



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

**Detección de metabolitos bacterianos de tipo
auxínico y con actividad antifúngica**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIÓLOGIA

Presenta:

Leticia Gómez Velázquez

Directora de Tesis
Dra. Lucía López Reyes

Asesor
M.C. Moisés Carcaño Montiel

Marzo, 2016



AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme sus puertas y permitirme aprender en aulas de la Escuela de Biología, a todos mis profesores por enseñarme a amar esta carrera, compartiéndome sus conocimientos. Al Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, por permitirme realizar este proyecto de tesis.

Agradezco al Programa de Innovación Tecnológica del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT), por el financiamiento otorgado para la realización del este proyecto.

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi directora de tesis Dra. Lucia López Reyes y Asesor M.C. Moisés Carcaño Montiel, por toda la orientación y apoyo otorgado para la realización de esta tesis. A la Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez y el Q.F. Guillermo Rueda Luna, por ser mis revisores.

A mis amigos de carrera Elena, Gaby, Karina Ramírez, Roció, Karina Hernández, Ricardo, Julio, Getulio, Fernando y Erick, por todos los momentos juntos.

A mis amigos de laboratorio Lupita, Elizabeth, Liliana, Gaby, Oscar, Guillermo y Manuel, que compartieron sus conocimientos conmigo y me brindaron su ayuda.

Pero sobre todo agradezco a mi familia por su amor, comprensión y apoyo.

A mi madre Alberta por su ejemplo y amor.

A mis hermanos: Alejandro, Juan Alberto, Andrés y Leonardo; a mis cuñadas: Yazmín y Janeth por alentarme y apoyarme en todo.

El presente trabajo ha sido soportado por:

El proyecto de investigación **“Biopreparado bacteriano de uso agrícola con actividad antifúngica”** con financiamiento dentro del programa de Innovación Tecnológica del Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología (CUVyTT) con número de registro (DITCo2014-10) y dentro del programa de mejoramiento al profesorado para el fortalecimiento del **Cuerpo Académico de Microbiología de Suelos BUAP-CA-99 (SEP-PROMEP)** además por el proyecto Institucional de desarrollo de biofertilizantes **BIOfosfoBUAP**

Comité Revisor

Dra. Lucia López Reyes

Microbiología de suelos. CICM-ICUAP
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez

Microbiología de suelos. CICM-ICUAP
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Q.F.B. Guillermo Rueda Luna

Escuela de Biología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Contenido

ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES O REVISION DE LITERATURA	12
2.1 Importancia de los cultivos en México y sus enfermedades	12
2.2 Efecto de los microorganismos del suelo sobre los cultivos	14
2.2.1 Interacciones neutras	15
2.2.2 Microorganismos fitopatógenos	15
2.2.2.1 Los hongos como agentes fitopatógenos	16
2.2.3 Microorganismos benéficos	18
1.2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	19
2.3.1 La biofertilización como acción de las PGPR	20
2.3.2 Reguladores del crecimiento vegetal	21
2.3.2.1 Auxinas	22
2.3.2.2 Giberelinas	24
2.3.2.3 Citoquininas	25
2.3.2.4 Ácido abscísico	25
2.3.2.5 Etileno	26

2.4	Rizobacterias como control biológico	27
2.4.1	El ácido fenilacético como control biológico	30
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4	JUSTIFICACIÓN	33
5	OBJETIVOS	35
5.1	Objetivo general	35
5.2	Objetivos específicos	35
6	HIPÓTESIS	36
7	MATERIALES Y METODOS	37
7.1	Selección de cepas	37
7.2	Producción y extracción de índoles	37
7.2.1	Espectrofotometría	38
7.3	Cromatografía en capa fina	40
7.4	Prueba de sanidad de semillas en papel secante	40
7.4.1	Aislamiento e identificación de hongos	41
7.5	Caracterización bacteriana	42
7.5.1	Extracción de DNA	42
7.5.2	PCR	43
7.5.3	Enzimas de restricción	44
7.6	Análisis estadístico	44
8	RESULTADOS Y DISCUSION	45

9	CONCLUSIONES	62
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Cepas bacterianas seleccionadas por su efecto inhibidor sobre 2 hongos <i>Fusarium</i> sp., todas aisladas de rizósfera de maíz y su variedad..	45
Cuadro 2	Producción de índoles totales de bacterias aisladas de maíz.	48
Cuadro 3	Producción de ácido fenilacético por las cepas bacterianas que tuvieron efecto antagónico contra <i>Fusarium</i> spp.	50
Cuadro 4	Concentración de índoles totales y desviación estándar sintetizado por bacterias antagonicas de maíz reproducidas en caldo de soya y tripticaseina (CST) y Jean Patriquin (JP).	52
Cuadro 5	Numero de semillas que presentan síntomas de infección por hongos, tratadas con metabolitos de cuatro cepas bacterianas <i>B. gladioli</i> (AM6), <i>B. cepacia</i> (CN49), <i>B. gladioli</i> (AM51), <i>P. fluorescens</i> (P6) y sus combinaciones.	57
Cuadro 6	Fragmentos (bp) obtenidos para los productos de PCR del gen 16S rDNA con la enzima Msp1.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Producción y consumo de maíz en México, desde el año 2000 hasta el pronóstico del año 2015	13
Figura 2	Estructura de algunas auxinas naturales (AIA, AIB, CI-IAA) y sintéticas (NAA, dicamba, 2,4-D y 2,4,5-T).	23
Figura 3	Citoquininas naturales y sintéticas.	26
Figura 4	Mecanismos de control biológico de enfermedades en plantas por bacterias.	30
Figura 5	Medios caldo de soya y tripticaseina (CST), inoculados con cepas bacterianas antagónicas contra el hongo <i>Fusarium</i> sp.	38
Figura 6	Cambios de coloración por la oxidación de los compuestos indólicos.	39
Figura 7	Curva de calibración de ácido indol-3-acético (AIA), obtenida por método colorimétrico con el reactivo de Salkowsky.	39
Figura 8	Distribución de muestras en placa de sílica, para la cromatografía en capa fina.	40
Figura 9	Producción de índoles totales por cepas bacterianas, inoculadas en caldo de soya y tripticaseina (CST).	47
Figura 10	Comparación de la síntesis de índoles totales de cepas bacterianas propagadas en medio Jean Patriquin (JP) y caldo de soya y tripticaseina (CST).	51
Figura 11	Placa de sílica con las muestras crecidas en CDT: 1) Acido fenilacético, 2) AM51, 3) CN49, 4) P14, 5) CR4, 6) AM6, 7) P6, 8) CR44, 9) Cd. Y en Jean Patrick 10) AM51, 11) CN49, 12) P14, 13) AM6 , 14) P6, 15)CR44, 16) CR56, 17) Cd y 18) TRZ2B1.	53
Figura 12	Síntoma 1 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Fusarium</i> sp.	54
Figura 13	Síntoma 2 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Acremoniella</i> spp.	54
Figura 14	Síntoma 3 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Penicillium</i> spp.	54
Figura 15	Síntoma 4 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Acremonium</i> spp.	55

Figura 16	Síntoma 5 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: No identificado.	55
Figura 17	Síntoma 6 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Monila sp.</i>	55
Figura 18	Síntoma 7 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: <i>Fusarium moniliforme</i> .	56
Figura 19	Gel de agarosa. Presencia de ADN de las bacterias: 1) Cd, 2) AM51, 3) CN49, 4) P14, 5) CR4, 6) CR56, 7) TRZ1-AZ, 8)CA39, 9) AM1, 10) TRZ2B1, 11) AM6, 12) P6, 13) CR44, 14) AM33.	59
Figura 20	Amplificación del DNAr 16S de las siguientes cepas: 1) Marcador de peso molecular, 2) Cd, 3) AM51, 4) CN49, 5) P14, 6) CR56, 7) AM6, 8) P6, 9) CR44 y 10) CR4.	59
Figura 21	Electroforesis en gel de agarosa al 3%, digestión con la enzima Msp1. 1) Marcador de peso molecular, 2) Cd, 3) AM51, 4) CN49, 5) P14, 6) AM6, 7) P6, 8) CR44, 9) CR4, 10) CR56, 11) Marcador de peso molecular.	60

RESUMEN

Los cultivos se encuentran amenazados por diversos patógenos entre ellos se encuentran los hongos. Para el control de enfermedades fúngicas se han empleado productos químicos de alto costo económico y ambiental. Como alternativa al uso de agroquímicos, es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y efectivas en el control biológico de fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue usar BPCV asociadas a la rizósfera de maíz que poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos patógenos como *Fusarium* sp. en condiciones de laboratorio. Los ensayos de antagonismo *in vitro* ayudaron a seleccionar a las mejores bacterias con actividad antifúngica. Las bacterias más destacadas fueron caracterizadas con base a los metabolitos sintetizados en medios de cultivo y la síntesis de ácido fenilacético (AFA). Se evaluó mediante la prueba de sanidad de semillas el efecto inhibitorio de los extractos bacterianos contra hongos de semillas de maíz. Se concluyó que el desarrollo del hongo *Fusarium* sp. se inhibió con éxito por el uso de metabolitos bacterianos de *Burkholderia cepacia* y *Burkholderia gladioli*, estas bacterias además son productoras tanto de AIA como de AFA en dos diferentes medios de cultivo, otras especies como *Pseudomonas fluorescens* disminuyen el número de semillas de maíz infectadas por hongos. La caracterización bacteriana a través de PCR para la amplificación del gen 16S rDNA y la digestión con enzimas de restricción ayudaron a describir a dichas bacterias. Los resultados sugieren que estas bacterias pueden ser utilizadas en la agricultura en beneficio de los cultivos de maíz.

