0.31, 0.65, 0.54 y 0.54 respectivamente. Finalmente, los co-cultivos de *Bacillus A* con *Cladosporium* se pudieron evaluar durante los 10 días debido a que es un hongo de crecimiento lento, presentando la mayor inhibición en el primer día siendo el índice de de 0.72, los demás días hay una fluctuación de los índices que van de 0.17 a 0.52 (Tabla. 5, gráfica 2), también hubo un cambio de color de la colonia fúngica pasando de un color negro como se ve en la colonia control a un verde (figura 3). En concreto, el ensayo de antagonismo de *Bacillus A* con todos hongos, demuestra que tiene mayor efecto antagónico sobre *Trichoderma* 3, 4, *Diaporthe* y en mayor medida a *Cladosporium*, y también afecta morfológicamente ya que todos los hongos presentaban colores más tenues a comparación de los controles.

Tabla 5. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Bacillus A* sobre hongos ($p \leq 0.03$) Diferencia estadísticamente mínima significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.0582 ±0.04	0.2920 ±0.08	0.4019 ±0.09	0.0839 ±0.01	0.4262 ±0.08	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 2	0.5607 ±0.01	0.5222 ±0.02	0.2450 ±0.01	0.0003 ±0.00	0.0101 ±0.02	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 3	0.4442 ±0.02	0.5501 ±0.16	0.6318 ±0.16	0.4958 ±0.21	0.2984 ±0.02	0.3538 ±0.25	0.2870 ±0.27	0.2178 ±0.22	0.1694 ±0.13	0.1070 ±0.03
<i>Trichoderma</i> 4	0.7110 ±0.01	0.5524 ±0.19	0.6252 ±0.06	0.2980 ±0.22	0.4216 ±0.08	0.2581 ±0.21	0.2020 ±0.17	0.1124 ±0.11	0.0689 ±0.03	0.0472 ±0.01
<i>Trichoderma</i> 5	0.4323 ±0.02	0.2509 ±0.02	0.4158 ±0.04	0.0066 ±0.04	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 6	0.5049 ±0.01	0.5439 ±0.03	0.3132 ±0.01	0.0899 ±0.04	0.0659 ±0.01	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	0.3102 ±0.01	0.6588 ±0.06	0.5486 ±0.01	0.5472 ±0.04	0.4528 ±0.01	0.3318 ±0.02	0.2379 ±0.02	0.1283 ±0.03	0.0158 ±0.02	-
<i>Cladosporium</i>	0.7290 ±0.00	0.3492 ±0.04	0.0735 ±0.00	0.1774 ±0.00	0.5280 ±0.10	0.4906 ±0.07	0.4498 ±0.05	0.5007 ±0.04	0.5042 ±0.05	0.4831 ±0.02



Gráfica 2. Actividad antagonista de el aislado *Bacillus A* sobre los hongos *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Diaporthe sp.* y *Cladosporium sp.* Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus A* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos durante 10 días en medio PDA.

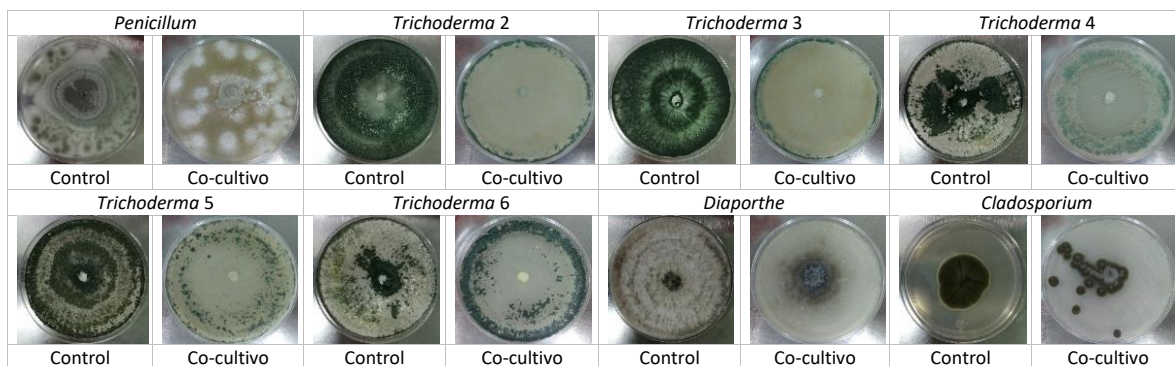


Figura 3. Antagonismo de *Bacillus A* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

Bacillus B presentó variación de los índices en co-cultivo con cada hongo y conforme pasan los días, también se presenta una variación de los índices. En el ensayo de antagonismo de *Bacillus B* en co-cultivo con *Penicillium*, solo se pudo hacer mediciones durante los primeros tres días, debido a que, tanto en el centro como a los ensayos, hubo esporulación del hongo causando que crecieran mas colonias que interfieren en la medición (figura 4), el primer día presento la mayor inhibición, teniendo esta un índice de 0.70, en el segundo y tercer hubo una disminución del afecto antagonico, presentando índices de 0.4 (tabla 6, gráfica 3), en el

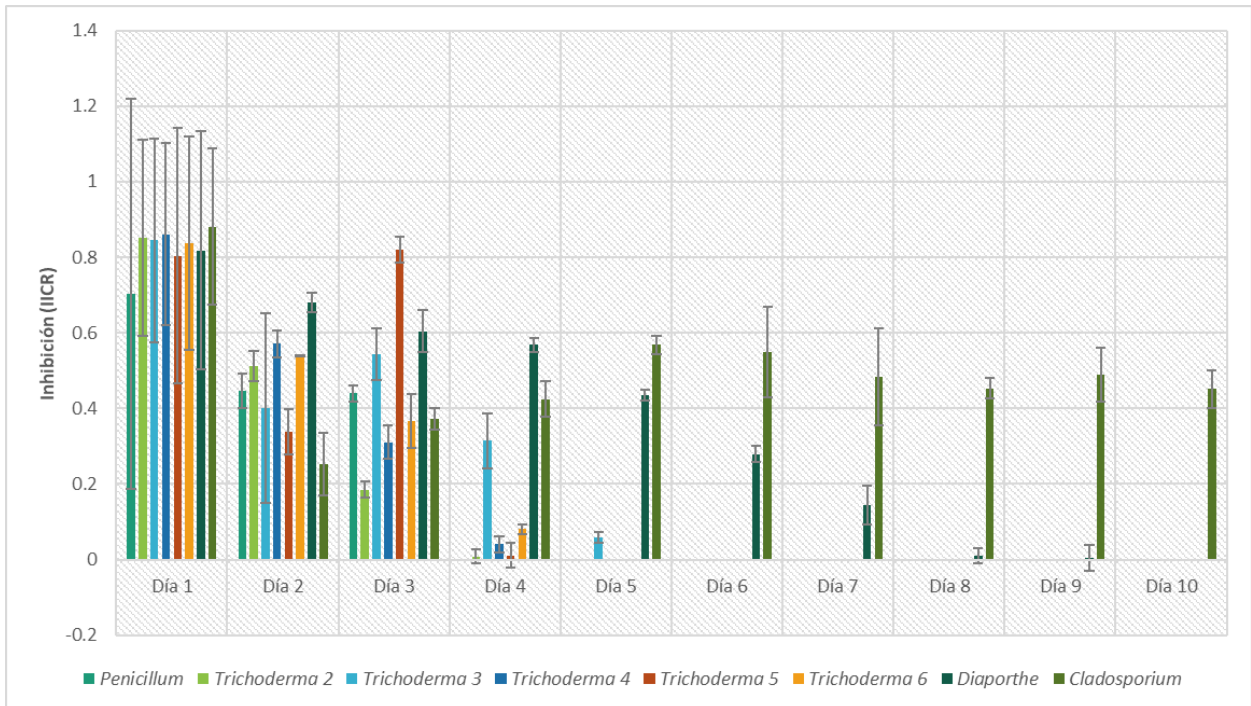
ensayo también se observó un cambio de color de la colonia fúngica, siendo esta un gris más claro a comparación del control. En los ensayos de inhibición de *Bacillus B* sobre los *Trichoderma*, no se pudieron seguir analizando después del 5 día debido a que como son hongos de crecimiento rápido, al quinto día, la colonia fúngica ya había abarcado la totalidad de la placa. En el co-cultivo de *Bacillus B* con *Trichoderma 2* presento la mayor inhibición el segundo día con un índice de 0.51 (tabla 6, gráfica 4), en *Trichoderma 2* se observo un cambio de color en la colonia, ya que en co-inoculación con *Bacillus A* presentó un color blanco transparente, con borde verde claro (figura 4). El co-cultivo de *Bacillus B* con *Trichoderma 3* el primer día presentó la mayor inhibición del crecimiento, teniendo un índice de 0.84, después del primer día hay una disminución de los índices lo que indica que la efectividad del antagonismo de la bacteria con el hongo va disminuyendo (gráfica 3), también se observa un cambio en el color de la colonia fúngica, de un color verde que se observa en el control, pasamos a un color amarillo a blanco en el ensayo de antagonismo (figura 4). En el co-cultivo de *Bacillus B* con *Trichoderma 4*, se observa que el antagonismo que ejerce *Bacillus B* sobre el hongo va disminuyendo conforme pasan los días, presenta la mayor inhibición en los primeros dos días, siendo los índice de 0.86 y 0.57 (gráfica 3, tabla 6), en el ensayo también se ve afectado el color de la colonia fúngica, ya que presenta un color blanco con bordes verdes claros (figura 4). Para el caso del ensayo de antagonismo de *Bacillus B* sobre *Trichoderma 5* los índices de inhibición para *Trichoderma 5* son de 0.80, 0.33, 0.81 y 0.01 del primer al cuarto día respectivamente,(tabla 6, gráfica 3), como se observa hay una fluctuación severa en el antagonismo que ejerce la bacteria contra el hongo, también causa un cambio de color de un verde oscuro en el control a un blanco o amarillo transparente y verde claro (figura 4). Para el caso de *Bacillus B* con *Trichoderma 6* sus índices van disminuyendo conforme pasan los días, iniciando con una inhibición del 83% y finalizando con una menor al 10% (tabla 6, gráfica 3) al igual que en los anteriores casos hubo un cambio en el color de la colonia fúngica, siendo esta de color blanco transparenté con bordes verdes (figura4). En el co-cultivo de *Bacillus B* con *Diaporthe* conforme pasaban los días iba disminuyendo la actividad antagónica, inicio con una actividad antagónica del 81% (tabla 6, gráfica 3), además de disminuir el crecimiento fúngico, también se modificó el color de la colonia fúngica, siendo esta de color gris claro (figura 4). En el caso de los índices de inhibición de *Bacillus B* con *Cladosporium*, el primer día presenta la mayor inhibición del crecimiento, siendo del 88% y va disminuyendo conforme pasan los días (tabla 6, gráfica 3), también cambio el color de la colonia fungía de un color verde oscuro como se ve en el hongo control a un color verde claro y gris en con-cultivo con *Bacillus B* (figura 4).

Bacillus B disminuye el crecimiento de todos los hongos hasta el día 3, posteriormente solo a *Diaphorte* y a *Cladosporium*, también afecta el color de los hongos ya que tienen una tonalidad más clara que los hongos controles.

Tabla 6. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Bacillus B* sobre hongos ($p \leq 0.06$) Diferencia estadísticamente significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.7024 ±0.52	0.4461 ±0.05	0.4393 ±0.02	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 2</i>	0.8505 ±0.26	0.5111 ±0.04	0.1855 ±0.02	0.0081 ±0.02	-	-	-	-	-	-

<i>Trichoderma 3</i>	0.8443 ±0.27	0.4018 ±0.25	0.5421 ±0.07	0.3142 ±0.07	0.0589 ±0.01	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 4</i>	0.8609 ±0.24	0.5710 ±0.03	0.3106 ±0.04	0.0408 ±0.02	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 5</i>	0.8042 ±0.34	0.3384 ±0.06	0.8196 ±0.03	0.0111 ±0.03	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 6</i>	0.8366 ±0.28	0.5382 ±0.00	0.3671 ±0.07	0.0811 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	0.8181 ±0.32	0.6812 ±0.03	0.6040 ±0.05	0.5680 ±0.02	0.4362 ±0.01	0.2790 ±0.02	0.1433 ±0.05	0.0113 ±0.02	0.0039 ±0.03	-
<i>Cladosporium</i>	0.8804 ±0.21	0.2523 ±0.08	0.3721 ±0.03	0.4247 ±0.05	0.5679 ±0.02	0.5488 ±0.12	0.4835 ±0.13	0.4529 ±0.03	0.4890 ±0.07	0.4510 ±0.05



Gráfica 3. Antagonismo de *Bacillus B* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus B* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

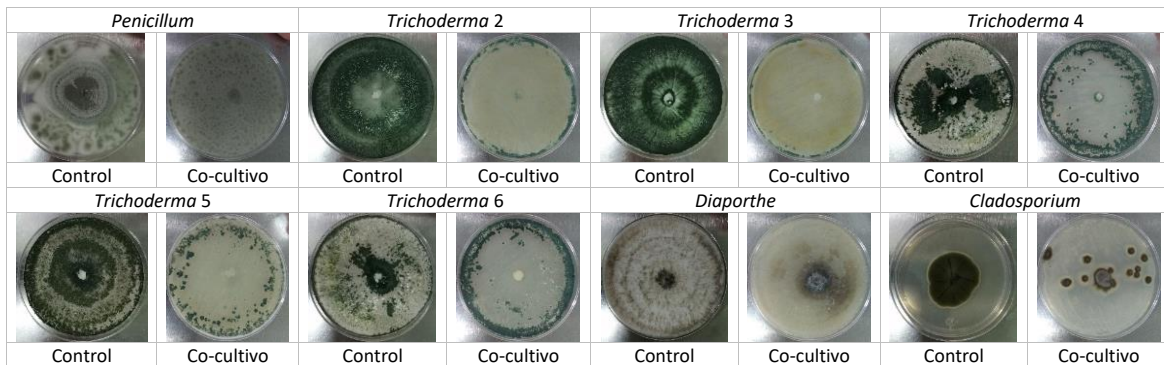


Figura 4. Antagonismo de *Bacillus B* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

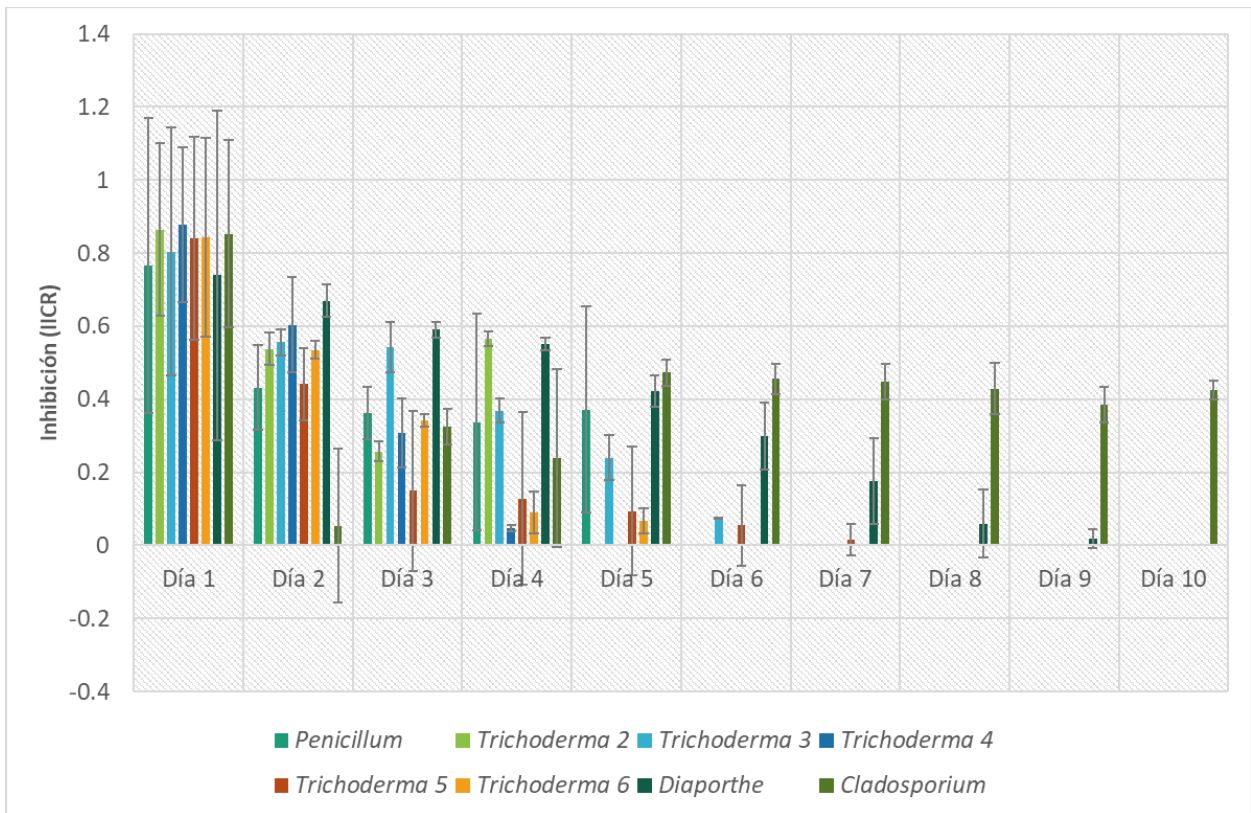
Bacillus C mostró variación en los índices de inhibición con cada hongo y para el caso de algunos hongos conforme pasan los días va disminuyendo la afectividad de antagonismo, en otros casos hay una fluctuación de índices conforme pasan los días. El co-cultivo de *Bacillus C* con *Penicillium* el primer día presenta mayor inhibición y va en disminución conforme pasan los días (tabla 7, gráfica 4), sin embargo, después del quinto día no se siguió con las mediciones debido a que, en el control como en co-cultivo hubo esporulación, por lo que presenta una interferencia en las mediciones. *Bacillus B* el color de la colonia de *Penicillium* ya que de un color gris fuerte en el hongo control, en co-cultivo tiene un color gris claro. La inhibición que *Bacillus C* sobre *Trichoderma 2*, el primer día presenta la mayor inhibición con un índice de 0.89 y disminuye conforme pasan los días (gráfica 4), después del cuarto día ya no se pudo seguir con las mediciones, debido a que el hongo ya había crecido en la totalidad de la placa, lo mismo pasa con los demás *Trichoderma* (tabla 7). También se vio afectado el color de *Trichoderma 2* ya presenta una coloración blanca transparente, con contorno verde claro (figura 5). La inhibición que *Bacillus C* da sobre *Trichoderma 3* su índice más alto se presentó en el primer día, siendo de 0.80 y conforme pasan los días va disminuyendo (tabla 7, gráfica 4), también se observó afectado el color de la colonia, tornándose a un color blanco transparente, con amarillo y contorno verde (figura 5). Para el caso de co-cultivo de *Bacillus C* con *Trichoderma 4*, el efecto de inhibición fue disminuyendo conforme pasan los días, sin embargo, en el cuarto día hay un aumento de inhibición (tabla 7, gráfica 4), también hay un cambio en el color de la colonia fúngica siendo de color blanco transparente con un halo verde (figura 5). El co-cultivo de *Bacillus C* con *Trichoderma 5* presentó índices de inhibición que fueron disminuyendo conforme los días (tabla 7, gráfica 4) y también fue afectado el color de la colonia fúngica, siendo esta de un color blanco, mientras que el hongo control se casi en la totalidad de color verde oscuro (figura 5). En el ensayo de antagonismo de *Bacillus C* con *Trichoderma 6* fue disminuyendo conforme pasan los días, por lo tanto, el índice más alto fue el primero de 0.84 (tabla 7, gráfica 4), el color de la colonia fúngica control y co-cultivo son diferentes, siendo la última de un color verde claro, con un contorno verde fuerte (figura 5). La inhibición que causó *Bacillus C* en *Diaporthe*, disminuye conforme pasan los días, presentando el mayor índice de inhibición el primer día y es de 0.73 (tabla 7, gráfica 4) y el color de la colonia en co-cultivo es gris claro (figura 5). La inhibición que causa *Bacillus C* sobre *Cladosporium*, tiene fluctuaciones, el primer día tiene un índice de inhibición de 0.85, sin embargo, el segundo día disminuye el efecto antagónico severamente a 0.05, el tercer día vuelve a aumentar y los siguientes días se mantiene oscilando en rangos de 0.29 a 0.47 (tabla 7, gráfica 4), el color de la colonia en co-cultivo es verde a café claro (figura 5).

Bacillus C inhibe principalmente el crecimiento de *Diaporthe* y en mayor medida a *Cladosporium*, en general también afecta el color de todos los hongos.

Tabla 7. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Bacillus C* sobre hongos ($p \leq 0.06$) Diferencia estadísticamente significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.7665 ±0.40	0.4317 ±0.12	0.3621 ±0.07	0.3374 ±0.30	0.3717 ±0.28	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 2	0.8639 ±0.24	0.5379 ±0.04	0.2567 ±0.03	0.5658 ±0.02	-	-	-	-	-	-

<i>Trichoderma</i> 3	0.8043 ±0.34	0.5555 ±0.04	0.5421 ±0.07	0.3684 ±0.03	0.2403 ±0.06	0.0739 ±0.00	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 4	0.8776 ±0.21	0.6040 ±0.13	0.3073 ±0.09	0.0472 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 5	0.8402 ±0.28	0.4412 ±0.10	0.1501 ±0.22	0.1280 ±0.24	0.0933 ±0.18	0.0552 ±0.11	0.0165 ±0.04	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 6	0.8427 ±0.27	0.5350 ±0.02	0.3426 ±0.02	0.0910 ±0.06	0.0667 ±0.03	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	0.7395 ±0.45	0.6694 ±0.04	0.5901 ±0.02	0.5518 ±0.02	0.4211 ±0.04	0.2978 ±0.09	0.1761 ±0.12	0.0599 ±0.09	0.0188 ±0.03	-
<i>Cladosporium</i>	0.8521 ±0.26	0.0538 ±0.21	0.3252 ±0.05	0.2390 ±0.24	0.4736 ±0.04	0.4557 ±0.04	0.4481 ±0.05	0.4289 ±0.07	0.3846 ±0.05	0.4247 ±0.03



Gráfica 4. Antagonismo de *Bacillus C* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus C* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

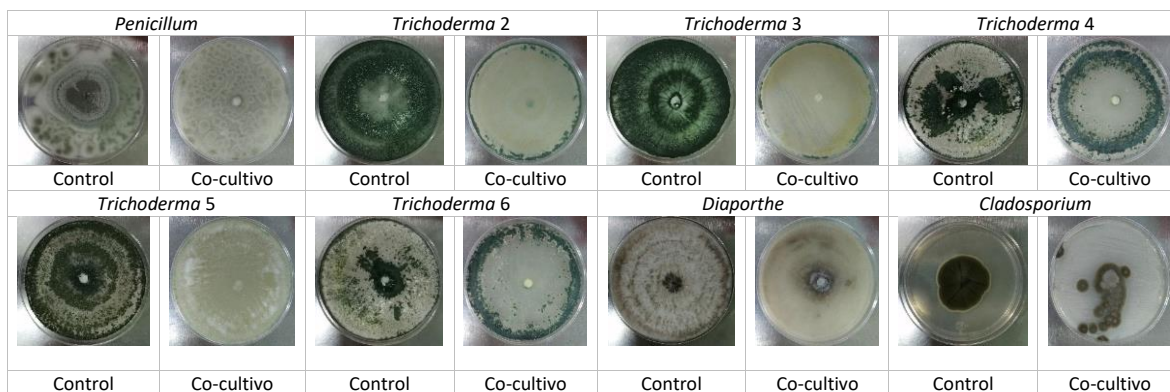


Figura 5. Antagonismo de *Bacillus C* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

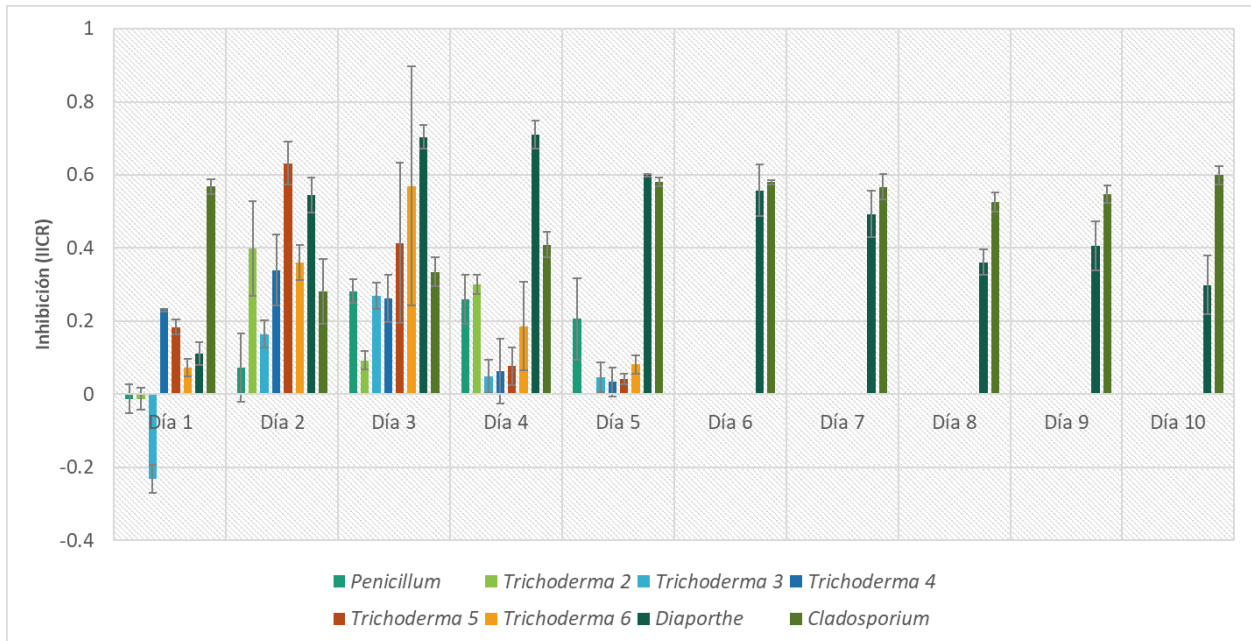
Bacillus D mostro una variación en los índices de inhibición de cada hongo, además de que en la mayoría de los hongos va disminuyendo la efectividad de antagonismo conforme pasan los días, y en el caso de *Cladosporium* hay una fluctuación de los índices como avanzan los días.

El co-cultivo de *Bacillus D* con *Penicillium*, se observa que realmente no hay un efecto que causara a su crecimiento, del segundo al quinto día se observó que hay una disminución de su crecimiento fúngico, el día en el que se presentó mayor inhibición fue el tercero con un índice de 0.28 (Tabla 8, gráfica 5), sin embargo, después del quinto día ya no se pudo seguir con las mediciones debido a que hubo esporulación, por parte del hongo en las placas del co-cultivo y en el control, lo que causa una interferencia de las mediciones, con respecto al co-cultivo de la bacteria con el hongo, se observó que cambio en el color de la colonia fúngica a un color blanco grisáceo (figura 6). En el co-cultivo de *Bacillus D* con *Trichoderma 2*, se observó, que en los dos primeros días no hay efecto significativo en el crecimiento del hongo, para el tercer día ya se observa una disminución del crecimiento con un índice de (0.28) sien embargo va disminuyendo el efecto conforme pasan los días (Tabla 8, gráfica 5), después del quinto días, no se pudo seguir con las mediciones debido a que hongo ya abarcaba toda la placa, lo mismo para con los demás *Trichoderma*. Hubo un cambio de color de *Trichoderma 2* siendo de un verde fuerte en el control a un centro blanco con contorno verde claro en el co-cultivo con *Bacillus D* (figura 6). En el co-cultivo de *Bacillus D* con *Trichoderma 3*, el primer día se ve un crecimiento positivo en el hongo con un índice de -0.23, en los días siguientes hay un aumento del índice lo que indicativo a que una reducción del crecimiento fúngico (Tabla 8, gráfica 5), también se presenta el cambio de color en la colonia fúngica con un centro blanco transparente u un contorno verde claro (figura 6). En el co-cultivo de *Bacillus D* con *Trichoderma 4* cuenta con inhibiciones significativas del crecimiento, en un rango de índices que van de 0.23 a 0.33, presentando mayor inhibición el día 3 (Tabla 8, gráfica 5), el cambio de color que se presento en la colonia fúngica fue de una colonia verde fuerte (hongo control) a una colonia verde claro con blanco (co-cultivo) como se observa en la figura 6. Los índices de inhibición significativos que se presentaron en el ensayo de antagonismo de *Bacillus D* con *Trichoderma 5* fueron de 0.18, 0.63 y 0.41 de primer al tercer día (Tabla 8, gráfica 5), también se observó un cambio en la morfología de la colonia fúngica, el cual es más notable en el color, debido a que en el co-cultivo se observó una colonia fúngica verde

claro en su mayoría, con blanco transparente (figura 6). La inhibición que ejerció *Bacillus D* a *Trichoderma 6* va aumentando del primer al tercer día siendo en el día 3, el ultimo presentando una inhibición de 0.56, después del tercer día fue disminuyendo el efecto antagónico (Tabla 8, gráfica 5), también se observó afectado el color de la colonia fúngica siendo de un verde grisáceo claro (figura 6). La disminución del crecimiento de *Bacillus D* sobre *Diaporthe* en los días tres y cuatro fue del 70% con un índice de inhibición de 0.70 en ambos casos, los primeros días fue aumentando drásticamente la inhibición, sin embargo, después del quinto día fue disminuyendo paulatinamente (Tabla 8, gráfica 5), también hubo un efecto notorio en el color del hongo a un gris claro (figura 6). Finalmente, los índices de inhibición del co-cultivo de *Bacillus D* con *Cladosporium* oscilaron de 0.28 a 0.59, teniendo en la mayoría de los días un porcentaje de inhibición de más del 50% (Tabla 8, gráfica 5), además de que el color de *Cladosporium* fue un verde claro a gris (figura 6). *Bacillus D* por su parte inhibe fuertemente a *Cladosporium* ya que su crecimiento esta reducido a más del 40%, con respecto a *Diaporthe* su crecimiento tiene una disminución mayor al 20%, *Bacillus D* no solo afecto el crecimiento de los hongos si no también afecto el color.

Tabla 8. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Bacillus D* sobre hongos. ($p \leq 0.05$) Diferencia estadísticamente minima significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillum</i>	-0.0132 ±0.04	0.0737 ±0.09	0.2824 ±0.03	0.2601 ±0.07	0.2062 ±0.11	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 2</i>	-0.0123 ±0.03	0.3982 ±0.13	0.0929 ±0.03	0.3010 ±0.03	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 3</i>	-0.2322 ±0.04	0.1649 ±0.04	0.2696 ±0.04	0.0494 ±0.05	0.0460 ±0.04	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 4</i>	0.2300 ±0.00	0.3398 ±0.10	0.2619 ±0.07	0.0631 ±0.09	0.0335 ±0.04	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 5</i>	0.1834 ±0.02	0.6322 ±0.06	0.4141 ±0.22	0.0770 ±0.05	0.0422 ±0.01	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 6</i>	0.0730 ±0.02	0.3603 ±0.05	0.5692 ±0.33	0.1857 ±0.12	0.0816 ±0.03	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	0.1117 ±0.03	0.5451 ±0.05	0.7039 ±0.03	0.7096 ±0.04	0.5988 ±0.00	0.5577 ±0.07	0.4931 ±0.06	0.3613 ±0.04	0.4061 ±0.07	0.2984 ±0.08
<i>Cladosporium</i>	0.5683 ±0.02	0.2821 ±0.09	0.3346 ±0.04	0.4091 ±0.04	0.5808 ±0.01	0.5797 ±0.01	0.5669 ±0.03	0.5257 ±0.03	0.5470 ±0.02	0.5991 ±0.02



Gráfica 5. Antagonismo de *Bacillus D* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus D* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

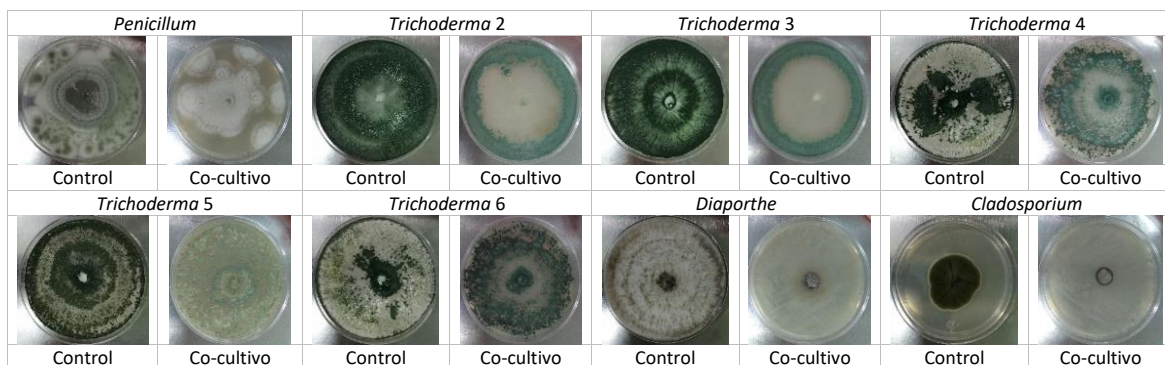


Figura 6. Antagonismo de *Bacillus D* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

En primer lugar, *Bacillus E* mostró una variación en el índice de inhibición de cada hongo y conforme pasan los días, también exhibe una variación.