Palabras clave: Auxinas, control biológico, hongos fitopatógenos, semillas

4. INTRODUCCIÓN

Cada año se pierde gran cantidad de cultivos a nivel mundial debido al daño causado por bacterias y hongos fitopatógenos presentes en el suelo. El combate contra los patógenos de plantas incrementa el empleo de agroquímicos, que provocan daños a la salud humana, y por el uso indiscriminado han generado serios problemas de contaminación ambiental (Trujillo *et al.*, 2007; Guigón *et al.*, 2010). La gestión del uso de plaguicidas en México está regulada por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), junto con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), además de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), entre otras (Bravo y Guigón, 2014). El control biológico o manejo de patógenos es una alternativa para el combate de enfermedades de plantas, por medio de las relaciones simbióticas entre los microorganismos presentes en el suelo, además de que también dotan de una mejor nutrición a las plantas y les permiten soportar condiciones de estrés (Villarreal, 2012).

Entre los hongos del suelo que causan daño a los cultivos se encuentran: *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotium* spp., como los principales agentes. Las bacterias que han sido usadas como agentes de control biológico son especies del género *Bacillus*, seguida por *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Serratia* entre otras (Bravo y Guigón, 2014). Bacterias como *Azospirillum* se postulan como alternativa adicional en el control de hongos patógenos, junto a los beneficios que concede por su cualidad de fijar nitrógeno (N₂) y producir sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitohormonas (Carcaño *et al.*, 2006)

Las fitohormonas son compuestos que provocan en las plantas resistencia contra patógenos a través de diversos mecanismos como: la competencia por nicho, alimento o elementos como el hierro; a través de la síntesis de antibióticos como cepacina, pirrolnitrina, altericidina, entre otros (Compant *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2009), ya que previenen o evitan efectos perjudiciales, además intervienen en la captura de nutrientes para las plantas por la actividad hormonal (Manero y Agustín,

2000). Dichas ventajas conferidas a las plantas son una opción para el tratamiento de enfermedades, para aumentar el crecimiento, vigor y resistencia de cultivos de importancia alimenticia y económica. Los reguladores de crecimiento vegetal como las auxinas, giberelinas, citoquininas, brasinoesteroides, ácido abcísico, etileno y ácido jasmónico actúan en el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas, entre otras funciones (Celis y Gallardo, 2008; Camelo *et al.*, 2011).

Las bacterias con efecto promotor del crecimiento vegetal han sido muy estudiadas en su producción de fitohormonas del tipo de las auxinas, principalmente del ácido indol-3-acético, sus acciones se ven relacionadas con la elongación celular, tropismos, división celular y enraizamiento entre otras (Celis y Gallardo, 2008; Sauer *et al.*, 2013). El ácido fenilacético también es un metabolito secundario del tipo de las auxinas que se ha encontrado en bacterias de especies como *Enterobacter cloacae* y *Streptomyces humidus*, sintetizan la sustancia que tiene efectos antagónicos sobre *Gibberella pulicaris*, hongo patógeno de cultivos de papas y *Phytophthora capsici* que infecta a plantas de pimiento (Slininger *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2001). Se han encontrado efectos positivos en la inhibición del crecimiento de bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora* cuando *Azospirillum brasilense* es capaz de sintetizar el ácido fenilacético, además de ser una especie reconocida por su eficiencia como bacteria promotora del crecimiento vegetal (Somers *et al.*, 2005).

El empleo de metabolitos secundarios del tipo de las auxinas sintetizadas por rizobacterias como potentes antagónicos de patógenos en diferentes cultivos, amplía la posibilidad de su uso en plantas de maíz. Este trabajo tiene como objetivo determinar la producción de metabolitos secundarios de una colección bacteriana con actividad antifúngica y procedente de maíz del Laboratorio de Microbiología de Suelos “Jesús Caballero Mellado” del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, haciendo énfasis en la caracterización del ácido fenilacético e identificar su efecto en hongos de semillas de maíz.

4. ANTECEDENTES O REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de los cultivos en México

La evolución de las plantas y la domesticación de varias especies vegetales en México se ha visto influenciada por la variedad de climas, producto de la posición geográfica que ocupa el país; además de la presencia de varias especies endémicas del mismo, sin embargo la influencia del ser humano ha sido necesaria para generar la biodiversidad agrícola (Molina, 2006). La agricultura se postula como un sector de importancia a nivel internacional debido a que su práctica es esencial para el desarrollo socioeconómico de las comunidades sobre todo para países en desarrollo (Ordaz, 2014).

En México se cultivan 229 especies vegetales de las cuales 50 son cultivos autóctonos, 24 de estos son cultivos anuales, dentro de este grupo los más importantes tanto económica como socialmente son el maíz y frijol, los 26 restantes son perennes; mientras que 179 especies cultivadas han sido introducidas (Molina, 2006).

El Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP) señala que la agricultura tuvo un valor de producción anual de 410 160 254,31 pesos, los cultivos más importantes para el país en cuanto a superficie sembrada siguen siendo el maíz, el sorgo y el frijol; sin embargo los que generan mayores beneficios económicos según su orden de importancia son el maíz, la caña de azúcar, el sorgo, alfalfa verde y frijol (SAGARPA y SIAP, 2014).

Actualmente el maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del sorgo. Su importancia económica se debe a su función como alimento humano o para ganado, así como fuente de cerca de cuatro mil productos industriales. Los ambientes en los cuales el maíz puede ser cultivado son diversos (Paliwal, 2001). En México la producción y el consumo de cereales ha aumentado con el paso del tiempo, principalmente de maíz (Figura1) tan solo en el año 2014 la producción anual de cereales (trigo, maíz, sorgo y otros cereales) fue de 34.190 millones de toneladas de las cuales 22.660 millones de toneladas fueron de maíz (FAO, 2015).

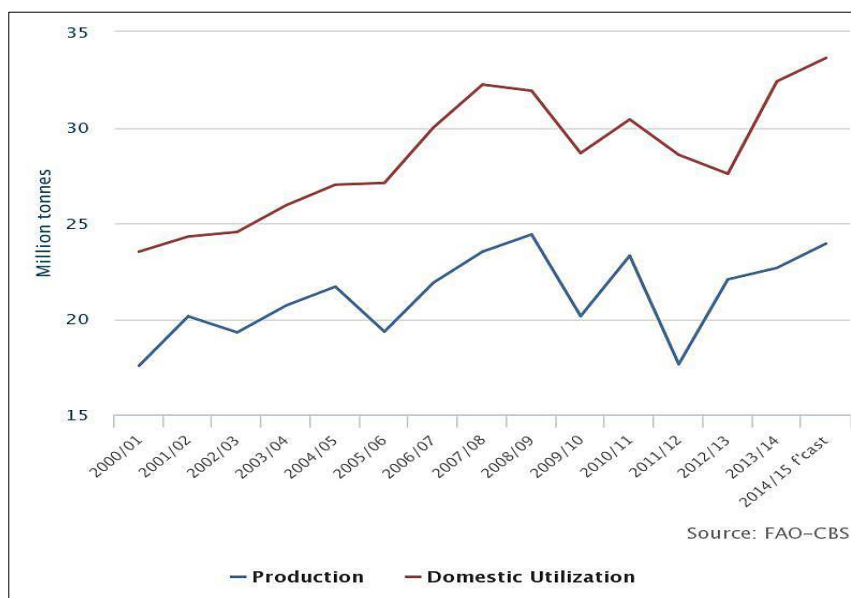


Figura 1. Producción y consumo de maíz en México, desde el año 2000 hasta el pronóstico del año 2015. Fuente: FAO, 2015.

La agricultura impulsa, la economía de la mayoría de los países en desarrollo, por lo tanto es esencial cuidar de la integridad de éstos. No toda la superficie sembrada de los cultivos es cosechada, tan solo anualmente se pierden 448,318 ha de maíz en nuestro país (SAGARPA y SIAP, 2014), que se ven reflejados en pérdidas económicas en muchos de los campos agrícolas de la República Mexicana. Las pérdidas de cultivos pueden deberse a diversas causas naturales físicas, donde los daños son ocasionados por las condiciones climáticas como el frío, calor, lluvias, heladas, vientos, sequias, etc.; y causas biológicas como enemigos naturales por ejemplo: parásitos, predadores, además de las enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias (Robles, 1986). La incidencia de las enfermedades presentes en los cultivos se conoce desde tiempo atrás, sin embargo es hasta el siglo XIX que se empezó a proporcionar información y evidencias experimentales que establecían a los microorganismos como los agentes causales de dichas enfermedades (Narayanasamy, 2011).

El rendimiento de los cultivos desde el punto de vista agronómico, depende de factores ambientales, del manejo y de la calidad del suelo. Son muchas las

características que se cree proporcionan información cualitativa y cuantitativa acerca de la calidad del suelo como: la materia orgánica, la capacidad de infiltración, densidad aparente, pH, capacidad de almacenamiento de agua, una de las que se cree esencial es la detección de la biomasa microbiana (Campitelli *et al.*, 2010). Además de que los microorganismos presentes en los suelos influyen fuertemente en la sustentabilidad y productividad de los cultivos (Nihorimbere *et al.*, 2011).