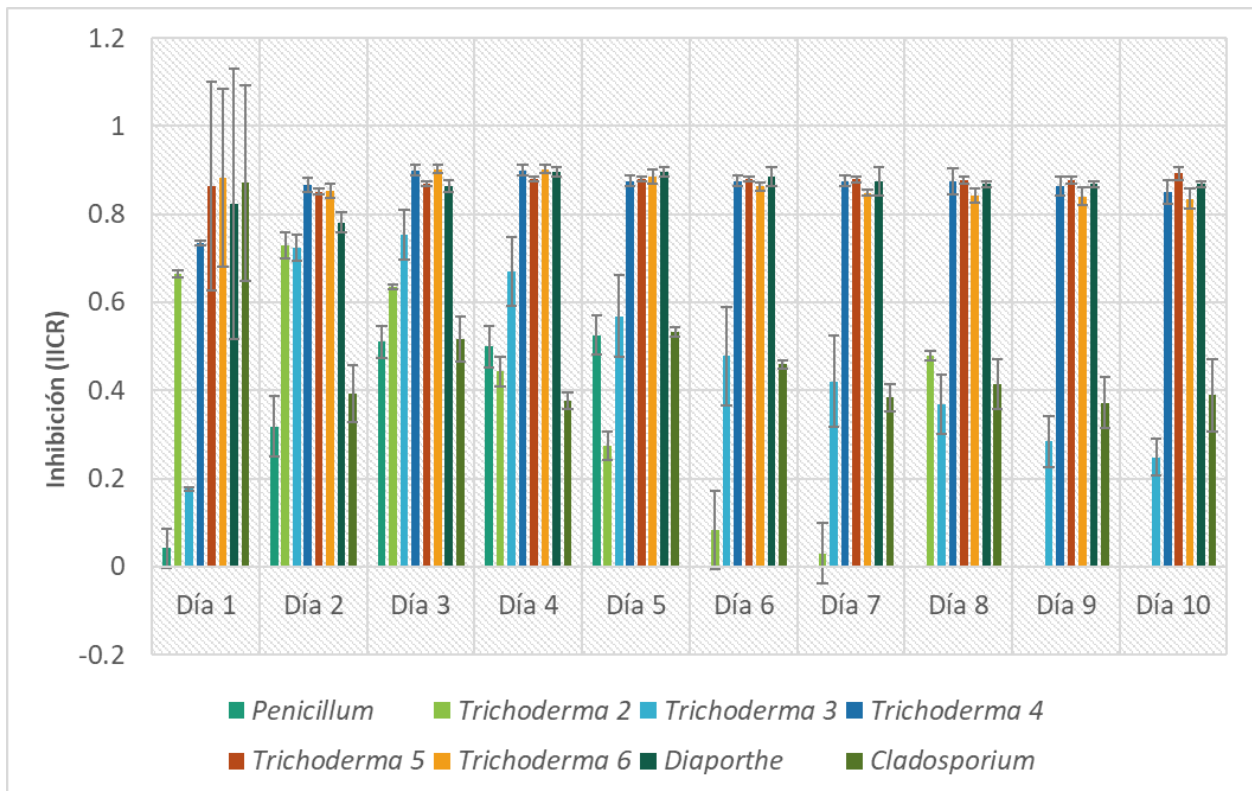
Los resultados indican en el ensayo de antagonismo de *Bacillus E* sobre *Penicillium* fue aumentando durante los tres primeros días, del tercer al quinto día se mantuvo el índice de inhibición en un rango de 0.50 hasta el sexto día (tabla 9, gráfica 6), sin embargo, ya no se pudo seguir con las mediciones después del sexto día, ya que en el control como en el co-cultivo con la bacteria, hubo esporulación del hongo por lo que presentaba una interferencia en las mediciones. El color de la colonia fúngica con *Bacillus E*, fue con un centro blanco y contorno gris claro (figura 7), que difiere al color gris del hongo (*Penicillium*) control. El ensayo de antagonismo de *Bacillus E* sobre *Trichoderma 2* aumento del primer (0.66) al segundo (0.72) día, después de este, fueron disminuyendo los índices conforme pasaron los días (tabla 9, gráfica 6), el color la colonia de *Trichoderma 2* en el co-cultivo fue mayormente blanco, con partes verdes claras (figura 7). La inhibición del co-cultivo de *Bacillus E* con *Trichoderma*

3 aumento drásticamente del primer (0.17) al segundo (0.72) día, en el tercer día se obtuvo la mayor inhibición con un índice de 0.75, posteriormente fueron disminuyendo los índices de inhibición (tabla 9, gráfica 6); esto sucede debido a la comparación del radio del hongo control que tiene un crecimiento rápido (abarca la totalidad de la placa de 3 a 4 días), el hongo al estar en co-cultivo con *Bacillus E* va ralentizando el crecimiento fúngico y se hace la comparación con el radio de la placa, lo mismo sucede con los demás *Trichoderma* 3. La inhibición que provocó *Bacillus E* sobre *Trichoderma* 3 fue en aumento del primer al tercer día, llegando a un índice de 0.75, después del tercer día el índice de inhibición fue en un descenso paulatino (tabla 9, gráfica 6). También se observó un cambio morfológico en la colonia fúngica en co-cultivo con la bacteria, siendo esta de color verde claro con contorno blanco (figura 7). Los índices de inhibición del co-cultivo de *Bacillus E* con *Trichoderma* 5 estuvieron en un rango de 0.85 a 0.89 (tabla 9, gráfica 6), también hubo un cambio drástico en el color de la colonia fúngica de un verde fuerte (control) a un blanco transparente en el co-cultivo (figura 7). Por otra parte, Para el caso de *Bacillus E* con *Trichoderma* 6 los índices de inhibición estuvieron en un rango de 0.80 a 0.90 (tabla 9, gráfica 6), y el color de la colonia fúngica fue verde claro con contorno blanco. En el caso del ensayo de antagonismo de *Bacillus E* sobre *Diaporthe* presentó índices de inhibición en un rango de 0.78 a 0.89 (tabla 9, gráfica 6) y el color de la colonia fúngica fue blanco transparente (figura 7). Finalmente, el co-cultivo de *Bacillus E* con *Cladosporium* el primer día presentó la mayor inhibición con un índice de 0.87, para el segundo la inhibición disminuyó drásticamente a un índice de 0.39, en los posteriores días los índices estuvieron oscilando en un rango de 0.37 a 0.51 (tabla 9, gráfica 6).

Bacillus E tiene mayor biocontrol sobre los hongos, ya que disminuye severamente a las especies de *Trichoderma* y *Diaporthe* y en menor medida a *Cladosporium* y *Penicillium*.

Tabla 9. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Bacillus E* sobre hongos. ($p \leq 0.06$) Diferencia estadísticamente significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.0423 ±0.04	0.3181 ±0.07	0.5105 ±0.04	0.4999 ±0.05	0.5257 ±0.04	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 2	0.6651 ±0.01	0.7298 ±0.03	0.6351 ±0.00	0.4431 ±0.03	0.2753 ±0.03	0.0821 ±0.09	0.0301 ±0.07	0.4786 ±0.01	-	-
<i>Trichoderma</i> 3	0.1766 ±0.00	0.7241 ±0.03	0.7535 ±0.06	0.6704 ±0.08	0.5683 ±0.09	0.4783 ±0.11	0.4206 ±0.10	0.3678 ±0.07	0.2841 ±0.06	0.2482 ±0.04
<i>Trichoderma</i> 4	0.7351 ±0.01	0.8655 ±0.02	0.8996 ±0.01	0.8996 ±0.01	0.8753 ±0.01	0.8753 ±0.01	0.8753 ±0.01	0.8744 ±0.03	0.8638 ±0.02	0.8504 ±0.03
<i>Trichoderma</i> 5	0.8635 ±0.24	0.8516 ±0.01	0.8685 ±0.01	0.8795 ±0.01	0.8795 ±0.01	0.8795 ±0.01	0.8791 ±0.01	0.8774 ±0.01	0.8774 ±0.01	0.8926 ±0.01
<i>Trichoderma</i> 6	0.8833 ±0.20	0.8533 ±0.02	0.9028 ±0.01	0.9028 ±0.01	0.8861 ±0.02	0.8636 ±0.01	0.8487 ±0.01	0.8433 ±0.02	0.8404 ±0.02	0.8355 ±0.02
<i>Diaporthe</i>	0.8229 ±0.31	0.7814 ±0.02	0.8642 ±0.01	0.8973 ±0.01	0.8973 ±0.01	0.8851 ±0.02	0.8745 ±0.03	0.8681 ±0.01	0.8681 ±0.01	0.8681 ±0.01
<i>Cladosporium</i>	0.8718 ±0.22	0.3933 ±0.07	0.5167 ±0.05	0.3769 ±0.02	0.5332 ±0.01	0.4589 ±0.01	0.3835 ±0.03	0.4147 ±0.06	0.3716 ±0.06	0.3891 ±0.08



Gráfica 6. Antagonismo de *Bacillus E* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus E* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

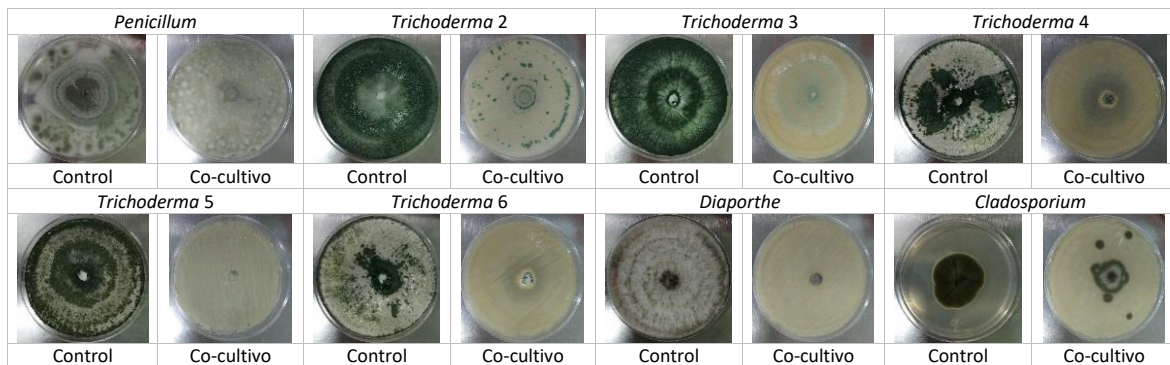


Figura 7. Antagonismo de *Bacillus E* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

Paraburkholderia mostró variación en el índice de inhibición de cada hongo y conforme pasan los días, también exhibe una variación, además de que también se ve una promoción de crecimiento fúngico, en algunos casos.

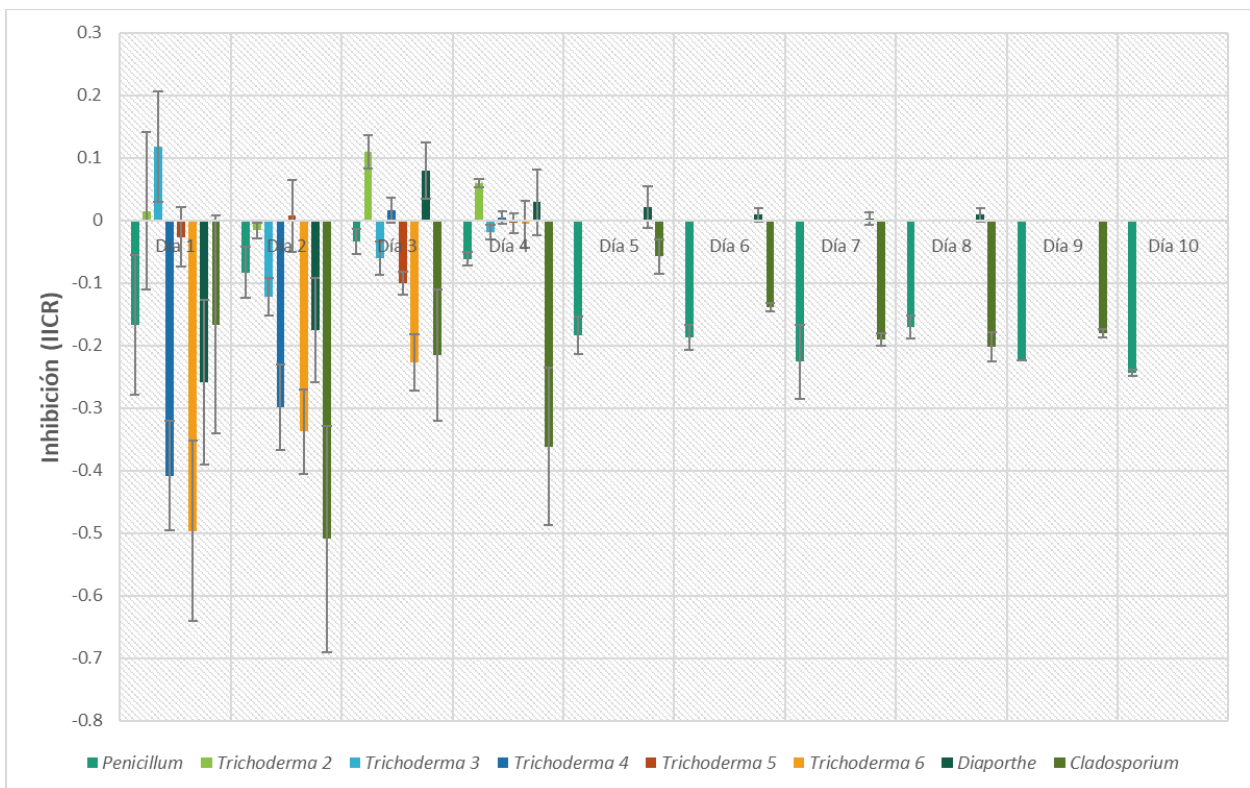
Los resultados indican que en el co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Penicillium* presento índices de inhibición negativos que oscilan en un rango de -0.03 a -0.24 (Tabla 10, gráfica 7), lo que indica que ayuda al crecimiento del hongo e incluso se intensifico el color de la colonia fúngica (figura 8). En el caso de *Trichoderma 2* presento índices de inhibición variables positivos con efecto de inhibición menor al 10% y uno negativo (-0.01) (Tabla 10, gráfica 7),

también se presentó un cambio de color en la colonia fúngica de un amarillo claro (control) a un verde claro (hongo en co-cultivo) (figura 8). Después del cuarto día, en los hongos del género *Trichoderma* no se pudo seguir con las mediciones debido a que la colonia fúngica ya abarcaba la totalidad de la placa, lo mismo sucedió en el caso de *Diaporthe* solo que en octavo día. En el caso del co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Trichoderma* 3 el primer día disminuyó el crecimiento del hongo ya que mostro un índice de 0.11, posteriormente ayudo al crecimiento ya que del segundo al cuarto día los índices fueron negativos de -0.12, -0.05 y -0.01 respectivamente (Tabla 10, gráfica 7), e intensifico el color de la colonia fúngica (figura 8). El co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Trichoderma* 4 los índices de inhibición fueron variables, presentando índices negativos los dos primeros días (-0.40, -0.29), el tercer día aumento drásticamente a 0.33, sin embargo, en el cuarto día volvió a prestar una disminución del índice (0.01) (Tabla 10, gráfica 7). Los índices de inhibición co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Trichoderma* 5 estuvieron en un rango de 0.0 a -0.10 (Tabla 10, gráfica 7). Los índices que se presentaron en el co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Trichoderma* 6 fueron negativos (Tabla 10, gráfica 7), lo que indica que *Paraburkholderia* favoreció el crecimiento hasta un 40% de *Trichoderma* 6. El índice de inhibición del co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Diaporthe* fueron negativos los primeros dos días, siendo de -0.25, -0.17, posteriormente hubo una inhibición del crecimiento ya que presento índices positivos, los cuales son de 0.07, 0.02, 0.02 (Tabla 10, gráfica 7), al ser unos índices tan bajo, realmente no se podría concluir que afecta al crecimiento de *Diaporthe*, pero si intensifico el color gris de la colonia fúngica (figura 8). Al igual que en el caso de *Penicillium* los índices que se presentan en el co-cultivo de *Paraburkholderia* con *Cladosporium* son negativos (Tabla 10, gráfica 7) lo que indica que promueve su crecimiento y también intensifica el color de la colonia fúngica (figura 8).

Paraburkholderia estimuló el crecimiento en *Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma* 6. Se han estudiado las interacciones positivas mutualistas entre hongos y bacterias por ejemplo Warmink (2011), Nazir (2012) y colaboradores en sus estudios iniciales sobre bacterias que pueden interactuar con hongos del suelo como *Laccaria proxima* y / o *Lyophyllum* sp. cepa Karsten, se encontró que las bacterias particularmente dominantes podían migrar a lo largo de las hifas de los hongos, las estrategias que se presume se utilizan en esta interactividad fúngica incluyen formar biopelículas en estas y crecer por compuestos presentes en los exudados de hongos, la cepas con estas características se les han denominado como fungifílicas, ejemplos del género *Paraburkholderia* que cuentan con estas características son *P. terrae*, *P. hospita* y *P. caribensis*, estas cepas, al igual que la *Paraburkholderia* con la que trabajamos, tenían un origen en el suelo y podrían compartir rasgos que confieren interactividad con organismos del suelo como los hongos, lo cual es consistente con una presunta ascendencia común y ecofisiología cepas (Pratama *et al.* 2020, Pratama *et al.* 2017).

Tabla 10. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de *Paraburkholderia* sobre hongos. ($p \leq 0.02$) Diferencia estadísticamente mínima significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	-0.1670 ±0.11	-0.0832 ±0.04	-0.0346 ±0.02	-0.0615 ±0.01	-0.1842 ±0.03	-0.1868 ±0.02	-0.2260 ±0.06	-0.1702 ±0.02	-0.2244 ±0.00	-0.2439 ±0.01
<i>Trichoderma 2</i>	0.0151 ±0.13	-0.0158 ±0.01	0.1099 ±0.03	0.0596 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 3</i>	0.1178 ±0.09	-0.1224 ±0.03	-0.0599 ±0.03	-0.0184 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 4</i>	-0.4082 ±0.09	-0.2987 ±0.07	0.3327 ±0.02	0.0047 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 5</i>	-0.0268 ±0.05	0.0072 ±0.06	-0.1011 ±0.02	-0.0046 ±0.02	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma 6</i>	-0.4965 ±0.14	-0.3377 ±0.07	-0.2268 ±0.05	-0.0062 ±0.04	-	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	-0.2592 ±0.13	-0.1752 ±0.08	0.0789 ±0.05	0.0286 ±0.05	0.0214 ±0.03	0.0088 ±0.01	0.0029 ±0.01	0.0088 ±0.01	-	-
<i>Cladosporium</i>	-0.1667 ±0.17	-0.5093 ±0.18	-0.2162 ±0.11	-0.3621 ±0.13	-0.0577 ±0.03	-0.1387 ±0.01	-0.1906 ±0.01	-0.2017 ±0.02	-0.1806 ±0.01	-



Gráfica 7. Antagonismo de *Paraburkholderia* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Paraburkholderia* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

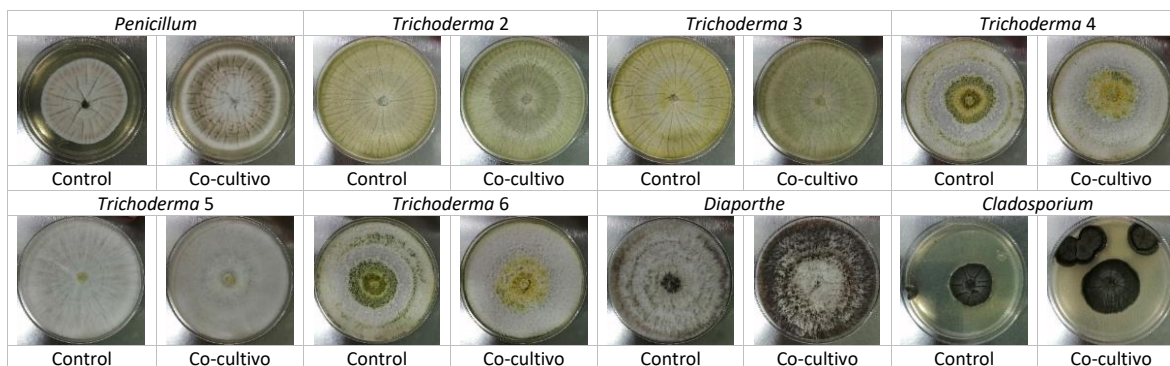


Figura 8. Antagonismo de *Paraburkholderia* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

Para ejemplificar más el antagonismo de todas las bacterias que ejercen sobre cada uno de los hongos, se presenta la tabla 11, en donde se observa que *Bacillus E* presenta el mayor biocontrol sobre los hongos, entre todas las cepas bacterianas, por lo que se seleccionó para seguir trabajando para los posteriores experimentos.

Tabla 11. Tabla resumen del antagonismo que ejercieron cada una de las bacterias sobre cada uno de los hongos. +++ es un antagonismo severo, ++ antagonismo medio, + poco antagonismo y – no hubo antagonismo.

	<i>Penicillium</i>	<i>Trichoderma 2</i>	<i>Trichoderma 3</i>	<i>Trichoderma 4</i>	<i>Trichoderma 5</i>	<i>Trichoderma 6</i>	<i>Diaporthe</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Bacillus A</i>	+	++	+++	+++	++	++	+++	++
<i>Bacillus B</i>	+	++	++	++	++	++	+++	++
<i>Bacillus C</i>	+	++	++	++	++	++	+++	++
<i>Bacillus D</i>	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>Bacillus E</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Paraburkholderia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Bacillus spp. han sido identificados como potentes antagonistas contra algunas especies de *Penicillium* y *Trichoderma* (Toure et al., 2004, Kim et al., 2004), también de otros hongos patógenos como por ejemplo *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, y *Pythium ultimum* debido a la producción de compuestos antifúngicos, antibióticos y proteasas (Singh et al., 2008).

ANTAGONISMO POR COMPUESTOS VOLÁTILES

Los compuestos volátiles pueden actuar de manera directa sobre microorganismos patógenos produciendo daño en el ADN (Pedraza et al., 2020), esto se da, debido a que la interacción entre los COV y las membranas celulares juega un papel clave en la toxicidad inducida por COV al inducir la producción de ROS. Esta producción de ROS puede dañar las proteínas y el ADN (Dezest, et al., 2017).

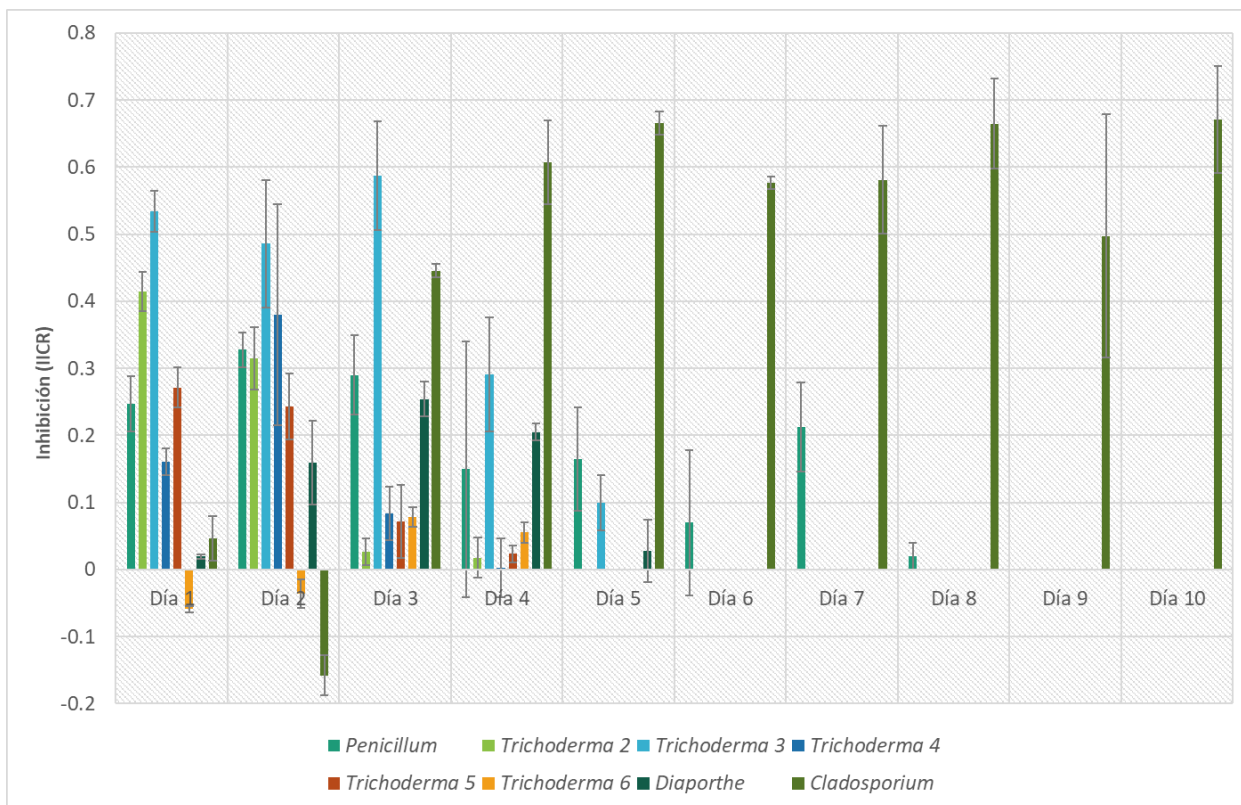
El ensayo de antagonismo que dan los COV de *Bacillus B* mostró una variación en el índice de inhibición de cada hongo y conforme pasan los días, también exhibe una variación. El efecto que tienen los COV sobre *Penicillium*, presentó índices de inhibición más significativos del primer al quinto día, siendo el índice más alto de 0.32 (Tabla 10, grafica 8). La inhibición de los COV sobre *Trichoderma 2* fue disminuyendo conforme pasan los días

(Tabla 10, grafica 8), posterior al quinto día ya no se continuo con la medición debido a que la colonia fúngica abarcaba la totalidad de la placa, lo mismo pasa con los *Trichoderma* y *Diaporthe*. Para el ensayo de COV sobre *Trichoderma* 3 los índices de inhibición estuvieron en un rango de 0.48 a 0.58 durante los tres primeros días, después del cuarto día fueron disminuyendo (Tabla 10, grafica 8). El efecto de los COV sobre *Trichoderma* 4 el primer día presentó un índice de inhibición de 0.16, al segundo día aumento a 0.37 y en tercer día disminuyo drásticamente (Tabla 10, grafica 8). Para el caso de afecto de los COV sobre *Trichoderma* 5, los índices de inhibición se mantuvieron en 0.2 en los dos primeros días y después disminuyo drásticamente (Tabla 10, grafica 8). Con respecto al efecto de los COV sobre *Trichoderma* 6 presento índices negativos, poco significativos (-0.0), los dos primeros días, los dos siguientes días también se presentaron positivos de 0.0 (Tabla 10, grafica 8), lo que no da una pauta a un efecto significativo de los COV sobre *Trichoderma* 6. Con respecto a la interacción de los COV sobre *Diaporthe* se observa que los tres primeros días fue en aumento, llegando hasta un 25% de inhibición (Tabla 10, grafica 8). El efecto del antagonismo de los COV de *Bacillus* E sobre *Cladosporium*, es donde se observa una mayor inhibición del crecimiento, ya que los índices de inhibición que se muestran va en un rango de 0.44 a 0.67 en la mayoría de los días (Tabla 10, grafica 8, figura 9). Para compuestos volátiles se puede observar que *Bacillus* E inhibe severamente a *Cladosporium*, disminuyendo su crecimiento radial a más del 50% después del día 4.

Se han estudiado los COV de *Bacillus* y cómo afectan inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de esporas de varios hongos patógenos (Chen *et al.*, 2007). Varios COV (p. Ej., 2-nonanona, 2-metilpirazina y β -bencenoetanamina) producidos por *B. subtilis* TB09 y TB72 controlaron eficazmente el patógeno de la antracnosis (*Penicillium crustosum*) ya que se demostró que los COV producidos por *B. subtilis* PPCB001 inhibió el crecimiento (Gao *et al.*, 2018).

Tabla 10. Índice de Inhibición del Crecimiento Radial de los COV producidos por *Bacillus* E sobre hongos. ($p \leq 0.05$) Diferencia estadísticamente significativa.

IICR	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.2476 ±0.04	0.3276 ±0.03	0.2902 ±0.06	0.1495 ±0.10	0.1647 ±0.08	0.0700 ±0.11	0.2124 ±0.07	0.0195 ±0.02	-	-
<i>Trichoderma</i> 2	0.4147 ±0.03	0.3150 ±0.05	0.0265 ±0.02	0.0176 ±0.03	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 3	0.5338 ±0.03	0.4858 ±0.09	0.5871 ±0.08	0.2912 ±0.09	0.0992 ±0.04	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 4	0.1607 ±0.02	0.3795 ±0.016	0.0837 ±0.04	0.0029 ±0.04	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 5	0.2714 ±0.03	0.2433 ±0.05	0.0713 ±0.05	0.0237 ±0.01	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> 6	-0.059 ±0.00	-0.035 ±0.02	0.0781 ±0.01	0.0553 ±0.02	-	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i>	0.0195 ±0.00	0.1596 ±0.06	0.2542 ±0.03	0.2051 ±0.01	0.0275 ±0.05	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	0.0461 ±0.03	-0.157 ±0.03	0.4452 ±0.01	0.6068 ±0.06	0.6653 ±0.02	0.5768 ±0.01	0.5813 ±0.08	0.6647 ±0.07	0.4974 ±0.18	0.6711 ±0.08



Gráfica 8. Antagonismo causado por los CVO producidos por *Bacillus E* sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus E* mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

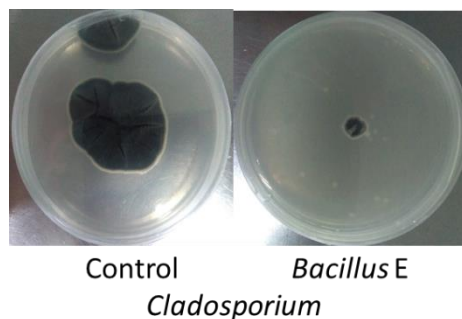


Figura 9. Antagonismo causado por los CVO producidos por *Bacillus E* sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de *Cladosporium* en co-inoculación, de 10 días.

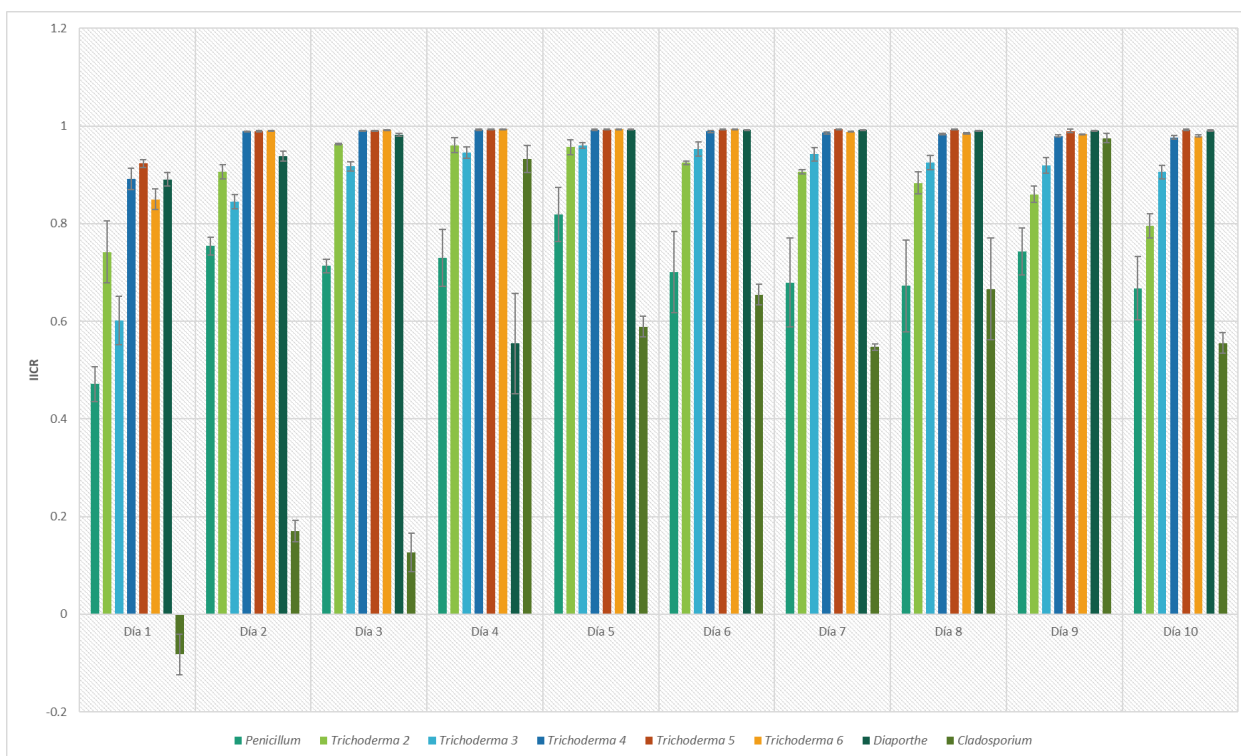
Evaluación de antagonismo por crecimiento dual inverso (EVALUACIÓN DE ÁREA)

En el primer ensayo de antagonismo que se realizó, se tomaron radios representativos de cada crecimiento fúngico, por lo que se considera que se hizo una estimación del tamaño real de la colonia fúngica, por lo que no se puede visualizar realmente el antagonismo que ejerció la bacteria (*Bacillus E*) sobre los hongos. Para acercarnos lo más posible al tamaño real de la colonia fúngica, se optó por la medición total del área con ayuda de fotografías y un programa de análisis de imágenes, ayudándonos a visualizar el antagonismo real que ejerce *Bacillus E* sobre los hongos. Se observa una diferencia con respecto a las mediciones ya que se presenta una disminución en la desviación estandar y los índices de inhibición son

mayores a 0.5 y llegando a índices de 0.9 (tabla 11, gráfica 9) en el ensayo de antagonismo donde se midió el área, a comparación del ensayo en donde solo se tomó radios representativos para la evaluación del efecto antagónico y es evidente principalmente en las gráficas (tabla 9, gráfica 6).

Tabla 11. Índice de Inhibición del Crecimiento del Área de *Bacillus E* sobre hongos. ($p \leq 0.04$) Diferencia estadísticamente significativa

IDCA	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
<i>Penicillium</i>	0.4712 ±0.04	0.7540 ±0.02	0.7135 ±0.01	0.7297 ±0.06	0.8190 ±0.06	0.7010 ±0.08	0.6794 ±0.09	0.6724 ±0.09	0.7423 ±0.05	0.6677 ±0.06
<i>Trichoderma</i> 2	0.7420 ±0.06	0.9063 ±0.01	0.9630 ±0.00	0.9605 ±0.02	0.9564 ±0.02	0.9247 ±0.00	0.9057 ±0.00	0.8835 ±0.02	0.8599 ±0.02	0.7951 ±0.02
<i>Trichoderma</i> 3	0.6021 ±0.05	0.8443 ±0.01	0.9173 ±0.01	0.9457 ±0.01	0.9603 ±0.01	0.9524 ±0.01	0.9420 ±0.01	0.9251 ±0.01	0.9192 ±0.02	0.9059 ±0.01
<i>Trichoderma</i> 4	0.8913 ±0.02	0.9886 ±0.00	0.9905 ±0.02	0.9917 ±0.00	0.9917 ±0.00	0.9887 ±0.00	0.9858 ±0.00	0.9837 ±0.00	0.9794 ±0.00	0.9767 ±0.00
<i>Trichoderma</i> 5	0.9232 ±0.01	0.9890 ±0.00	0.9900 ±0.00	0.9925 ±0.00	0.9925 ±0.00	0.9928 ±0.00	0.9928 ±0.00	0.9926 ±0.00	0.9897 ±0.00	0.9918 ±0.00
<i>Trichoderma</i> 6	0.8497 ±0.02	0.9899 ±0.00	0.9916 ±0.00	0.9939 ±0.00	0.9939 ±0.00	0.9939 ±0.00	0.9882 ±0.00	0.9852 ±0.00	0.9827 ±0.00	0.9794 ±0.00
<i>Diaporthe</i>	0.8906 ±0.01	0.9381 ±0.01	0.9819 ±0.00	0.5543 ±0.10	0.9925 ±0.00	0.9915 ±0.00	0.9914 ±0.00	0.9906 ±0.00	0.9903 ±0.00	0.9903 ±0.00
<i>Cladosporium</i>	- 0.0825 ±0.16	0.1705 ±0.15	0.1265 ±0.04	0.9323 ±0.03	0.5886 ±0.13	0.6545 ±0.12	0.5470 ±0.01	0.6663 ±0.10	0.9752 ±0.01	0.5555 ±0.15



Gráfica 9. Antagonismo del crecimiento del área de *Bacillus* E sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por *Bacillus* E mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

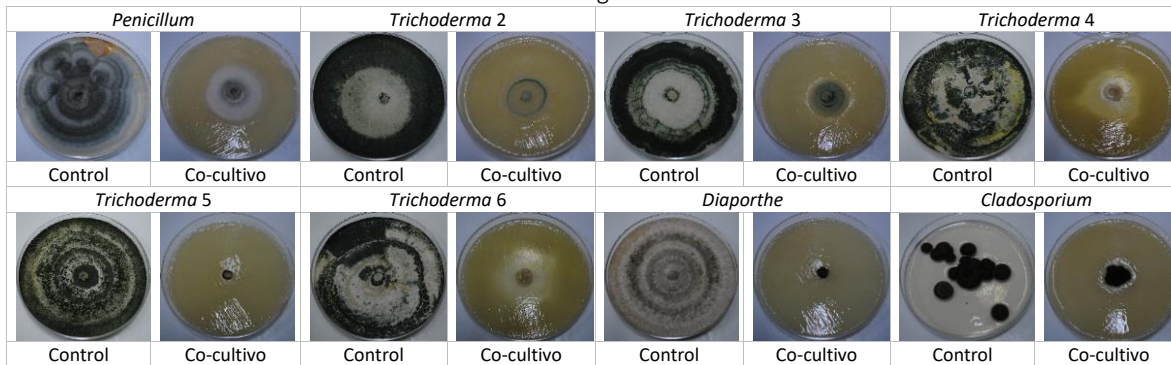


Figura 10. Antagonismo de *Bacillus* E sobre hongos. Cambio morfológico macroscópico de los hongos en co-inoculación, de 10 días.