2.2 Efecto de los microorganismos del suelo sobre los cultivos

El suelo es un hábitat o ecosistema en el que se llevan a cabo múltiples funciones, y sirve como sustrato para una amplia variedad de plantas o cultivos, animales y microorganismos. Está compuesto de rocas, arena, arcilla, humus o materia orgánica, minerales, entre otros, cada uno en diferentes proporciones (Ibáñez *et al.*, 2004). Las partes de las plantas que están en pleno contacto con el suelo son las raíces y a la porción de suelo que está influenciada por la actividad del sistema radical se le llama rizósfera (Hernández *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2009; Beneduzi *et al.*, 2012); en este sitio se llevan a cabo numerosas interacciones entre las raíces de las plantas, la microbiota del suelo y las condiciones fisicoquímicas del suelo (Hartmann *et al.*, 2009). Por lo tanto la calidad del suelo afecta significativamente la productividad de los cultivos, un suelo sano es aquel que a través de su actividad biótica y su propia fertilidad es capaz de fructificar cultivos por largos periodos de tiempo (Rodas, 2006).

Los suelos representan una mezcla compleja de fracciones orgánicas e inorgánicas, con agua y organismos vivos, las primeras se componen de factores bióticos, del que las plantas en diferentes fases de descomposición, raíces vivas, exudados, pequeños invertebrados y microorganismos forman parte (Ludwing y Magalhaes, 2012). Algunos ejemplos de los microorganismos que habitan en el suelo son bacterias, hongos y algas que dentro del hábitat interaccionan entre ellos, y compiten para obtener los nutrimentos y energía necesarios para su subsistencia.

Las plantas exudan compuestos orgánicos, productos de la fotosíntesis como azúcares, ácidos orgánicos, compuestos aminos y fenólicos, aminoácidos, vitaminas, hormonas y ésteres de fosfato que son necesarios para el desarrollo de las comunidades microbianas; lo que genera relaciones mutualistas que se reflejan en el número de microorganismos que se encuentran alrededor de las raíces de las plantas, generalmente de 10 a 100 veces más que en el resto del suelo (Beneduzi *et al.*, 2012).

Los microorganismos que generan relaciones íntimas con las plantas, pueden mejorar su competitividad por el agua, el espacio y los nutrientes, e intervienen en el crecimiento y la adecuación de su hospedero (Nihorimbere *et al.*, 2011). Además, no todos los organismos que atraen las plantas son benéficos ya que algunos pueden ocasionar severos daños a su hospedero (Gaspar *et al.*, 1996; Compant *et al.*, 2005; Sauer *et al.*, 2013)

Las interacciones entre plantas y microorganismos se clasifican en tres tipos: neutras, dañinas y benéficas, éstas expresan parte de la calidad del suelo, relacionados estrechamente con la productividad de los cultivos. Es importante mencionar que la composición de las comunidades microbianas en la rizósfera dependerá de la especie de la planta, la etapa de desarrollo y el tipo de suelo (Nihorimbere *et al.*, 2011).

2.2.1 Interacciones neutras

Las interacciones neutras son establecidas ampliamente en la rizósfera de las plantas, con poblaciones de microorganismos que no causan beneficio o daño directamente, pero su presencia es vital para la dinámica del suelo. Tal es el caso de microbios saprófitos esenciales para la descomposición de materia orgánica, así como de la disponibilidad y mineralización de nutrimentos, y su ausencia influenciaría claramente en la salud y productividad de la planta (Brimecombe *et al.*, 2007).

2.2.2 Microorganismos fitopatógenos

Los exudados radicales pueden ser atractivos para microorganismos benéficos, sin embargo también lo son para poblaciones patógenas como hongos, bacterias y virus (Nihorimbere *et al.*, 2011). El resultado de tales interacciones tiene que ver con diversas enfermedades, lo que provoca pérdidas agrícolas y se estima que cerca del 30% de la producción de plantas en países en desarrollo se ven afectadas por fitopatógenos (Narayanasamy, 2008).

Los patógenos que son transmitidos del suelo a los cultivos pertenecen a diferentes phyla: bacteria, fungí o nematodos, ellos residen en el suelo por periodos de tiempo en residuos de plantas u organismos, hasta alcanzar las condiciones que les permitan crecer y desarrollarse (Haas y Défago, 2005)

A pesar de que desconocemos el 98% de los microorganismos que habitan en la rizósfera, se sabe que pocos son capaces de producir una enfermedad en las plantas, aun cuando están en contacto permanente con los patógenos (bacterias, hongos y virus), estas cuentan con una “resistencia horizontal” formada por barreras estructurales y compuestos tóxicos como las fitoanticipinas que impiden la infección (Nihorimbere *et al.*, 2011). Las plantas pueden ser atacadas por una gran variedad de microorganismos patógenos como virus, hongos, bacterias, nemátodos fitoplasmas y viroides (Rodríguez, 2001). Han sido bien identificadas y caracterizadas algunas de las bacterias que actúan como agentes patógenos las cuales incluyen a algunas Gram negativas como *Erwinia caratovora*, *Pseudomonas* y *Ralstonia* spp., así como la especie *Streptomyces scabies* que es un ejemplo de Gram positiva (Nihorimbere *et al.*, 2011).

2.2.2.1 Los hongos como agentes fitopatógenos

Los hongos son los agentes fitopatógenos más comunes aunque solo el 2% de las especies descritas son capaces de provocar una enfermedad, sin embargo las que provocan son destructivas (Narayanasamy, 2011; Nihorimbere *et al.*, 2011). Actualmente se conocen más de 8,000 especies de hongos que causan enfermedades en plantas, todas las plantas superiores pueden ser infectadas por

uno o más de estos patógenos, y una especie de hongo puede atacar a más de una especie de planta (Rodríguez, 2001).

Los hongos son organismos eucarióticos, carentes de fotopigmento y su nutrición generalmente es por absorción, debido a esto se asocian con las plantas como saprobios, simbioses benéficas o parásitos, además son extremadamente versátiles, por lo tanto pueden invadir tejidos aéreos o subterráneos de la planta (Trapero, 2000). Además, se encuentran en todos los suelos de los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos patógenos fúngicos y los síntomas asociados a sus enfermedades son los siguientes: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* retrasa el crecimiento, ocasiona ennegrecimiento de la base del tallo y en casos graves deforma la florescencia del trigo; *Fusarium oxysporum* causa enfermedades en tomate, rábano, plátano y otros; *Phytophthora cinnamomi* provoca putrefacción de la raíz en eucalipto; *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani* se ven involucrados en la podredumbre de plántulas de varios cultivos como remolacha y rábano (Haas y Défago, 2005).

Las infecciones fúngicas pueden afectar a las plantas en diferentes etapas de crecimiento y pueden ser ocasionadas por uno o más patógenos, estos entran en contacto a través de heridas naturales o artificiales (ataques de insectos, prácticas agrícolas etc.), lo que da lugar a la exudación de nutrientes disponibles para los llamados patógenos débiles como *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp., entre otros, estos organismos también infectan directamente a la planta por la superficie intacta de los pelos radicales o en el ápice de la raíz (*Verticillium* spp. y *Fusarium oxysporum*), y por las aperturas naturales como estomas o lenticelas (Jiménez, 2000). Los agentes fitopatógenos están presentes en el suelo, agua, aire o son transmitidos por vectores naturales. Son muchas las especies de hongos que afectan a los cultivos, incluso algunos tienen variedades o biotipos dentro de la especie, presentan diferentes morfologías, pero sobre todo su patogenicidad es distinta, por lo que es necesario realizar diversas investigaciones para el control de dichos microorganismos.

Algunas de las enfermedades causadas por los hongos consisten en marchitamientos vasculares y manchas de las hojas, pudriciones de las raíces y tallos, pudrición de frutos, granos y semillas (Arbeláez, 2000). Además, algunas especies del género *Fusarium* pueden causar infecciones oportunistas en el hombre y en los animales, mientras que otras especies producen toxinas que también pueden afectar, cuando son ingeridos alimentos contaminados con estos hongos (Arbeláez, 2000). Algunas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* entre otras, son productoras de toxinas como aflatoxinas (Arbeláez, 2000), además de las fumonisinas, moléculas sintetizadas por hongos como *F. verticillioides* que afectan en 50% el crecimiento de maíz y hasta el 75% la elongación radicular de semillas de maíz durante la germinación (De la Torre *et al.*, 2014). *Fusarium* es uno de los hongos que se encuentra presente en las enfermedades más prominentes de los cultivos; en el maíz (*Zea mays* L.) causa la pudrición del tallo y raíz, pero también ataca a otros cereales como el trigo, cebada, avena, centeno y pastos forrajeros (Mendoza *et al.*, 2006; Figueroa *et al.*, 2010)

El género *Fusarium* puede causar daño en todas las etapas del cultivo de maíz, desde semilla cuando el micelio la invade provocando manchas en las cubiertas externas, evitando además la germinación por muerte del embrión hasta plántula o planta adulta, debilita y pudre la raíz ocasionando el acame (Figueroa *et al.*, 2010).