METABOLITOS SECUNDARIOS

Bacillus spp. secretan muchos metabolitos secundarios, incluidos antibióticos, antifúngicos y sideróforos. Los metabolitos producidos por *Bacillus* spp. también pueden afectar la microflora en la rizosfera, proporcionando un ambiente antagónico a los patógenos, o pueden desencadenar respuestas de defensa del huésped (Sansinenea & Ortiz, 2011). Los metabolitos secundarios son secretados y por ello permanecen en el medio aun después de retirar completamente a las bacterias por lo cual se puede observar que a excepción del caso de *Penicillium* donde no se ve una disminución del crecimiento fúngico con respecto al control, el crecimiento de los demás hongos se ve disminuido debido a que hay menor presencia de colonias fúngicas, por lo que se observan más dispersas en la placa, a comparación de los controles, también se observa que hay diferencia en el color que se presenta en las colonias fúngicas, ya que observan colores más claros a comparación de los hongos controles, lo que indica que *Bacillus* E secreta metabolitos secundarios que contribuyen a la disminución del crecimiento de los hongos, afectando la apariencia fúngica, principalmente se observa en el color de los hongos como se observa en la Figura 11. Los ensayos de antagonismo *in vitro* revelaron que las propiedades de control biológico dependen del hongo. Los metabolitos secundarios se definen generalmente como pequeñas moléculas orgánicas producidas por un organismo que no son esenciales para su crecimiento, desarrollo y reproducción (Casas & Olmedo 2014). Miembros de *B. subtilis* se sabe desde hace mucho tiempo que el grupo produce una variedad de metabolitos secundarios, incluidos policétidos, terpenos y sideróforos, así como péptidos sintetizados ribosómicamente y no ribosómicamente. (Harwood *et al.* 2018). Los metabolitos de *Bacillus subtilis* secundarios que poseen amplio espectro antifúngico frente a diversos hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp., *Botrytis cinérea* (Kiesewalter *et al.*, 2020), otra especie del género *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* SQR9 ha exhibido actividades predominantemente antagonistas contra una amplia gama de patógenos del suelo y algunos de los metabolitos producidos SQR9 y han presentado efecto antagónico; como, bacilomicina D sobre *Fusarium oxysporum*. Fengycin contribuyó a la actividad antagonista contra *Verticillium dahliae* kleb, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Phytophthora parasitica*. Surfactin participó

en el proceso antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (Li et al., 2014).

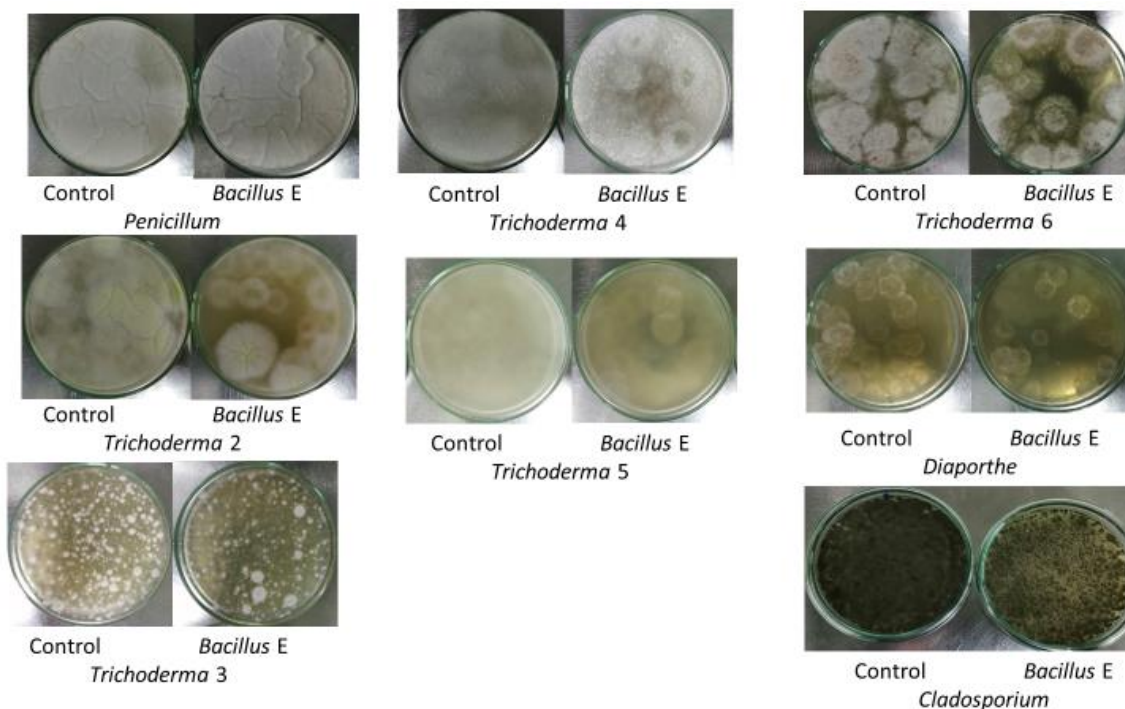
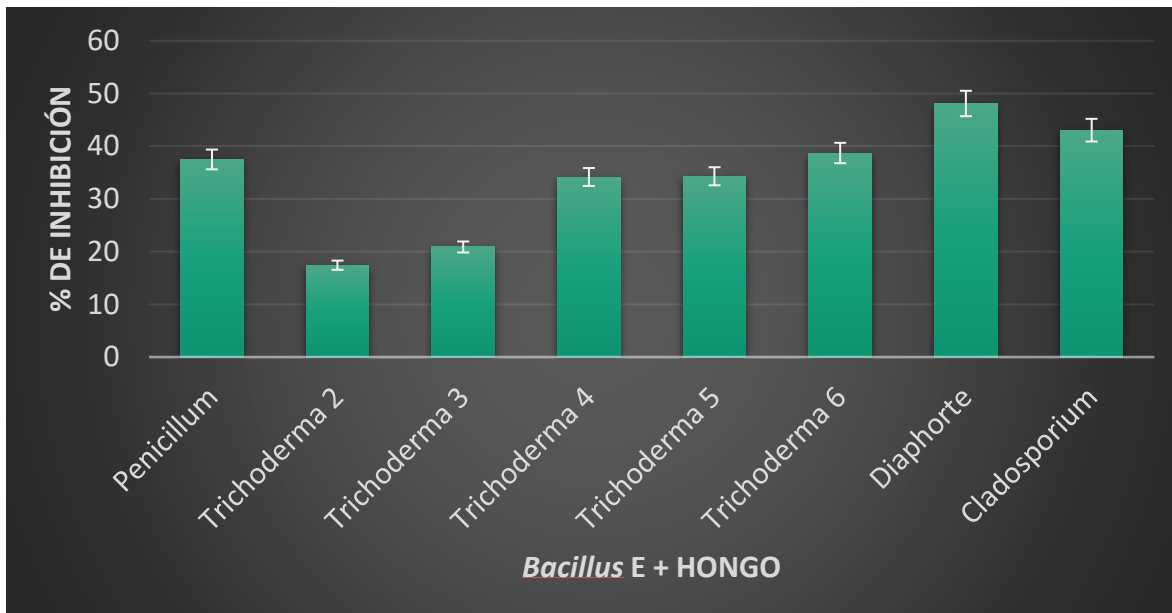


Fig. 11. Crecimiento fúngico después de 3 días en presencia de metabolitos secretados por *Bacillus E*, evidenciando el cambio morfológico macroscópico de los hongos como es la disminución de las colonias y su tamaño.

ANTAGONISMO EN MEDIO LÍQUIDO

En medio líquido al igual que en medio sólido *Bacillus E* inhibe a todos los hongos y principalmente a *Diaporthe* y *Cladosporium* con un porcentaje mayor al 40% de su peso total seco, y en menor medida a *Trichoderma 2* y *3* con porcentajes menores del 25% (Gráfica 10), sin embargo, la inhibición del crecimiento en medio líquido es menor que en medio sólido. Mejía y col. (2016) hicieron un ensayo similar, solo que ellos determinaron la inhibición en la germinación de conidios por filtrados bacterianos sobre *F. equiseti*, y en *F. solani* donde los promedios fueron 12.75 a 100%, la efectividad de 100 % se observó en *Colletotrichum musae*, expuesto a filtrados de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, ellos determinan que hay una diferencia de inhibición en medio líquido como en medio sólido, como también se presentó en nuestros resultados.



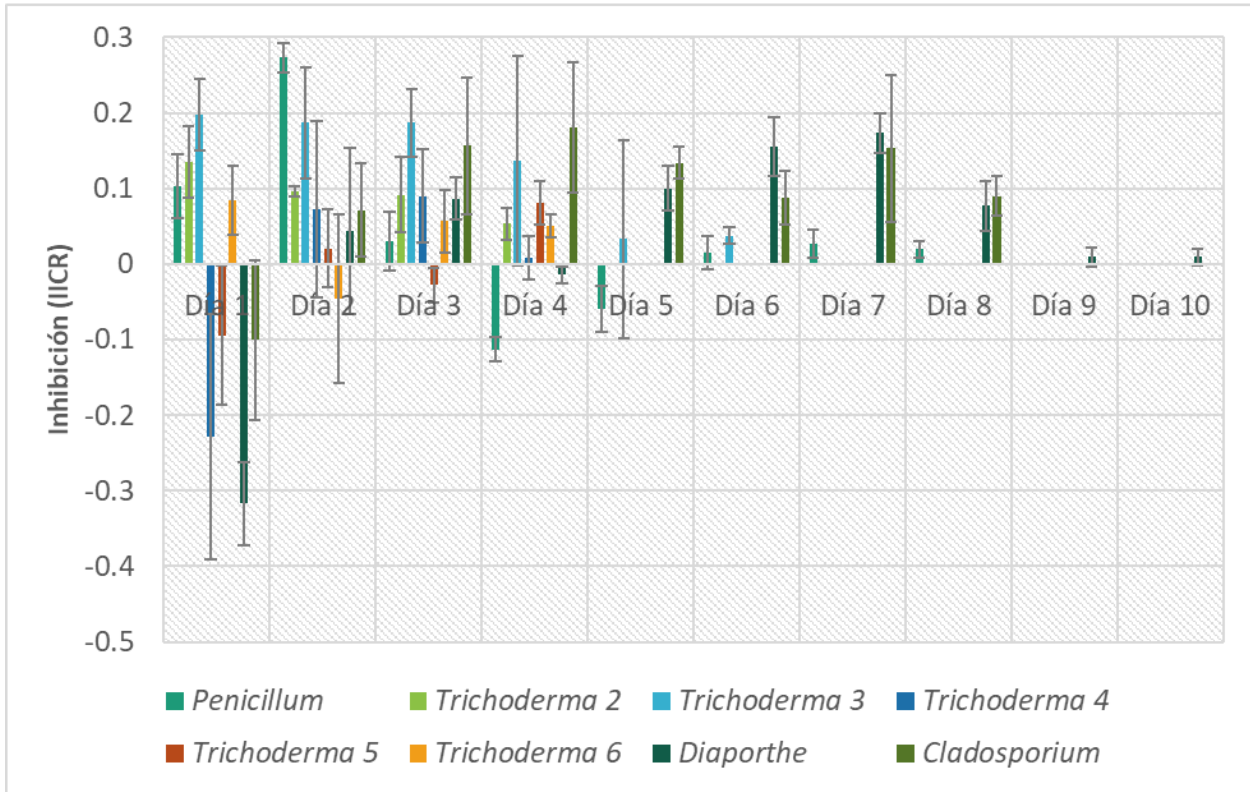
Gráfica 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico en co-inoculación con *Bacillus E*.

Dinámica Bacteriana

La fluctuación de las poblaciones en las comunidades bacterianas pueden ser clave e importante para controlar el crecimiento fúngico. Se evaluaron diferentes formulaciones de medios de cultivo y aunque no se pudo encontrar ningún medio selectivo para cada una de las bacterias, para determinar la población de cada una, al crecer en co-cultivo; cabe recalcar que por separado el género *Bacillus* presentó biocontrol positivo hacia los hongos, y en el caso de *Paraburkholderia* promovió el crecimiento fúngico, por lo que se propuso evaluar el conjunto de bacterias en un Mix bacteriano para evaluar el efecto que producen al crecimiento fungico.

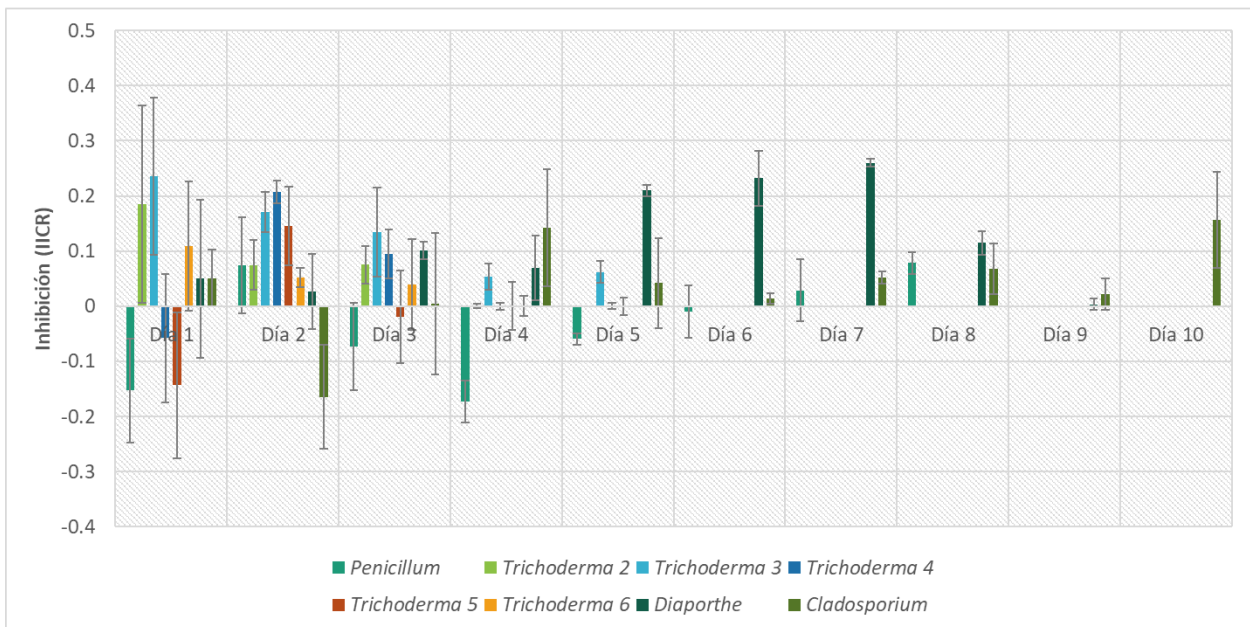
En el caso antagonismo dual, donde se pone en un extremo la bacteria y en el extremo contrario se coloca el hongo, se puede observar que el crecimiento a la dirección de la bacteria es radial figura 12, sin embargo, cuando éste se va acercando a ella, va formando una tipo boquilla, que se va cerrando, haciendo un efecto tipo "Pac-man", para finalmente seguir su crecimiento sobre las bacterias lo que sugiere que hay una probable secreción de metabolitos por parte de las bacterias y que también puede haber una competencia de nutrientes ya que impide la bacteria el crecimiento radial uniforme del hongo. Los efectos antagónicos del total del Mix bacteriano 1 y 2 son muy similares, sin embargo, el antagonismo sobre *Diaporthe* y *Cladosporium* fue no mayor al 20% en MB1, y en el caso de MB2 las bacterias mayor al 20% sobre *Diaporthe* como se logra observar en las gráficas (Gráficas 9 y 10).