Las enfermedades ocasionadas por el género *Fusarium* muchas veces son asintomáticas, como la podredumbre de la mazorca provocada principalmente por *F. verticillioides*, los síntomas de la infección se presentan en la raíz cuando esta es colonizada, sin embargo en el tallo no hay mucho desarrollo de hifas, por lo que la infección cursa de manera asintomática hasta ciertos tejidos como la mazorca (De la Torre *et al.*, 2014).

2.2.3 Microorganismos benéficos

Los productos del metabolismo microbiano alteran o modifican la composición química del suelo en el que habitan (Carrillo, 2003; Hartmann *et al.*, 2009), por lo tanto intervienen en el crecimiento y adecuación de las plantas con las cuales

generan estrechas relaciones (Hernández *et al.*, 2008; Nihorimbere *et al.*, 2011). Las bacterias que habitan en la rizósfera expresan un metabolismo microbiano diferente de acuerdo a la relación bioquímica y ecológica que establecen con la planta, debido posiblemente a la calidad y cantidad de exudados encontrados en la rizósfera (Reyes *et al.*, 2008; Ahemad y Kibret, 2014)). En la rizósfera existen interacciones que resultan benéficas para las plantas, los microorganismos que allí habitan pueden dividirse en tres categorías. La primera son aquellos que en asociación con las plantas son responsables de su nutrición, estos pueden aumentar los nutrientes minerales disponibles en el suelo. Segundo, son las poblaciones microbianas que aumentan el crecimiento de las plantas indirectamente, pues reducen o evitan los efectos de uno o más organismos fitopatógenos (Haas y Defago, 2005; Beneduzi *et al.*, 2012); además generan competencias en la rizósfera para promover la tolerancia hacia patógenos con la producción de sideróforos, moléculas de alta afinidad por el hierro que actúan como agentes quelantes para secuestrar el hierro y reducirlo a Fe^{2+} para su nutrición, evitando la disponibilidad del ion en el medio, factor que limita el crecimiento de otros microorganismos (Rodas, 2006). Un tercer grupo, integrado por microorganismos responsables de estimular el crecimiento de la planta directamente, por ejemplo a través de la producción de fitohormonas (Brimecombe *et al.*, 2007).

2.3 Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

Muchas bacterias de vida libre o asociativas producen un efecto positivo en las plantas, a través de la estimulación del crecimiento directamente o indirectamente por lo que se les ha nombrado rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, (BPCV) (Hernández *et al.*, 2008; Zúñiga, 2009; Sarabia *et al.*, 2010; Cassán *et al.*, 2013). Actualmente la lista de especies bacterianas identificadas como BPCV ha aumentado, como resultado de numerosos estudios para el entendimiento de sus mecanismos de acción (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Los efectos de las BPCV incrementan la disponibilidad de nutrientes; con el biocontrol, por la producción de antibióticos para evitar la acción de microorganismos infecciosos para las plantas, la síntesis de metabolitos antagónicos, compuestos orgánicos volátiles, toxinas, factores de degradación o desintoxicación de virulencia, tales representan otra manera de protección contra patógenos (Compant *et al.*, 2005, Rodas, 2006; Nihorimbere *et al.*, 2011; Cassán *et al.*, 2013). La fitoestimulación por la producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas (Loredo *et al.*, 2004; Brimecombe *et al.*, 2007; Nihorimbere *et al.*, 2011; Cassán *et al.*, 2013); alteraciones en el potencial de membrana de la raíz e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo *et al.*, 2004).

2.3.1 La biofertilización como acción de las BPCV

Las rizobacterias ayudan a promover el crecimiento de las plantas a través de la provisión de nutrientes a su hospedero, el ejemplo más estudiado es la fijación de nitrógeno por bacterias como *Azospirillum*, este proceso consiste en la reducción de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4), catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, es propio de bacterias diazotróficas (Loredo *et al.*, 2004). La acción de biofertilización por las BPCV hace disponible aproximadamente el 65% de N_2 para los cultivos mundiales (Nihorimbere *et al.*, 2011). A través de la asociación de bacterias diazotróficas con otras bacterias y hongos celulíticos aumenta el efecto en la fijación biológica de nitrógeno y en algunos casos también la absorción de fósforo como en la asociación *B. polymyxa* y *A. brasilense* (Loredo *et al.*, 2004).

Las bacterias también aportan fósforo para la nutrición de su hospedero y a través de la oxidación proveen otro nutriente a las plantas, como el sulfato (Nihorimbere *et al.*, 2011). Algunas rizobacterias tienen efecto sinérgico con otros microorganismos benéficos, a través de inhibición de etileno por parte de la planta y la solubilización de algunos elementos, se han realizado varios esfuerzos para formular y utilizar a estos microorganismos con el ánimo de reducir costos y mantener o superar los rendimientos en los cultivo (Camelo *et al.*, 2011).

2.3.2 Reguladores de crecimiento vegetal

Las investigaciones acerca de la promoción del crecimiento mediado por las BPCV se atribuye a más que solo fijar nitrógeno, abarcan numerosos mecanismos que han sido descritos y explicados, sin embargo uno solo no puede generar tal respuesta (Loredo *et al.*, 2004). Los reguladores de crecimiento vegetal, también llamados fitohormonas son compuestos naturales de bajo peso molecular que afectan procesos de las plantas a concentraciones más bajas de las que están presentes los nutrimentos o vitaminas (Loredo *et al.*, 2004; Celis y Gallardo, 2008).

Los reguladores de crecimiento vegetal pueden ser producidos endógenamente, es decir por la planta misma a muy bajas concentraciones, o exógenas, aquellas que no son propias de las plantas sino que son el resultado del metabolismo de algunos microorganismos asociados a plantas, por ejemplo bacterias, hongos, etc. o incluso productos aplicados generalmente sintéticos (Jankiewicz, 2003; Sauer *et al.*, 2013).

Auxinas, ácido abscísico, citoquininas, etileno y giberelinas son comúnmente reconocidas como las cinco clases de hormonas reguladoras del crecimiento (Gaspar *et al.*, 1996; Celis y Gallardo, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006; Sauer *et al.*, 2013), estas sustancias de carácter orgánico, activan respuestas en la célula vegetal a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico (Camelo *et al.*, 2011).

Uno de los efectos más importantes es la modificación de la raíz, que incluye una fitoestimulación de este órgano y un incremento significativo en la formación de pelos radicales, lo que favorece su permeabilidad a ciertos iones (Loredo *et al.*, 2004), las fitohormonas también participan en la regulación de la quiescencia y germinación de las semillas, en el crecimiento del tallo, en la inducción del brote de yemas y el desarrollo de frutos, así como para la inhibición o el retardo del crecimiento de las plantas (Loredo *et al.*, 2004; Celis y Gallardo, 2008; Tsavkelova *et al.*, 2006). Estudios con fitohormonas revelan que estas incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales por medio de la expresión o supresión de genes y a través de la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006; Nihorimbere *et al.*, 2011).

La habilidad de los microorganismos (principalmente bacterias) en la síntesis de fitohormonas ha llevado a usarlos en la producción de cultivos, pues presentan ventajas adicionales sobre las fitohormonas sintéticas, ya que 1) tienen mayor espectro de actividad, 2) niveles de los reguladores de crecimiento óptimos, 3) presencia de otros componentes activos biológicamente (vitaminas), que son necesarios para el desarrollo normal de las plantas (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Las fitohormonas también son utilizadas como agonistas de infecciones virales y enfermedades causadas por patógenos fúngicos (Tsavkelova *et al.*, 2006),

2.3.2.1 Auxinas

Los reguladores de crecimiento vegetal del tipo de las auxinas fueron las primeras fitohormonas descubiertas en las plantas y por lo tanto también su estructura química fue la primera en evidenciarse (Jankiewicz, 2003). Estas fitohormonas son definidas como ácidos orgánicos de bajo peso molecular que contienen estructuralmente un anillo aromático y un grupo carboxilo (Sauer *et al.*, 2013)

Las auxinas son las responsables de la división, extensión y diferenciación tanto de células como tejidos de plantas (Tsavkelova *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2008). Estas moléculas interfieren en la germinación de semillas, afecta la fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia a los factores de estrés; en cuanto a la organización de tejidos actúan manteniendo la dominancia apical, afecta la abscisión, incrementa la formación de raíces, tropismos, florecencia y fructificación (Gaspar *et al.*, 1996; Tsavkelova *et al.*, 2006; Fu y Wang, 2011; Sauer *et al.*, 2013).

Son muchos los compuestos químicos que pertenecen a esta clasificación, el más conocido y estudiado es el ácido indol-3-acético (AIA) ya que es la auxina más abundante y endógena capaz de cumplir los procesos involucrados con el desarrollo de las plantas y la respuesta al medio ambiente (Reyes *et al.*, 2008); el ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido indol propiónico (AIP) también forman parte de este grupo (Gaspar *et al.*, 1996; Celis y Gallardo, 2008; Camelo *et al.*, 2011). Entre los compuestos derivados del naftaleno se encuentran el ácido naftalenacético (ANA),

ácido naftoxiacético y el ácido naftil propiónico, así como los compuestos derivados del radical fenoxi.

Actualmente se aceptan cuatro auxinas naturales en las plantas: el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido fenilacético (AFA) y el ácido 4-cloro-indolacético (Jankiewicz, 2003; Sauer *et al.*, 2013).