MB 1



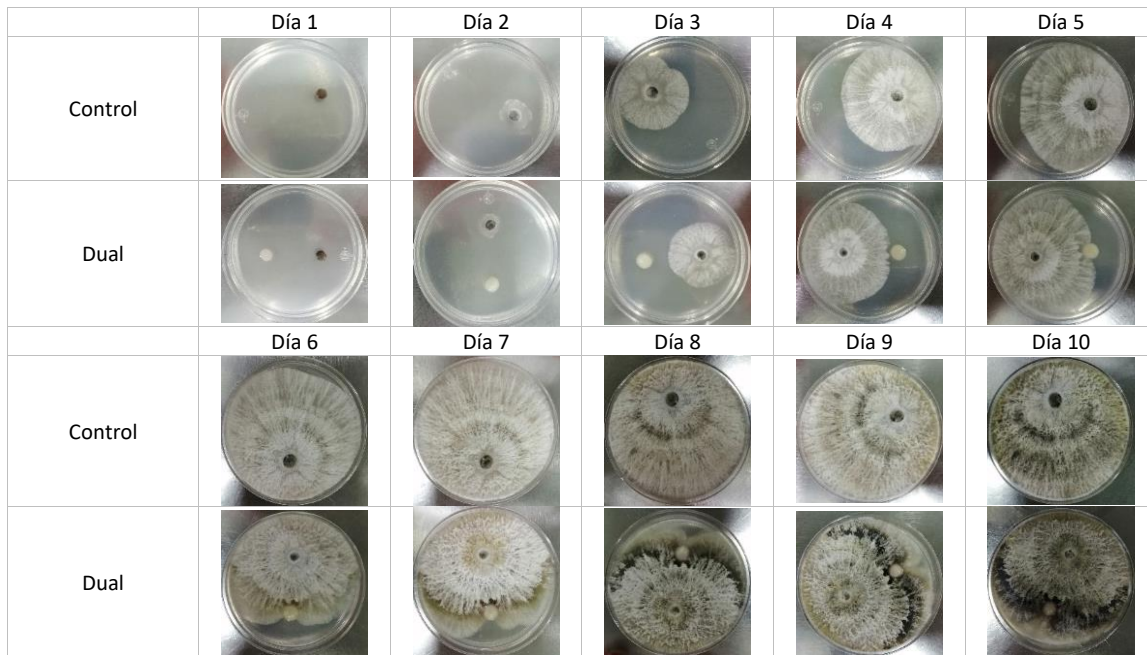
Gráfica 9. Antagonismo del crecimiento en cultivo con el MB1 sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por MB1 mediante crecimiento dual sobre hongos.

MB 2



Gráfica 10. Antagonismo del crecimiento del Mix bacteriano 2 sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por el conjunto bacteriano (MB2) mediante crecimiento dual sobre hongos.

MB2



MB1

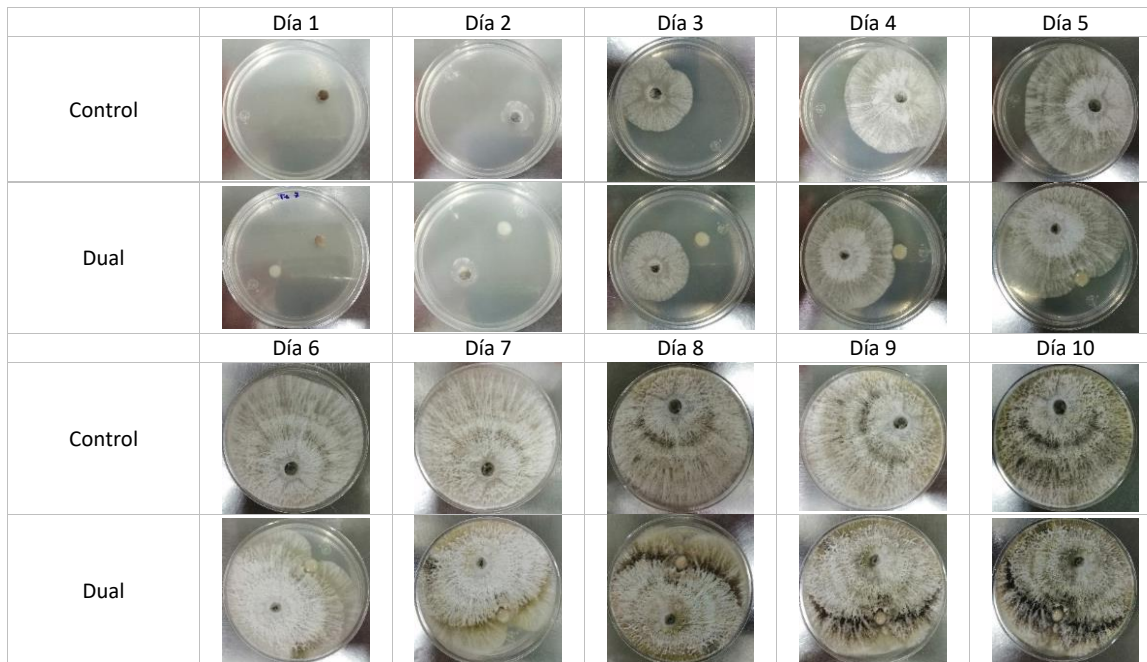
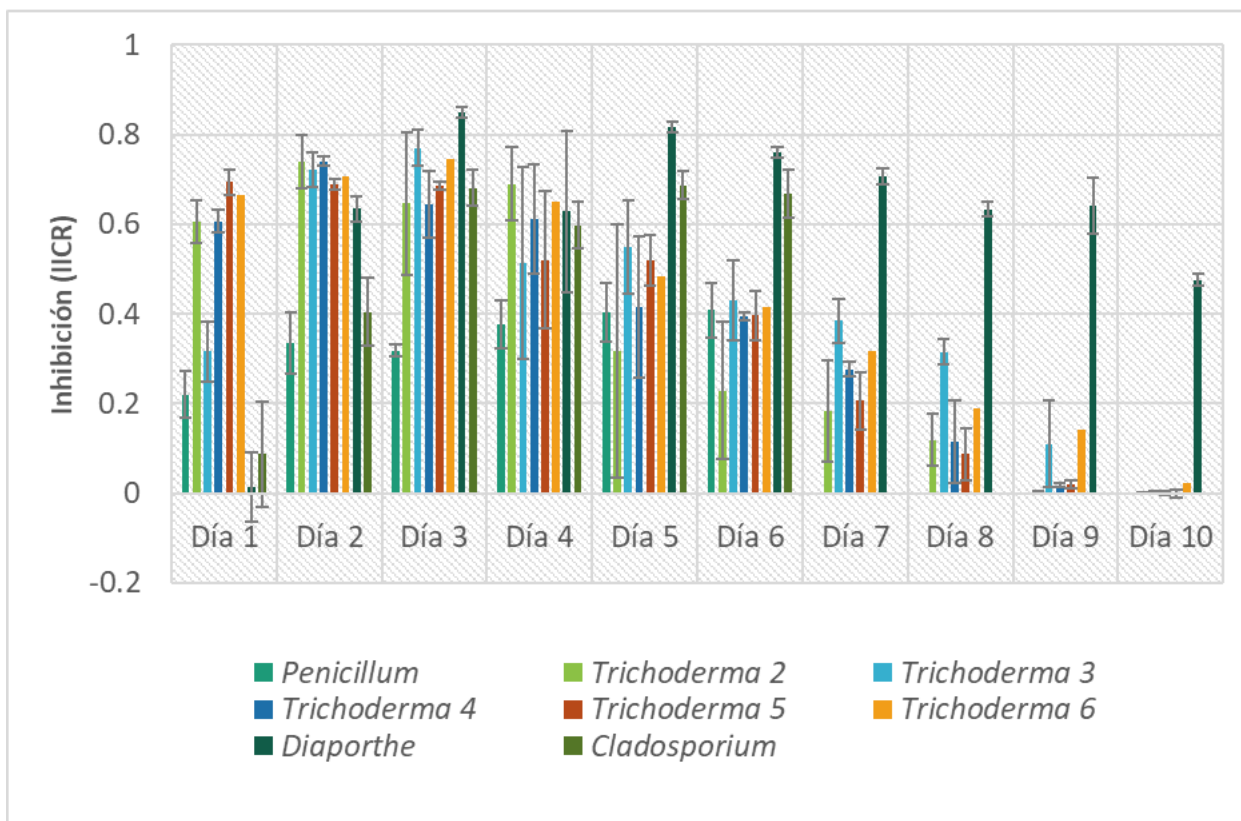


Fig. 12. Antagonismo que ejercen todas las bacterias (MB 1 y 2) sobre *Diaporthe*. Tanto en co-cultivo como juntando todas las bacterias, observando el efecto "Pac-man" en los días 5, 6 y 7 en ambos casos.

En el caso de el antagonismo dual inverso se observó que la inhibición de hongos es similar al estar todas las bacterias cultivadas en co-cultivo (MB 1 y 2). Se puede observar que las bacterias al estar en contacto directo con los hongos ejercen mayor biocontrol sobre todos los hongos, observando que los índices de inhibición son mayores al 0.20 en la mayoría de los casos, llegando hasta un 80% en *Diaporthe*. Además de haber una disminución del

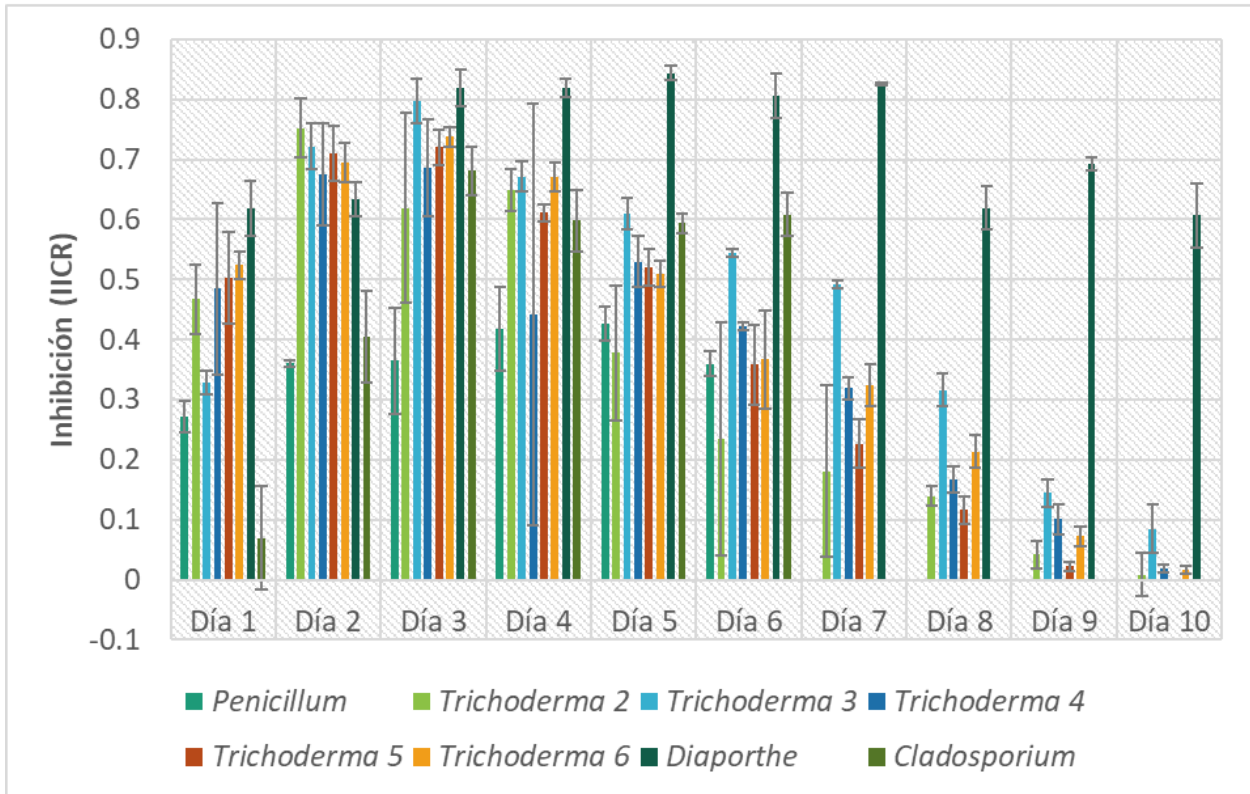
crecimiento, también hay un cambio de coloración, haciéndolo más claro (Gráfica 11 y 12, figura 13), que al estar separadas las bacterias del hongo como es en el caso anterior (gráficas 9 y 10) donde los índices de inhibición son menores al 20% en todos los hongos. Al comparar las gráficas del antagonismo dual inverso de cada una de las bacterias por separado (gráficas 2-7) hay una mayor inhibición de los hongos con el Mix bacteriano (1 y 2) que por separado, sin embargo en el caso de *Bacillus E* la efectividad bajo.

MB 1



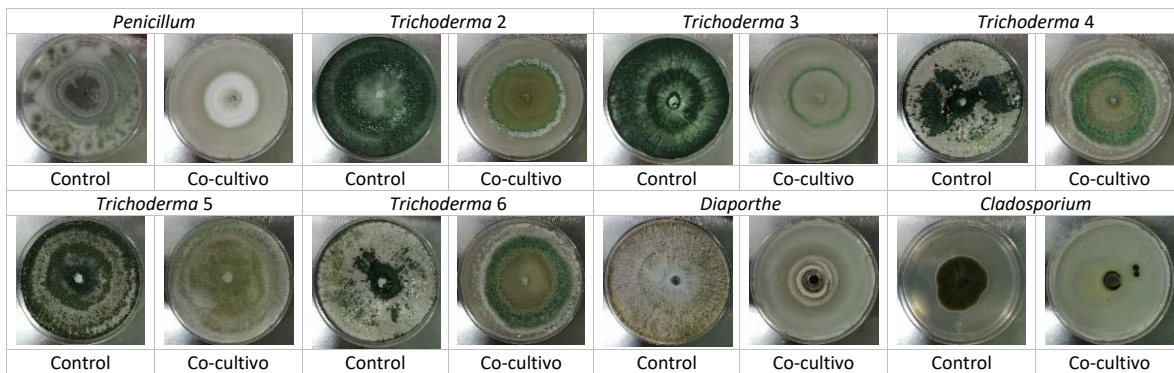
Gráfica 11. Antagonismo del crecimiento del MB1 sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por co-cultivo bacteriano mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

MB 2



Gráfica 12. Antagonismo del MB2 sobre hongos. Inhibición (ICR) ejercida por el conjunto bacteriano mediante crecimiento dual inverso sobre hongos.

MB2



MB1

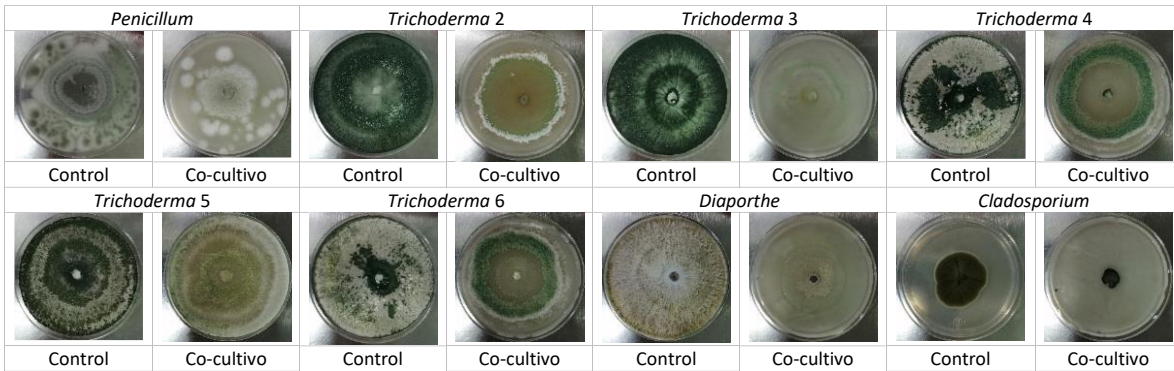
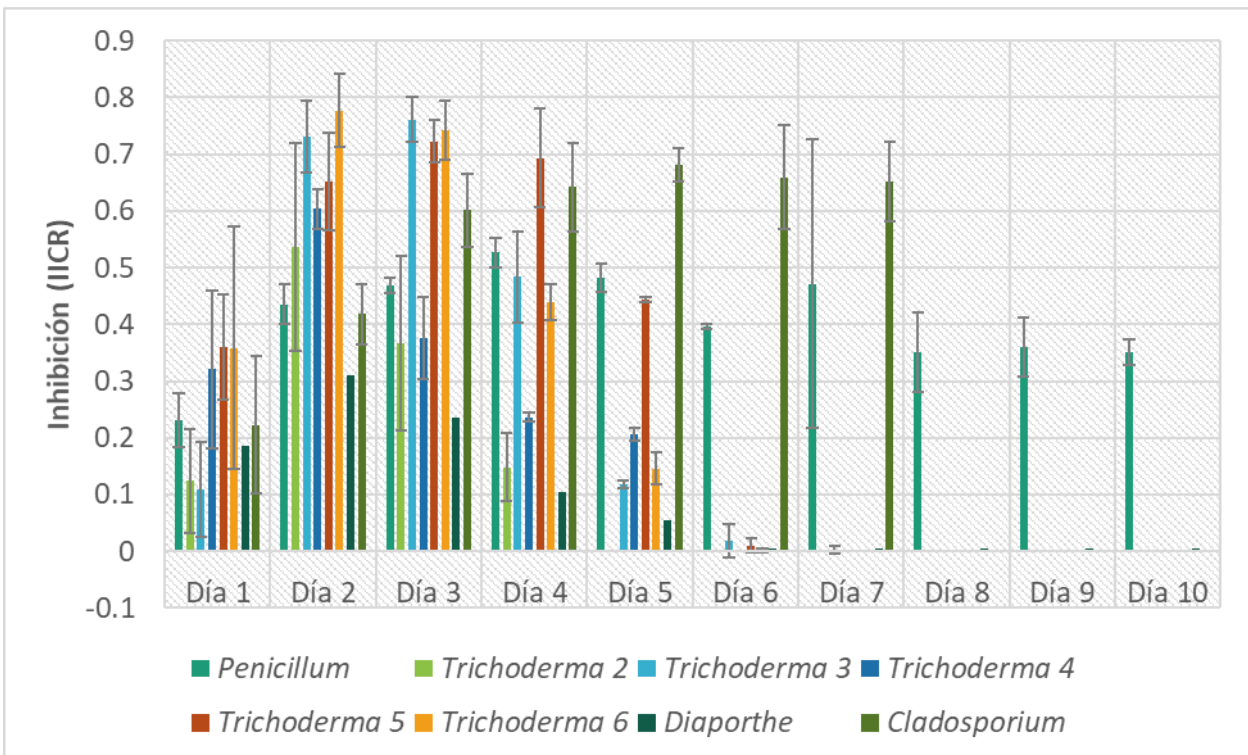


Fig. 13. Antagonismo dual inverso que del MB1 sobre cada uno de los hongos. en co-cultivo y juntando las bacterias. Observando el cambio morfológico y tamaños de la colonia.