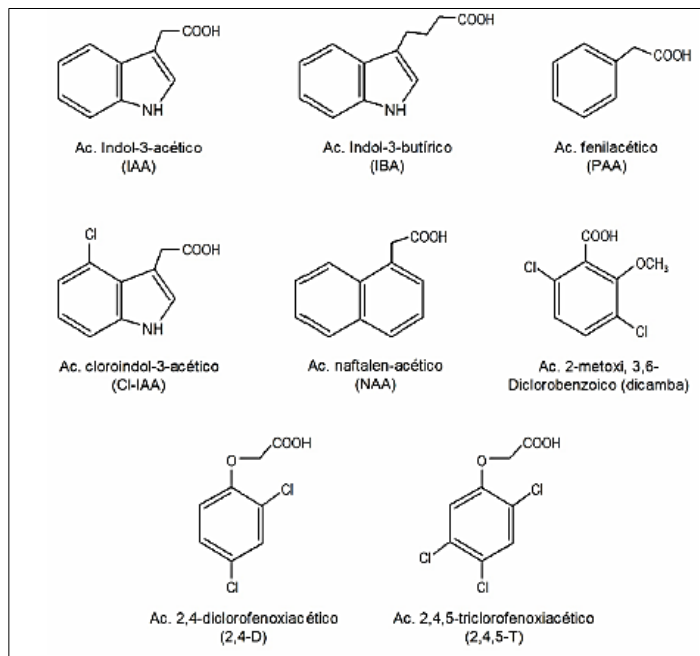


Figura 2. Estructura de algunas auxinas naturales (AIA, AIB, Cl-IAA) y sintéticas (NAA, dicamba, 2,4-D y 2,4,5-T), fuente Jordán y Casaretto, 2006.

El AIB fue descubierto en tubérculos y ha sido encontrado en diversas especies de plantas como *Arabidopsis* el AIB representa del 25 al 30% del total de las auxinas sintetizadas por la planta. Procesos como epinastia en hojas, división celular, elongación de los pelos radicales y la expansión celular en los cotiledones, son algunos en los que participa esta fitohormona (Sauer *et al.*, 2013). Este compuesto es sintetizado y convertido en AIA, por lo tanto es considerado como almacén de tal auxina que provee a la hormona activa cuando es necesario (Sauer *et al.*, 2013).

El ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-AIA) ha sido encontrado en un gran número de plantas, en algunos miembros de la familia Fabaceae. Actúa estimulando el

crecimiento del pericarpio en guisantes y en maíz provoca la elongación del coleóptilo (Sauer *et al.*, 2013).

Algunas investigaciones han sugerido que el ácido fenilacético participa en la interacción de las raíces con los microorganismos del suelo (Sauer *et al.*, 2013), y que este metabolito bacteriano es sintetizado a partir de fenilalanina (Somers *et al.*, 2004). Las investigaciones sugieren que esta auxina también tiene actividad antagónica contra bacterias y hongos fitopatógenos (Hwang *et al.*, 2001; Slininger *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2005).

Los componentes sintéticos tipo auxinas difieren en su estructura con las de procedencia natural, estos reguladores de crecimiento en plantas comparten muchas actividades biológicas con las hormonas endógenas. Los análogos de las auxinas son: ácido 1-naftsalenoacético, ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico, ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-picolínico, entre otros. Algunos de estos compuestos son utilizados como herbicidas, debido a que son compuestos tóxicos a altas concentraciones (Sauer *et al.*, 2013).

2.3.2.2 Giberelinas

Son sustancias clasificadas con los diterpenos, consisten de residuos de isoprenos que generalmente forman 4 anillos (A, B, C y D). Son más de 100 los componentes clasificados dentro de estas fitohormonas, los más estudiados son los ácidos giberélicos (Gas) GA3, GA7, GA1 y GA4 (Tsavkelova *et al.*, 2006), el precursor para la síntesis de Giberelinas es el acetato.

Esta fitohormona es capaz de incrementar el crecimiento de los tallos con la división y elongación del meristemo intercalar principalmente, además de estimular la florescencia, activar la síntesis de membranas y enzimas amilolíticas, también se relaciona con la germinación de las semillas ya que interrumpe el periodo de latencia, se ha reportado que bacterias como *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *Azetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Bacillus* sp. son productores de giberelinas (Camelo *et al.*, 2011)

2.3.2.3 Citoquininas

Los compuestos que exhiben actividad de citoquininas son derivados de adenina, sin embargo su actividad dependerá de la estructura y naturaleza de sus moléculas, éstas regulan un amplio rango de procesos fisiológicos: son capaces de potenciar la actividad de la RNA polimerasa y de este modo afectar la síntesis de proteínas, estimulan la división celular, regula la formación de cloroplastos, aumenta la resistencia de las células a situaciones ambientales adversas, como la estabilización del aparato fotosintético bajo condiciones de estrés por agua. La quinetina, zeatina, isopenteniladenina, entre otros (Figura 3) son los principales compuestos clasificados como citoquininas (Gaspar *et al.*, 1996; Tsavkelova *et al.*, 2006) y sintetizados por algunas rizobacterias del genero *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Tsavkelova *et al.*, 2006).

La síntesis de citoquininas por las bacterias que habitan en los nódulos de la raíz del genero *Rhizobium* estimulan la formación de nódulos simbióticos en plantas leguminosas (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Se considera que muchas bacterias de la rizósfera son capaces de producir citoquininas biológicamente activas entre los géneros bacterianos más conocidos se encuentra *Bacillus* (Camelo *et al.*, 2011). La presencia de citoquininas exógenas estimula la biosíntesis de antibióticos, aminoácidos y algunas enzimas de los microorganismos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

2.3.2.4 Ácido abcísico

Es considerado un regulador de crecimiento negativo, por su acción inhibitoria, ya que mantiene las yemas en latencia, inhibe la acción de las auxinas y hace más lenta la elongación celular, es capaz de disminuir la respiración a través del cierre de estomas, además en conjunto con otras fitohormonas provoca la senescencia y abscisión de hojas. Su principal representante es el (S)-(+)- ácido abcísico, además de ser el más común en la naturaleza (Gaspar *et al.*, 1996).

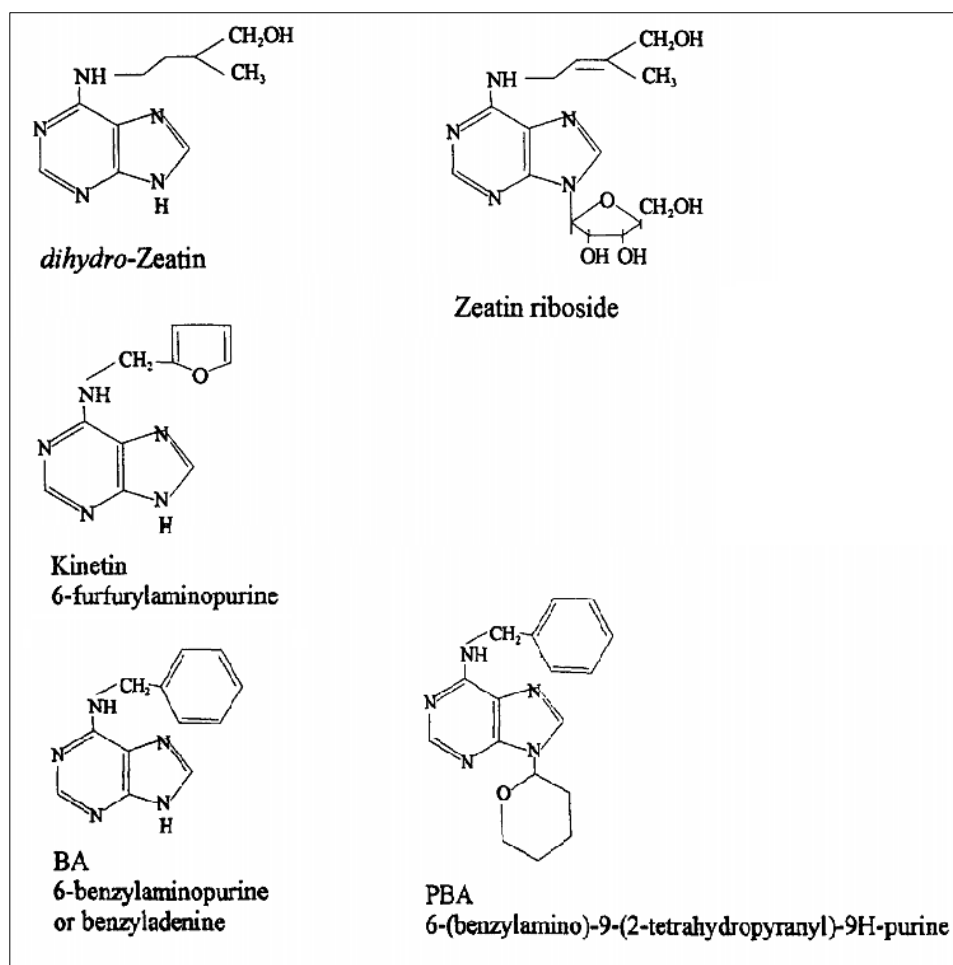


Figura 3. Citoquininas naturales y sintéticas. Fuente Gaspar et al., 1996

2.3.2.5 Etileno

Es un gas que actúa en conjunto con otras fitohormonas, principalmente auxinas. Las funciones del etileno son difíciles de entender ya que dependen del estado de desarrollo de la planta y las concentraciones a las cuales son sometidas para suprimir o promover diversos procesos, por ejemplo a altas concentraciones el etileno puede disminuir la elongación celular, pero aumenta la expansión celular. En general el etileno se ve involucrado en la maduración de la fruta, senescencia y abscisión de hojas. La síntesis de este regulador de crecimiento se da a partir de metionina, sin embargo se ha observado un sinergismo entre auxinas, citoquininas y

el etileno, ya que las primeras estimulan la síntesis de etileno, mientras que las segundas bloquean su acción (Gaspar *et al.*, 1996).

2.4 Rizobacterias como control Biológico

El control biológico es un desafío para los investigadores y la industria pues ha surgido ante la necesidad de encontrar nuevos métodos para el control de problemas fitosanitarios, presentes no solo en México sino en todo el mundo, ya que el uso de agroquímicos ha dejado daños importantes al medio ambiente, además de las enfermedades ocasionadas a animales y seres humanos. Por lo tanto la aplicación de bacterias con características de biofertilización, antagonismo y control biológico es una alternativa efectiva tanto para países con agricultura subdesarrollada que carecen de fertilizantes como para aquellos que manejan una agricultura moderna, pues esto permite reducir la cantidad de plaguicidas y fertilizantes químicos que deterioran la calidad de los suelos (Trujillo *et al.*, 2007).

Las rizobacterias como *Burkholderia spp.* degradan el ácido fusárico, un factor de patogenicidad del hongo *F. oxysporum*, resultando en la protección de plantas (Antoun, 2013), lo que sugiere que algunas BPCV poseen mecanismos que las hacen aptas para considerarlas como control biológico.

Los tipos de biocontrol en los que participan las rizobacterias se pueden resumir en la producción de sideróforos, control de patógenos mediante antagonismos o competencia, por medio de la resistencia sistémica adquirida e inducida, hidrólisis de moléculas producidas por patógenos, producción de enzimas y competencia (Sarabia *et al.*, 2010).

La competencia por oxígeno y nutrientes que ocurre generalmente en el suelo entre los microorganismos, puede ser un agente de biocontrol cuando el antagonista (BPCV) compite directamente con el patógeno, por tales fuentes o por nichos adecuados en la superficie de las raíces, por su establecimiento y la persistencia, desarrollando diversas estrategias (Nihorimbere *et al.*, 2011).

El éxito de la colonización de las rizobacterias dependerá de su habilidad para tomar ventaja en ambientes específicos o a la adaptación al cambio de condiciones, pueden colonizar la superficie de las raíces activando su motilidad facilitada por flagelos, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Campylobacter*, *Azotobacter* y *Azospirillum* son algunos géneros que presentan tal característica, y adueñarse de los aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos exudados por las plantas, fuente primaria de nutrientes para los microorganismos (Compant *et al.*, 2005; Camelo *et al.*, 2011).

La competencia por nutrientes especialmente por el carbono, es importante, ya que este es responsable del fenómeno de fungistasis pues evita la germinación de esporas fúngicas. La captación de elementos como hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), manganeso (Mn), entre otros, genera beneficios a los microorganismos, por ejemplo el primero es esencial para todos los organismos, pero es escaso en forma bio-disponible, por lo que la producción de sideróforos (Figura 4c), compuestos de alta afinidad por el Fe, lo hacen disponible para tal microorganismo, esto ha sido reportado por bacterias como *Pseudomonas* (Antoun, 2013; Nihorimbere *et al.*, 2011).

La alta densidad de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el sistema radical, afecta a patógenos no solo por la competencia de nichos, sino que además producen metabolitos de naturaleza antagónica, que están involucrados directamente en la inhibición de patógenos de plantas (Trujillo *et al.*, 2007). Los antibióticos, compuestos volátiles, toxinas y biotensioactivos participan en la antibiosis (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Otro mecanismo usado por las bacterias asociadas a plantas para reducir la patogenicidad es activando la defensa propia de la planta, fenómeno llamado “resistencia sistémica inducida” (RSI) tiene que ver con la capacidad de inducir un estado de defensa, mejorando el desarrollo de las plantas (Beneduzi *et al.*, 2012). Algunas veces la RSI se superpone en parte con la “resistencia sistémica adquirida” (RSA). La activación tanto de RSI como de RSA dependen de la señalización de compuestos como ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico (Figura 4b)

(Nihorimbere *et al.*, 2011). La variedad de moléculas que generan resistencia en plantas contra patógenos que han sido descritas incluyen a: lipopolisacáridos, ácido salicílico, biotensioactivos, lactonas N-acil homoserina (AHL), antibióticos y exopolisacáridos (Beneduzi *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que metabolitos como el ácido jasmónico y el etileno actúan como señal de defensa, pues estos incrementan cuando las plantas están infectadas, probablemente estas moléculas coordinan respuestas de defensa induciendo resistencia (Beneduzi *et al.*, 2012).

Las bacterias que tienden a producir sideróforos y antibióticos pueden ser de importancia agronómica, pues tienen funciones esenciales para la supresión de patógenos a través de la competencia microbiana y de la inducción de resistencia sistémica (Camelo *et al.*, 2011).

La producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias son capaces de interferir con la patogenicidad de algunos microorganismos, durante el estudio de estos componentes ha llevado a la identificación de 2,4-Diacetilphloroglucocinol, 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazina-1-carboxílico, pioluteorin, y pirrolnitrina como agentes antifúngicos potentes producidos por *Pseudomonas* (Antoun, 2013)

Los antagonistas microbianos no poseen un solo modo de acción y parece difícil determinar con precisión cuales son los mecanismos que intervienen en las relaciones patógeno-antagonista, pero hay evidencias que sugieren la función vital de los metabolitos bacterianos en tales interacciones (Trujillo *et al.*, 2007).

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* son antagonistas in vitro de hongos fitopatógenos como *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *F. oxysporum* y *Alternaria alternata* en porcentajes superiores al 97%, mientras que la inhibición de tales hongos con los metabolitos sintetizados por algunas cepas de las especies bacterianas mencionadas fue del 100% (Trujillo *et al.*, 2007).

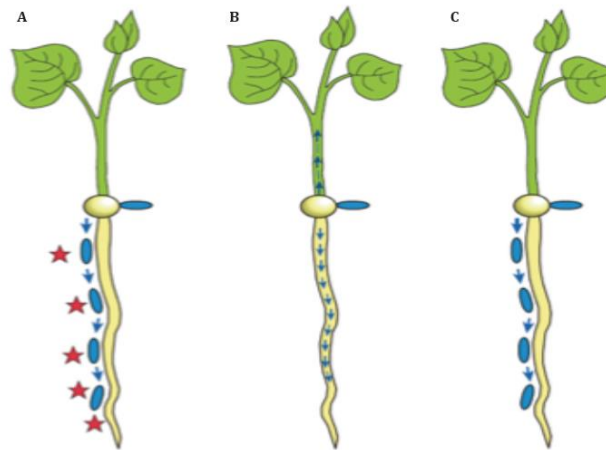


Figura 4. Mecanismos de control biológico de enfermedades en plantas por bacterias. En todos los casos ilustrados aquí, el biocontrol comienza con el revestimiento de semillas con las bacterias de biocontrol. (A) Antibiosis. La bacteria coloniza las raíces en crecimiento y libera moléculas antibióticas alrededor de la raíz, perjudicando así los patógenos próximos a la raíz (indicado por las estrellas). (B) La resistencia sistémica inducida (RSI). Muchos productos bacterianos inducen el sistema de señalización, lo cual puede resultar en la protección de toda la planta contra las enfermedades causadas por organismos diferentes. (C) Competencia. Las bacterias de control biológico actúan compitiendo por los nutrientes y nichos que ocupan en la raíz. Fuente: Sarabia *et al.*, 2010.

2.4.1 El ácido fenilacético como control biológico

Estudios acerca del uso de bacterias como agentes de control de patógenos, principalmente de hongos dejan al descubierto algunos métodos de acción que involucran al ácido fenilacético que es conocido por poseer un efecto fisiológico positivo sobre el crecimiento y desarrollo del maíz.

El ácido fenilacético (AFA) ha sido identificado como uno de los metabolitos sintetizados por *Streptomyces* spp. como un compuesto activo, antagónico de hongos patógenos como *Phytophthora capsici* y *Magnaporthe grisea* (Hwang *et al.*, 2001), Ensayos in vitro han demostrado que a una concentración de 50 µg mL de AFA se inhibe completamente el crecimiento de fitopatógenos como *P. capsici*, *R. solani*, *S. cerevisiae* y *P. syringae* pv. *syringae*, sin embargo aún con concentraciones altas (500 a 1000 µL) de AFA se mostró menor inhibición en

hongos como *A. mali*, *C. destructans*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Hwang *et al.*, 2001) y demostraron por primera vez la eficacia in vivo del ácido fenilacético en el control de la plaga de *Phytophthora* en plantas de pimiento, a través de la inhibición de germinación de zoosporas y del crecimiento micelial (Hwang *et al.*, 2001).

Se ha relacionado la síntesis del ácido fenilacético con la actividad antifúngica de *Streptomyces* contra *Mucor miehei* y *Candida albicans* (Sajid *et al.*, 2011).