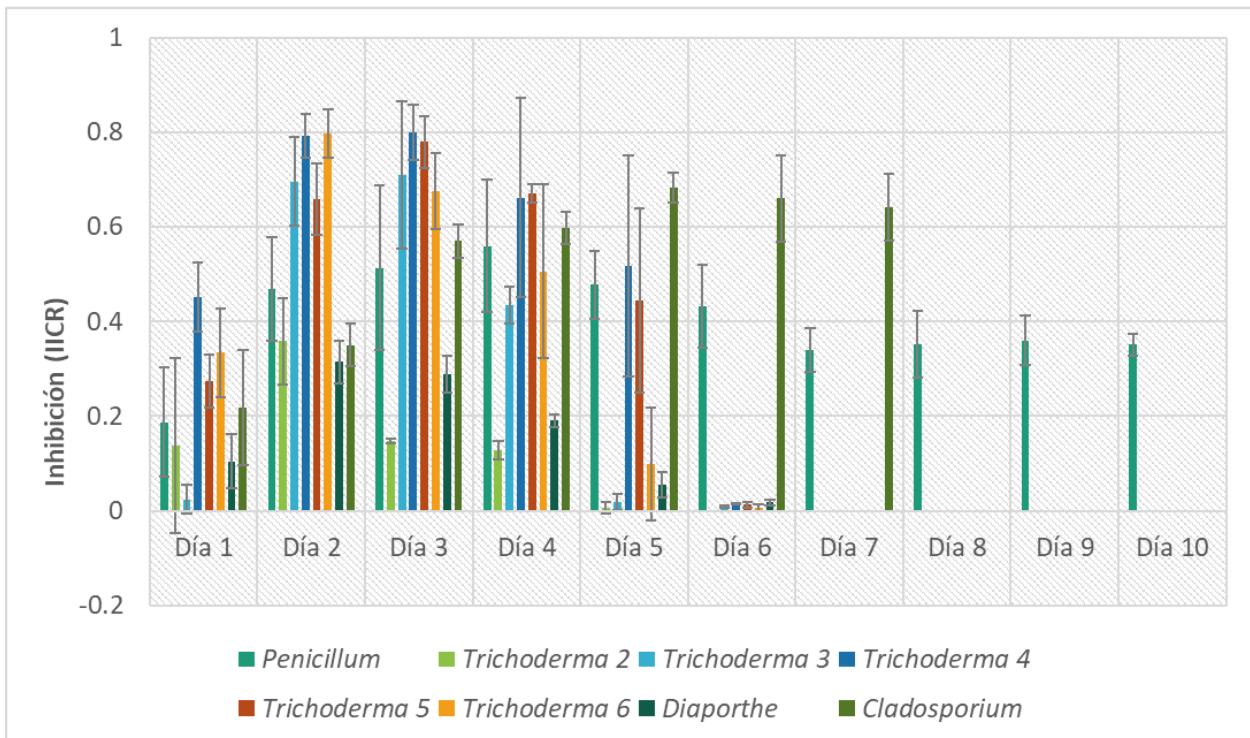
Como se sabe las bacterias producen compuestos volátiles, en la interacción de todas las bacterias (MB 1 y 2) se observa con las gráficas y las fotografías, que ejercen un biocontrol positivo sobre todos los hongos, principalmente sobre *Penicillium* y *Cladosporium* (Figura 14).

MB 1



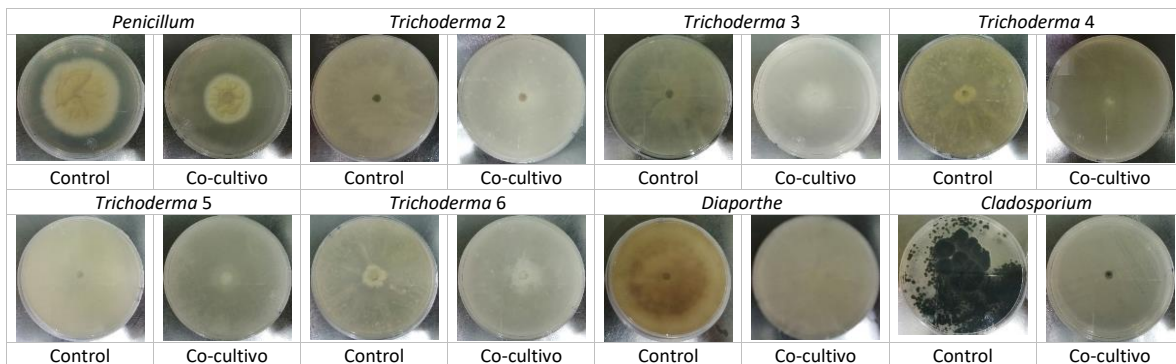
Gráfica 13. Antagonismo ejercido por los compuestos volátiles del MB1 sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por MB1 mediante compuestos volátiles sobre hongos.

MB 1



Gráfica 14. Antagonismo ejercido por los compuestos volátiles del MB2 sobre hongos. Inhibición (IICR) ejercida por MB2 mediante compuestos volátiles sobre hongos.

MB 2



MB 1

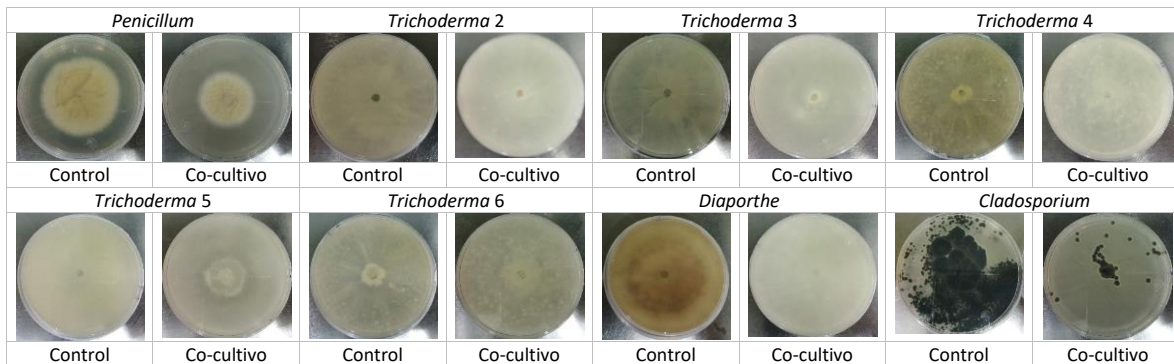


Figura 14. Antagonismo por compuestos volátiles que ejercen todas las bacterias sobre cada uno de los hongos. Fotografías de 10 días.

Como se pudo observar en la figura 14 y las gráficas 13 y 14, las inhibiciones de hongos por todas las bacterias tanto en co-cultivo como juntándolas antes de hacer el ensayo de antagonismo son similares, por ejemplo en el caso de Diaporthe que fue el hongo que presento mayor disminución en su crecimiento siendo de más del 50 % en co-cultivo y juntando las bacterias.

Se ha estudiado que la combinación de diferentes agentes de biocontrol aumenta la capacidad de contención de los patógenos más allá de la contribución de los aislados individuales, a menudo resultando en efectos sinérgicos sobre biocontrol y crecimiento de las plantas. El uso de diferentes especies de microbios en combinación puede proporcionar además la ventaja de mejorar la eficacia del biocontrol ya que diferentes microbios ocupan diferentes nichos en la rizosfera y, por lo tanto, restringen la competencia entre ellos. Además, la diversidad en los mecanismos de control biológico que muestra cada componente microbiano también puede aumentar y optimizar la supresión de enfermedades (Palmieri *et al.*, 2016).

Producción de lipopéptidos

(Medios para probables mecanismos de control biológico)

Los mecanismos de biocontrol pueden ser por competencia hacia nutrientes u ocupando el mismo sitios y desplazando físicamente a los microorganismos, o bien por antagonismo, mediante la secreción de sideróforos, síntesis de antibióticos, de bacteriocinas y una variedad de moléculas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, además de la posibilidad de producir una variedad de enzimas que inhiben el crecimiento e incluso indirectamente mediante la estimulación de la resistencia sistémica en las plantas (Reddy P.P. 2014).

Algunas especies del género *Bacillus* han sido bien conocido para la producción de lipopéptidos cíclicos (CLP) con amplio potencial antifúngico (Borriss 2011 ; Falardeau *et al.* 2013); los CLP controlan los fitopatógenos fúngicos, ya sea indirectamente induciendo resistencia en la planta huésped o directamente apuntando a las membranas fúngicas

(Jourdan *et al.* 2009 ; Patel *et al.* 2011). *Bacillus E* presentó β -hemólisis en agar sangre Figura 15 y en el medio LB con yema de huevo muestra un halo, por lo que se podría considerar como probable productor de lipopéptidos. Para asegurar que la bacteria ocupó estos dos sustratos, se sembró en medio mínimo sin fuente de carbono ni nitrógeno y solo se adicionó la sangre al 2.5% y 5 % o la yema de huevo al 5%, y dio positivo a crecimiento en ambos medios. Por lo que se considera a *Bacillus E*, es probable productora de lipopéptidos debido a que los tensioactivos son moléculas anfipáticas que reducen la tensión en la interfase (Tablas 11, 12 y Figs. 15, 16). Debido a esta propiedad, las moléculas de los tensioactivos se ubican en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Stoyanov *et al.*, 2003). La presencia de tensioactivos en un medio acuoso incrementa la solubilidad en agua y disponibilidad de compuestos orgánicos. Los biosurfactantes producidos por bacterias, hongos, y levaduras incluyen glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos. (Becerra, L., & Horna 2016). Las especies de *Bacillus* producen un amplio espectro de biosurfactantes lipopéptidos entre ellos, la surfactina, un lipopéptido producido por cepas de *Bacillus subtilis*, es uno de los biosurfactantes más efectivos conocidos hasta ahora (Gudiña *et al.*, 2015).

Tabla 12. Crecimiento de *Bacillus E* en dos diferentes medios y concentraciones sangre al 2.5% y 5%.

	24h		48h	
	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo
Agar sangre 2.5%	+	+	+	β -hemólisis
Agar sangre 5%	+	-	+	β -hemólisis
MMK* + Sangre 2.5%	+	-	+	-
MMK* + Sangre 5%	+	-	+	-
MMK*	-	-	-	-

MMK* = Sin fuente de carbono ni nitrógeno

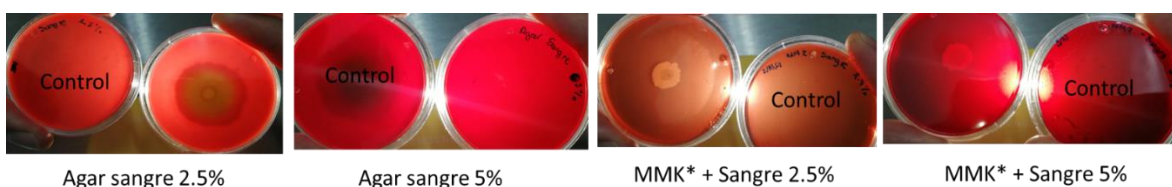


Fig. 15. Fotografías donde se muestra la β - hemólisis en el caso de agar sangre y el crecimiento bacteriano en el medio mínimo con sangre.

Tabla 13. Crecimiento de *Bacillus E* en dos diferentes medios y concentraciones de la yema de huevo al 2.5% y 5%.

	24h		48h	
	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo
LB + yema de huevo 2.5%	+	-	+	+

LB + yema de huevo 5%	+	-	+	+
MMK* + yema de huevo 5%	+	-	+	-
MMK*	-	-	-	-
MMK* = Sin fuente de carbono ni nitrógeno				



Fig. 16. Fotografías donde se muestra los halos formados en medio LB con yema de huevo y crecimiento en el medio mínimo con yema de huevo.

Sarwar *et al.*, (2018) al igual que otros autores como Mulligan *et al.* (1984), la selección de bacterias productoras de biosurfactantes mediante agar sangre es un método útil para la selección preliminar. Este método no es específico, ya que algunas enzimas líticas también pueden provocar halos de hidrolisis. Carrillo *et al.*, (1996) Observaron una relación directa entre la producción de biosurfactantes y la actividad hemolítica. Estudios previos han indicado la posibilidad de producción de biosurfactantes sin actividad hemolítica asociada. Sin embargo, la presencia o ausencia de actividad hemolítica puede deberse a productores de biosurfactantes fuertes o débiles. Es de destacar que no todos los biosurfactantes poseen actividad hemolítica, y algunos compuestos adicionales que no tienen actividad biosurfactante pueden causar hemólisis (Sarwar *et al.*, 2018). En nuestro estudio si se detectó la probable actividad biosurfactante de las cepas de *Bacillus E* ya que presentó resultados positivos del ensayo hemolítico, lo que se podría considerar que hay una probable producción de lipopéptidos producida por *Bacillus E*.

Producción de enzimas líticas.

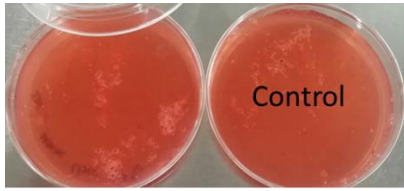
La producción de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más ampliamente reportados, en particular contra patógenos de origen fúngico (Villarreal *et al.*, 2018).

Para saber con qué tipo de enzimas líticas cuenta *Bacillus E*, se sembró en medio mínimo K (MMK) modificado sin fuente de carbono ni nitrógeno y se adicionó diferentes sustratos, en el caso de la yema de huevo y sangre, se puede deducir que posiblemente hay lipasas ya que se encuentran lípidos en estos dos sustratos que son degradados y producen los halos translucidos en el agar, señal que indica que posiblemente existan lipasas o enzimas líticas que degraden la pared celular (Tablas 11, 12 y Figs. 15, 16). Para el caso de la leche y la clara de huevo se puede decir que hay algunas proteasas, más compatibles con las proteínas que se encuentran con la leche que las que se encuentran en la clara de huevo, pues en el medio

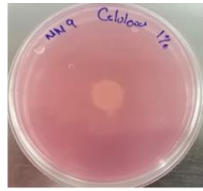
con este último sustrato no hubo crecimiento de la bacteria, para el caso de la carboximetilcelulosa, se encontraron celulasas, que se podría considerar como algo positivo para la planta, ya que esto puede inducir la respuesta sistémica, se ha comprobado que diferentes especies de *Bacillus* producen celulasas, como por ejemplo; *B. amyloliquefaciens*-ASK11 (Aslam *et al.*, 2017) o *Bacillus subtilis* (Sreena & Sebastian., 2018). En el caso de la gelatina se puede deducir que hay proteasas ya que pueden degradar la gelatina, por lo cual hay licuefacción, pero esto se observó solo cuando se tenía 2% de gelatina, a un porcentaje menor no se observaba el fenómeno de licuefacción, debido a que la gelatina a una temperatura de 25°C tenía una consistencia líquida, Entre las bacterias, *Bacillus* sp. son productores específicos de proteasas extracelulares (Chu, 2006), están involucradas en la degradación de sustratos polipeptídicos a moléculas más pequeñas (Ferrero, 1995) (Tabla 13 y Fig. 17).

Tabla 14. Crecimiento de *Bacillus* E en medio mínimo sin fuente de carbono y nitrógeno, con diferentes sustratos.

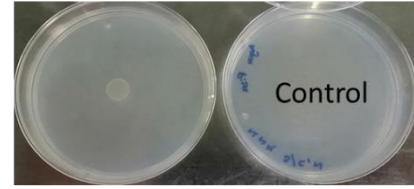
	24h		48h		72h	
	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo	Crecimiento	Halo
MMK* + clara de huevo 2.5%	-	-	-	-		
MMK* + clara de huevo 5%	-	-	-	-		
MMK* + Carboximetilcelulosa sódica 200 mM	+	-	+	-		
MMK+ leche semidescremada 0.25%	+	-	+	-		
MMK* + gelatina 1%					-	-
MMK* + gelatina 1.3%					-	-
MMK + gelatina 2%					+	licuefacción
MMK*	-	-	-	-	-	-
MMK* = Sin fuente de carbono ni nitrógeno						



MMK* + clara de huevo 5%



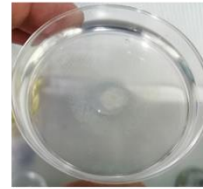
MK* + Carboximetilcelulosa
sódica 200 mM



Control MMK*



MMK+ leche semidescremada 0.25%



MMK + gelatina 2%

Fig. 17. Fotografías donde se muestra el crecimiento de *Bacillus E* en MMK modificado, con diferentes sustratos.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Bacillus A, B, C, D* y *E* presentan antagonismo hacia todos los hongos, principalmente sobre el género *Diaporthe* y *Cladosporium*
2. *Bacillus E* disminuye el crecimiento de todos los hongos de manera drástica, por lo que se puede considerar un buen biocontrolador.
3. *Paraburkholderia* estimula el crecimiento de *Penicillium* y *Cladosporium*
4. *Bacillus E* tiene como probables mecanismos de acción antagónica, compuestos volátiles, lipopéptidos, y algunas enzimas líticas como proteasas, lipasas, celulasas y glucanasas.
5. *Bacillus E* tiene un mayor biocontrol hacia los hongos cuando están en contacto directo.
6. Los Mix bacterianos 1 y 2 disminuyen el crecimiento de los hongos de manera similar entre ellos.
7. Los Mix bacterianos 1 y 2, son menos eficientes para inhibir el crecimiento del hongo que cuando *Bacillus E* se encuentra solo, pero son más eficientes que *Bacillus A, B, C, D* y *Paraburkholderia*.