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La productividad de los cultivos se ve amenazada por una amplia diversidad de patógenos, algunos de los que provocan severas pérdidas son los microorganismos fúngicos. El control de las enfermedades causadas por hongos durante años ha dependido de prácticas agrícolas convencionales, en las que se ha empleado de manera indiscriminada agroquímicos que provocan daños al medio ambiente, a la salud humana y altos costos económicos.

El uso indiscriminado de compuestos químicos para el control de patógenos contribuyen a la contaminación ambiental por medio de productos degradados en el aire, suelo, agua y alimentos. En cuanto a los efectos del empleo de plaguicidas sobre la salud humana se han reportado que el 80% de las intoxicaciones se presentan en países en vías de desarrollo, como México. Entre los efectos más severos por el contacto o empleo de estos compuestos químicos se encuentran las enfermedades genotóxicas y teratogénicas o incluso la muerte.

El cultivo más importante por sus ganancias económicas y usos, es el maíz, sin embargo este es uno de los cultivos en el que se emplean grandes cantidades de agroquímicos.

Por lo tanto es necesario desarrollar métodos alternativos que sean eficientes contra patógenos de plantas de importancia económica y social, con menos efectos dañinos para el medio ambiente y los seres humanos, el control biológico parece ser un método eficaz, para cumplir tales objetivos.

4. JUSTIFICACIÓN

La agricultura para los países en desarrollo como lo es México se relaciona estrechamente con la pobreza y degradación ambiental, pues cultivos de hortalizas, cereales y frutas que son de importancia socioeconómica se ven afectados cada año, por diversos factores, entre ellos uno de los más importantes son las enfermedades causadas por microorganismos patógenos que provocan severas pérdidas en la productividad de los cultivos. La dependencia al uso de agroquímicos ha ido en aumento por ser aparentemente un método seguro para la protección de los cultivos que apoya además la estabilidad económica de las operaciones, sin embargo esto ha causado efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana.

Se considera que una agricultura sostenible es la principal impulsora en la estabilidad de los ecosistemas y la reducción de la inseguridad alimentaria, sin embargo esta se ve cada vez más amenazada por patógenos que dañan gran diversidad de cultivos, por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevos métodos que provean formas exitosas del control de enfermedades por patógenos, sin dañar la calidad del suelo y al medio ambiente o bien que disminuyan el uso de compuestos químicos.

Actualmente el maíz es el cultivo de mayor importancia económica para México y el segundo para el mundo por su producción, sus usos son cerca de cuatro mil, desde la alimentación humana y ganadera hasta su aprovechamiento en la producción de etanol. De ahí la importancia de realizar investigaciones para el desarrollo de técnicas o productos que eviten las severas pérdidas de este cultivo. Los hongos son los microorganismos que ocasionan los daños más frecuentes y severos en el maíz, recientes investigaciones apoyan el uso de bacterias como control biológico contra estos fitopatógenos como una alternativa confiable para controlar o erradicar su infección, además de disminuir el uso de agroquímicos y mejorar la calidad de los cultivos.

El estudio de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, su producción de reguladores de crecimiento y sus mecanismos de acción han aportado grandes beneficios a diversos cultivos, sin embargo son pocos los conocimientos obtenidos acerca de la acción de las fitohormonas o productos metabólicos como control biológico y su influencia en cultivos de maíz.

Es necesaria la caracterización de rizobacterias y de sus compuestos metabólicos que tienen la capacidad de evitar el crecimiento y/o desarrollo de patógenos como hongos en los cultivos, debido a que esto puede mejorar el control de enfermedades, mejorar la calidad del suelo, reducir el uso de pesticidas químicos y fungicidas que provocan daños socioeconómicos y disminuir su impacto ambiental.

8. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general

Determinar la producción de metabolitos secundarios del tipo auxínico como el ácido fenilacético de una colección bacteriana procedente de maíz con actividad antifúngica.

5.2 Objetivos específicos.

3.2.1. Caracterizar bacterias procedentes de maíz y antagónicas de hongos patógenos para la obtención de extractos bacterianos.

3.2.2. Caracterizar químicamente los metabolitos bacterianos con actividad antifúngica, haciendo énfasis en auxinas.

3.2.3. Determinar la producción de ácidos indólicos en los extractos bacterianos con actividad antifúngica.

3.2.4. Identificar el efecto antagonista de los extractos bacterianos sobre hongos fitopatógenos de semillas de maíz.

8. HIPÓTESIS

Algunas bacterias asociadas a maíz son productoras de metabolitos secundarios del tipo auxínico como el ácido fenilacético, por lo tanto tienen la capacidad de inhibir el daño ocasionado por hongos patógenos de maíz.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Selección de cepas

Se incluyeron cepas bacterianas que pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos “Dr. Jesús Caballero Mellado”, del Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP y procedentes de la rizósfera de maíz de diferentes variedades.

A las cepas bacterianas estudiadas se les comprobó el efecto antagónico hacia dos hongos del genero *Fusarium* la cepa homologa (clave IMt2-3), aislada de semillas de maíz *Fusarium* sp. y el otro una cepa heteróloga *Fusarium* sp. (Clave CCoax-3b) aislada de la rizósfera de cacao ambas de la colección antifúngica de Microbiología de Suelos, BUAP. Se seleccionaron las 27 mejores bacterias de 300 y con actividad antifúngica para la caracterización de metabolitos tipo auxínicos.

El efecto antagónico de las cepas bacterianas sobre *Fusarium* sp. se determinó utilizando cajas Petri en medio de cultivo Agar Infusión de papa. Se inoculó a las bacterias en seis radios de 3 cm cada una. Posteriormente, se sembró el hongo por picadura en el centro de la placa. Cada 24 h se midió el diámetro fúngico, durante cuatro días. Los resultados obtenidos fueron comparados con el crecimiento del hongo sin la presencia de bacterias como tratamiento control.

7.2 Producción y extracción de índoles

Las 27 bacterias con mayor actividad antifúngica fueron seleccionadas y propagadas en tubos con caldo de soya y tripticaseina (CST) y se incubaron por 48 h en agitación a 220 rpm (Figura 5). Posteriormente, se ajustó la población bacteriana al tubo No. 3 de la escala de McFarland (9×10^8 UFC). Se inoculó 1 mL en frascos con medio CST suplementado con L-triptófano (0.1 gL^{-1}). Cada cepa se incubó en agitación a 220 rpm durante 96 h y por triplicado. Al terminar el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min, para obtener el sobrenadante que contiene los metabolitos sintetizados por las bacterias. Se le midió el pH y se ajustó a 2.5 ± 0.02 con HCl al 10%.

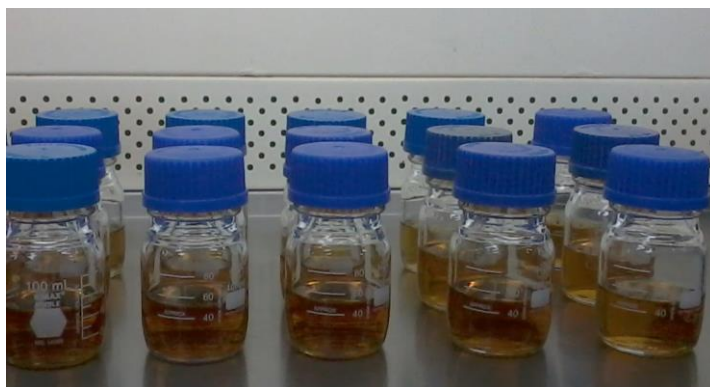


Figura 5. Medios caldo de soya y tripticaseina (CST), inoculados con cepas bacterianas a evaluar contra el hongo *Fusarium* sp.

A cada muestra del sobrenadante acidificado se le realizaron tres lavados con acetato de etilo, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. El primero se realizó agregando a un embudo el sobrenadante con pH ajustado a 2.5 (50 mL), más 40 mL de acetato de etilo, se agitó durante 4 min. Se dejó reposar hasta que se distinguieran las dos fases, y se separó la fase orgánica en un tubo. El segundo lavado consistió en adicionar 20 mL de acetato de etilo a la fase acuosa en el embudo y se agitó por 4 min. Se dejó en reposo la mezcla hasta observar ambas fases y desechar la fase acuosa.

Se realizó la destilación de la fase orgánica obtenida en un rotavapor, para obtener los índoles producidos por cada cepa bacteriana. Las muestras fueron sometidas a 37 °C, hasta evaporación, el residuo se resuspendió con 500 μ L de metanol y fue conservado en refrigeración.

7.2.1 Espectrofotometría

La determinación de producción de índoles de cada cepa bacteriana se realizó con el método de detección colorimétrica, por medio del reactivo de Salkowsky, preparado con: 0.4058 g FeCl_3 , 20 mL H_2SO_4 , 33 mL H_2O (Glickman y Dessaux, 1994).

En un tubo de ensaye se hizo reaccionar 20 μ L de muestra más 1 mL de reactivo en baño maría a 60°C por 5 minutos en oscuridad. El reactivo de Salkowsky permitió la

oxidación del compuesto indólico por sales férricas, provocando cambios en la coloración que pueden ir hasta rosa claro o intenso en caso de ser positivo, ver Figura 6 (Lara *et al.*, 2011).



Figura 6. Cambios de coloración por la oxidación de los compuestos indólicos presentes en los extractos bacterianos y el reactivo de Salkowsky, de menor a mayor concentración.