BIBLIOGRAFÍA

Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., & Thonart, P. (2001). Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93(1-9), 551-562. <https://doi.org/10.1385/abab:91-93:1-9:551>

Alfaro Reyna, T., Martínez-Vilalta, J., & Retana, J. (2019). Regeneration patterns in Mexican pine-oak forests. *Forest Ecosystems*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40663-019-0209-8>

Aslam, S., Hussain, A., & Qazi, J. I. (2017). Production of Cellulase by *Bacillus amyloliquefaciens*-ASK11 Under High Chromium Stress. *Waste and Biomass Valorization*, 10(1), 53-61. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0046-3>

Becerra, L., & Horna, M. (2016). Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia agropecuaria*, 7(1), 23-31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>

Botella, L., and Diez, J. J. 2011. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers.* 47:9-18. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0061-1>

Brecka, A. F. J., Shahi, C., & Chen, H. Y. H. (2018). Climate change impacts on boreal forest timber supply. *Forest Policy and Economics*, 92, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2018.03.010>

Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00029-4)

Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 82-84. <https://doi.org/10.1007/bf00327807>

Chaudhary, S., Shankar, A., Singh, A., & Prasad, V. (2018). Usefulness of *Penicillium* in Enhancing Plants Resistance to Abiotic Stresses. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 277-284. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63501-3.00017-x>

Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J., van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 159-166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x>

Chu, W.-H. (2006). Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(3), 241-245. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0192-2>

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

Compounds From *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol Effects on Fruit Fungal Pathogens and Dynamic Changes During Fermentation. *Frontiers in microbiology*, 9, 456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>

CONAFOR. (s. f.). *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen. conafor.gob.mx. Recuperado 3 de noviembre de 2020, <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/956Pinus%20chiapensis.pdf>

Daza, A., & Gutiérrez Mañero, F. J. (2008). Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of applied microbiology*, 105(5), 1298–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03862.x>

Dejera-Hernández, Berto, & Rojas-Badía, Marcia M., & Heydrich-Pérez, Mayra (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3),131-138. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181222321004>

Del Castillo, R. F., Argueta, S. T., & Sáenz-Romero, C. (2009). *Pinus chiapensis*, a keystone species: Genetics, ecology, and conservation. *Forest Ecology and Management*, 257(11), 2201-2208. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.03.004>

Del Castillo, R. F., Argueta, S. T., & Sáenz-Romero, C. (2009). *Pinus chiapensis*, a keystone species: Genetics, ecology, and conservation. *Forest Ecology and Management*, 257(11), 2201-2208. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.03.004>

Dezest, M., Le Behec, M., Chavatte, L., Desauziers, V., Chaput, B., Grolleau, J. L., Descargues, P., Nizard, C., Schnebert, S., Lacombe, S., & Bulteau, A. L. (2017). Oxidative damage and impairment of protein quality control systems in keratinocytes exposed to a volatile organic compounds cocktail. *Scientific reports*, 7(1), 10707. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11088-1>

Domínguez C., Alatorre J. M., Castañeda D., Munive J. A., Guo X., López J. F., Fuentes L. E., Carreño R. (Accepted: 16 June 2020) Potential seed germination-enhancing plant growth-

promoting rhizobacteria for restoration of the *Pinus chiapensis* ecosystems. Journal of Forestry Research. Forestry Research. [doi 10.1007/s11676-020-01250-3](https://doi.org/10.1007/s11676-020-01250-3)

Domínguez Castillo (2020) Potential seed germination-enhancing plant growth-promoting rhizobacteria for restoration of the *Pinus chiapensis* ecosystems. Tesis Doctoral. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Durán, A., Gryzenhout, M., Drenth, A., Slippers, B., Ahumada, R., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2010). AFLP analysis reveals a clonal population of *Phytophthora pinifolia* in Chile. *Fungal Biology*, 114(9), 746-752. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.06.008>

Dvorak, WS, Donahue, JK, Vasquez, JA (1996). Provenance and progeny results for the tropical white pine, *Pinus chiapensis*, at five and eight years of age. *New For*, 12: 125–140.

Farjon, A. 2005. *Pines: drawings and descriptions of the genus Pinus*. 2nd. ed. Brill NV. Leiden, The Netherlands. 235 pp.

Farjon, A. y T. B. Styles. 1997. *Pinus* (pinaceae). Flora Neotropica, Monograph 75. Organization for Flora Neotropica. The New York Botanical Garden, New York, USA. 291 p.

Fernández-Gómez, M. J., Nogales, R., Insam, H., Romero, E., & Goberna, M. (2011). Role of vermicompost chemical composition, microbial functional diversity, and fungal community structure in their microbial respiratory response to three pesticides. *Bioresource Technology*, 102(20), 9638-9645. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.113>

Ferrero, M., 1995. *Estudio De Producción De Proteasas En Especies Del Género Bacillus*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.

García, S. S., Bernabeu, P. R., Vio, S. A., Cattelan, N., García, J. E., Puente, M. L., Galar, M. L., Prieto, C. I., & Luna, M. F. (2019). *Paraburkholderia tropica* as a plant-growth-promoting bacterium in barley: characterization of tissues colonization by culture-dependent and -independent techniques for use as an agronomic bioinput. *Plant and Soil*, 451(1-2), 89-106. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04174-y>

Gernandt, D., López, G.G., García, S., & Liston, A. (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54, 29-42.

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 1–41. <https://doi.org/10.3767/003158513X666844>

Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., Zhang, J. B., & Liao, Y. C. (2015). Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS one*, *10*(2), e0116871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871>

Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(3), 395–412. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>

Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA and Rodrigues LR (2015) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.* **6**:59. doi: [10.3389/fmicb.2015.00059](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059)

Haddad, N. I., Wang, J., & Mu, B. (2008). Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *35*(12), 1597–1604. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0403-0>

Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., Zhang, M., Jia, D., Zhao, X., Liang, J., Majid, T., Yan, J., Farzand, A., Wu, H., Gu, Q., & Gao, X. (2019). Fengycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Inhibits *Fusarium graminearum* Growth and Mycotoxins Biosynthesis. *Toxins*, *11*(5), 295. <https://doi.org/10.3390/toxins11050295>

Harwood, C. R., Mouillon, J.-M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(6), 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>

Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., & Fujii, Y. (2002). Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, *61*(6), 693–698. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00365-5)

Hu, L. B., Shi, Z. Q., Zhang, T., & Yang, Z. M. (2007). Fengycin antibiotics isolated from B-Huszcza, E., & Burczyk, B. (2006). Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, *61*(9–10), 727–733. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1020>

Kakinuma, A., Ouchida, A., Shima, T., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G., & Arima, K. (1969). Confirmation of the Structure of Surfactin by Mass Spectrometry. *Agricultural and Biological Chemistry*, *33*(11), 1669–1671. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859524>

Kalinovskaya, N. I., Kuznetsova, T. A., Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Voinov, V. G., Huth, F., & Laatsch, H. (2002). Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, *4*(2), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0084-4>

Kiesewalter, H. T., Lozano-Andrade, C. N., Wibowo, M., Strube, M. L., Maróti, G., Snyder, D., Jørgensen, T. S., Larsen, T. O., Cooper, V. S., Weber, T., & Kovács, Á. T. (2020). Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi. (unpublished) <https://doi.org/10.1101/2020.08.05.238063>

Kim, K. M., Lee, J. Y., Kim, C. K., & Kang, J. S. (2009). Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of pharmacal research*, 32(5), 711–715. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1509-2>

Kim, P. I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., & Chi, Y. T. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 942–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x>

Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y.-T. (2010). Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 138-145. <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>

Kloepper, Joseph & Schroth, M.N.. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria. France. 2. 879-882.

Kwon, S.-I., Dohlen, C. D., & Anderson, A. J. (2001). Gene sequence analysis of an opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum*. *Canadian Journal of Botany*, 79(9), 1115-1121. <https://doi.org/10.1139/b01-084>

Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales Ramírez MSC, L. C., & Sánchez Leal MSC, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>

Lebreton, L., Guillerme-Erckelboudt, A.-Y., Gazengel, K., Linglin, J., Ourry, M., Glory, P., Sarniguet, A., Daval, S., Manzaneres-Dauleux, M. J., & Mougél, C. (2019). Temporal dynamics of bacterial and fungal communities during the infection of *Brassica rapa* roots by the protist *Plasmodiophora brassicae*. *PLOS ONE*, 14(2), e0204195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204195>

Ledig, FT (1998). Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press: Cambridge. pp 251–280.

Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>

Li, Y.-M., Haddad, N. I. A., Yang, S.-Z., & Mu, B.-Z. (2008). Variants of Lipopeptides Produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in Different Medium Components Evaluated by a Rapid Method ESI-MS. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14(3), 229-235. <https://doi.org/10.1007/s10989-008-9137-0>

Mejía-Bautista, Miguel A., Cristóbal-Alejo, Jairo, Tun-Suárez, José M., & Reyes-Ramírez, Arturo. (2016). Actividad in vitro de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* Y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*, 50(8), 1123-1135. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801123&lng=es&tlng=es.

Mota, M. S., Gomes, C. B., Souza Júnior, I. T., & Moura, A. B. (2017). Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48(1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>

Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 622–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>

Mulligan, C.; Cooper, D.; Neufeld, R. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Fermentation Technol* 62(4): 311–314.

Muñoz, M. M (2017) Identificación de hongos y bacterias endófitos cultivables de la semilla de *Pinus chiapensis*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Murali, T. S., Suryanarayanan, T. S., and Geeta, R. 2006. Endophytic *Phomopsis* species: Host range and implications for diversity estimates. *Can. J. Microbiol.* 52:673-680. <https://doi.org/10.1139/w06-020>

Nazir, R., Zhang, M., de Boer, W., & van Elsas, J. D. (2012). The capacity to comigrate with *Lyophyllum* sp. strain Karsten through different soils is spread among several phylogenetic groups within the genus *Burkholderia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 50, 221-233. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.015>

Newton, A. C., Allnutt, T. R., Dvorak, W. S., Del Castillo, R. F., & Ennos, R. A. (2002). Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity*, 89(3), 191-198. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800113>

Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F., & Lima, G. (2016). A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. *Plant and Soil*, 412(1-2), 425-439. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3080-1>

Pathak, K. V., & Keharia, H. (2014). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 4(3), 283–295. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0151-3>

Paul, N. C., & Yu, S. H. (2008). Two species of endophytic cladosporium in pine trees in Korea. *Mycobiology*, 36(4), 211–216. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.4.211>

Pedraza-Herrera, L. A., Lopez- Carrascal, C. E., & Uribe Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

Perry, J. P., Perry, J. P., & Duffield, J. W. (1991). *The Pines of Mexico and Central America*. Amsterdam University Press.

Perry, JP, Graham, A, Richardson, DM (1998). The history of pines in Mexico and Central America. In: Richardson DM (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press: Cambridge pp 137–149.

Pineda Posadas, J. A. (2018). Distribución y caracterización ecológica de *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen en el estado de Veracruz. (Tesis de Maestría). Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Forestales.

Poveda, J., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2019). *Trichoderma harzianum* favours the access of arbuscular mycorrhizal fungi to non-host *Brassicaceae* roots and increases plant productivity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48269-z>

Pratama, A. A., Haq, I. U., Nazir, R., Chaib De Mares, M., & van Elsas, J. D. (2017). Draft genome sequences of three fungal-interactive *Paraburkholderia terrae* strains, BS007, BS110 and BS437. *Standards in genomic sciences*, 12, 81. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0293-8>

Pratama, A. A., Jiménez, D. J., Chen, Q., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., & van Elsas, J. D. (2020). Delineation of a Subgroup of the Genus *Paraburkholderia*, Including *P. terrae* DSM 17804T, *P. hospita* DSM 17164T, and Four Soil-Isolated Fungiphiles, Reveals Remarkable Genomic and Ecological Features—Proposal for the Definition of a *P. hospita* Species Cluster. *Genome Biology and Evolution*, 12(4), 325-344. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa031>

Prävälje, R. (2018). Major perturbations in the Earth's forest ecosystems. Possible implications for global warming. *Earth-Science Reviews*, 185, 544-571. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.06.010>

Pueyo, M. T., Bloch, C., Jr, Carmona-Ribeiro, A. M., & di Mascio, P. (2009). Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial ecology*, 57(2), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9464-x>

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>

Rahman, M., Sabir, A. A., Mukta, J. A., Khan, M. M. A., Mohi-Ud-Din, M., Miah, M. G., Rahman, M., & Islam, M. T. (2018). Plant probiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. *Scientific Reports*.

Reddy P.P. (2014) Mechanisms of Biocontrol. In: Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1973-6_4

Richardson, DM, Rundel, PW (1998). Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: Richardson DM (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press: Cambridge pp 3–46.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>

Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523-1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>

Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLOS ONE*, 13(6), e0198107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>

Sawana, A., Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in genetics*, 5, 429. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>

SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010

Sinclair, WT, Morman, JD, Ennos, RA (1998). Multiple origins for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland: evidence from mitochondrial DNA variation. *Heredity*, 80: 233–240.

Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9680-z>

Snook, M. E., Mitchell, T., Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (2009). Isolation and characterization of leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4287–4292. <https://doi.org/10.1021/jf900164h>

Sreena, C. P., & Sebastian, D. (2018a). Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.005>

Stoyanov, S. D., Rehage, H., & Paunov, V. N. (2003). Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Physical review letters*, 91(8), 086102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.91.086102>

Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., & Yang, S. (2006). Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1259-1266. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9170-0>

Tejera-Hernández, Berto, & Rojas-Badía, Marcia M., & Heydrich-Pérez, Mayra (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3),131-138. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181222321004>

Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., & Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2331-2339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x>

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis*

cinerea on apple. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>

Vianey Olmedo Monfil, Sergio CasasFlores. (2014). Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (429-453). Elsevier: ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1>

Villarreal-Delgado, María Fernanda, Villa-Rodríguez, Eber Daniel, Cira-Chávez, Luis Alberto, Estrada-Alvarado, María Isabel, Parra-Cota, Fannie Isela, & Santos-Villalobos, Sergio de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Wang, J., Liu, J., Chen, H., & Yao, J. (2007). Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(4), 889–894. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1054-1>

Warmink, J. A., Nazir, R., Corten, B., & van Elsas, J. D. (2011). Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(4), 760-765. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.009>

Wilhelm, R. C., Cyle, K. T., Martinez, C. E., Karasz, D. C., Newman, J. D., & Buckley, D. H. (2020). *Paraburkholderia solitsugae* sp. nov. and *Paraburkholderia elongata* sp. nov., phenolic acid-degrading bacteria isolated from forest soil and emended description of *Paraburkholderia madseniana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(9), 5093-5105. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004387>

YE, Y.-, LI, Q.-, FU, G., YUAN, G.-, MIAO, J.-, & LIN, W. (2012). Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and Its Effect on Southern Corn Leaf Blight. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1), 90-99. [https://doi.org/10.1016/s1671-2927\(12\)60786-x](https://doi.org/10.1016/s1671-2927(12)60786-x)

Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5)

Zawadzka, A. M., Abergel, R. J., Nichiporuk, R., Andersen, U. N., & Raymond, K. N. (2009). Siderophore-Mediated Iron Acquisition Systems in *Bacillus cereus*: Identification of Receptors for Anthrax Virulence-Associated Petrobactin^{†,‡}. *Biochemistry*, 48(16), 3645-3657. <https://doi.org/10.1021/bi8018674>

Anexos

Medios

-Medio Luria-Bertani (LB)

Por litro

- 10 g Peptona de caseína
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de cloruro de sodio
- 13 g de agar- agar
- yema de huevo al 5% y 2.5% (solo en caso de ser requerido)

-Agar sangre

Por litro

- 20 g Sustrato nutritivo (Extracto de corazón y peptonas)
- 5 g cloruro sódico
- 15 g Agar-agar
- Sangre al 5% y 2.5%

-Medio Papa dextrosa

Por litro

- 200 g Infusión de papa
- 20 g dextrosa
- 15 g agar-agar

-MMK modificado sin fuente de carbono ni nitrógeno

Por litro

- 1.67 g K_2HPO_4
- 0.87 g KH_2PO_4
- 0.29 g $MgSO_4 \cdot H_2O$
- 0.48 g NaCl
- 7% CaCl
- 1% $FeCl_3$
- 0.5% $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$
- 1 X Oligoelementos
- 13 g Agar
- Sustratos, como sangre al 5% y 2.5%, yema de huevo al 5%, 200 mM de Carboximetilcelulosa sódica por cada 100 mL, clara de huevo al 2.5% y 5%, leche semidescremada al 0.25% y gelatina al 1%, 1.5% y 2%.



EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA DEL IPN Y LA DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE CONOCIMIENTO DE LA BUAP

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

POR SU PRESENTACIÓN DE PÓSTER EN EL IER CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, EN LÍNEA.

AUTORES:

MUÑOZ FLORES MONICA, FUENTES RAMÍREZ LUIS ERNESTO, MARÍN CEVADA VIANEY, GARCÍA GARCÍA SILVIA MARÍA DEL CARMEN, CARREÑO LÓPEZ RICARDO

CON EL TRABAJO DENOMINADO:

"BIOCONTROL DE HONGOS POR BACTERIAS ENDÓFITAS DE LA SEMILLA DE *Pinus chiapensis*"


Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa
Directora CIBA IPN




M. en C. Minerva Rosas Morales
Coordinadora CIBA IPN


Dr. David Esteban Pinto Avedaño
Director DITCo BUAP


M. en C. Carla de la Cerna Hernández
Coordinadora DITCo BUAP

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Tlaxcala
CIBAXTLA

28 AL 30 DE OCTUBRE 2020, TEPETITLA DE LARDIZÁBAL TLAXCALA

Registro: CGFIE/20/EI/006EA/4/Cg&/L/88/281020-301020