Se realizaron lecturas a 535 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer's LAMBDA 25. Como blanco se utilizó 1 mL de reactivo de Salkowsky más 20 μ L de metanol. Cada muestra se trabajó por triplicado.

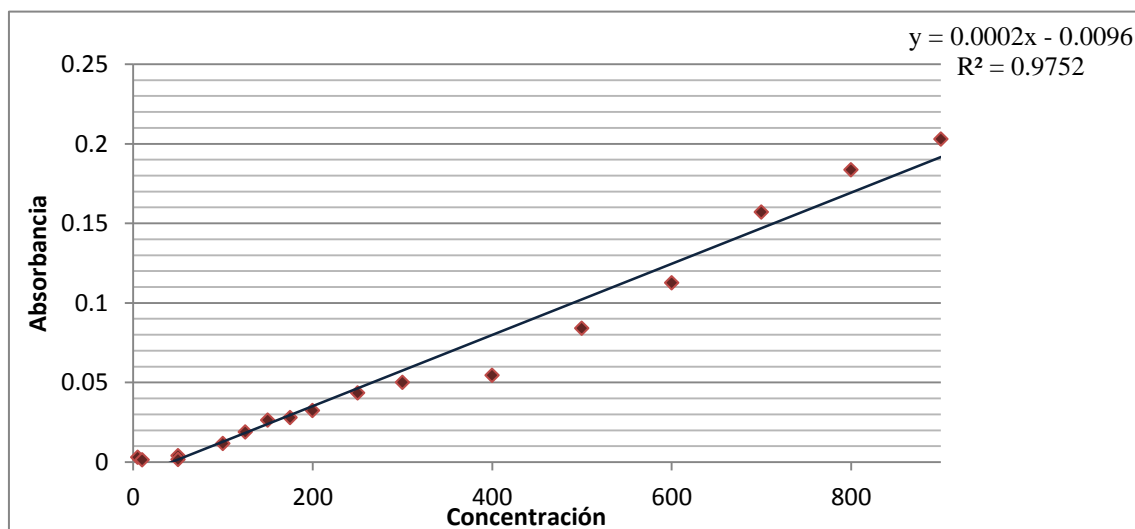


Figura 7. Curva de calibración de ácido indol-3-acético (AIA), obtenida por método colorimétrico con el reactivo de Salkowsky. También se muestra la ecuación de la recta.

Paralelamente se elaboró una curva de calibración con un patrón de AIA sintético (SIGMA-ALDRICH I3750), para obtener la ecuación de la recta y cuantificar la

concentración de índoles totales de cada extracto bacteriano (Figura 7), utilizando como estándar al AIA.

7.3 Cromatografía en capa fina HPTLC

La presencia de ácido fenil-3-acético, se determinó por medio de cromatografía en capa fina. La técnica de separación de compuestos, constó de dos fases: la estacionaria, en este caso placas de sílica de 10x5 cm, cada una; y la fase móvil, que fue una mezcla de solventes acetato de etilo:benceno:ácido acético (25:75:5). Se utilizó el estándar de ácido fenilacético (AFA) a una concentración de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para el corrimiento se colocó en el extremo izquierdo el estándar AFA ($1 \mu\text{L}$), y en seguida se distribuyeron los extractos bacterianos ($4 \mu\text{L}$ de cada uno) sobre la placa de sílica (HPTLC LiChrospher[®] Silica gel 60 F₂₅₄S) ver figura 8, previamente marcada se dejó un centímetro de separación entre muestras. El corrimiento se realizó con la fase móvil en una columna de cristal. Se dejó secar, para determinar la separación de los compuestos metabólicos y calcular el RF, fue necesario visualizar la placa de sílica con ayuda de una lámpara de luz UV.

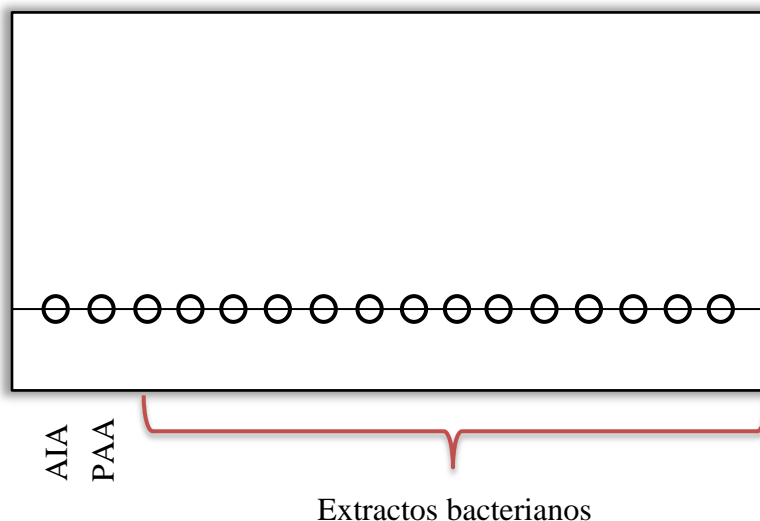


Figura 8. Distribución de muestras en placa de sílica (HPTLC Li Chrospher[®] Silica gel 60 F₂₅₄S), para la cromatografía en capa fina.

7.4 Prueba de sanidad de semillas en papel secante.

Se seleccionaron 100 semillas de maíz criollo blanco, a las que se les realizó 1 lavado con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10%. Se agitó durante 3 minutos (Warham *et al.*, 1998), seguidos de 4 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente las semillas se dejaron reposar en 10 mL de agua durante 24 h.

Las semillas se colocaron sobre papel absorbente debajo de una película plástica, se colocaron cinco filas por 20 columnas, acomodadas a espacios constantes entre cada semilla, para evitar el contacto entre estas. Fueron humedecidas con 10 mL de agua destilada estéril y enrolladas para incubarlas de 20 a 30 °C, con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Warham *et al.*, 1998).

Se mantuvieron las semillas en condiciones de humedad durante 10 días mediante la adición de agua estéril.

Transcurrida la incubación se determinó el porcentaje de semillas de maíz infectadas y los síntomas visuales detectados de los hongos presentes, la identificación de los hongos y la cantidad de semillas no germinadas.

Para determinar el efecto antagonico de los extractos bacterianos se modificó la técnica de sanidad de semillas de la siguiente forma: 100 semillas de maíz previamente lavadas y desinfectadas se dejaron reposar durante 24 h en 9.9 mL de agua destilada estéril más 100 µL de extracto bacteriano, posteriormente fueron colocadas en 20 columnas con 5 filas cada una sobre papel absorbente y película plástica, de manera que no hubo contacto entre las semillas y fueron incubadas durante 10 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de semillas infectadas por hongos y los síntomas de estos, para su identificación, así como el número de semillas que no germinaron.

7.4.1 Aislamiento e identificación de hongos

Al término del periodo de incubación de las semillas de maíz, se determinaron los síntomas de infección (color, apariencia y presencia de crecimiento fúngico). Para el aislamiento de los agentes etiológicos, se tomó parte del micelio y se inoculó en

agar de papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés Potato Dextrose Agar). El crecimiento fúngico se observó después de incubar el hongo de 3 a 4 días en obscuridad a temperatura ambiente, se volvió a sembrar cuando fue necesario hasta obtener hongos totalmente aislados.

La identificación de los hongos filamentosos se realizó mediante micro-cultivo por el método de Riddell, donde se colocó pequeños cuadros de medio PDA sobre portaobjetos que se colocan en cámara húmeda dentro de cajas Petri previamente esterilizadas adicionadas de glicerol al 10%. Se sembró el hongo a identificar por picadura a los lados del trozo de agar. Se colocó un cubre objetos estéril. Se incubó 48 h o hasta que se observó el crecimiento de micelio.

Se observó en el microscopio el micelio desarrollado y los cuerpos fructíferos. Se separó el cubreobjetos, se le agregó azul de metileno y se colocó sobre un portaobjetos, el mismo método se realizó para el portaobjetos con micelio. Las preparaciones se observaron con el objetivo 10X, 40X y 100X. Los hongos fueron identificados con ayuda de claves hechas por Warham *et al.* en 1997.

7.5 Caracterización bacteriana

Se realizó la caracterización de las bacterias CA35, CA39, P36 y T36 mediante el sistema API 20NE, 20E y el apiweb de Biomerieux^{MR} para asignar el género y la especie de dichas cepas, ya que aún no habían sido identificadas. La información se anexo a la base de datos del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP.

Las cepas que presentaron mayor producción de AIA y PAA fueron caracterizadas mediante extracción de DNA, amplificación del gen 16S rDNA mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) y Enzimas de Restricción (RE, por sus siglas en inglés Restriction enzymes).

7.5.1 Extracción de ADN

El aislamiento y purificación de ADN bacteriano se realizó mediante el Kit comercial de Wizard® Genomic DNA Purification Kit. El proceso se basó en el aislamiento de ADN a partir de la lisis celular y nuclear, se evitó la degradación del material genético por medio de la digestión con RNasa, posteriormente las proteínas se eliminaron por una solución que las precipitó por su alto peso molecular y por último el ADN se concentró y aisló por su precipitación en isopropanol.

Los cultivos bacterianos fueron propagados en CST durante 48h a 220 rpm.

Se comprobó la presencia del ADN mediante la técnica de electroforesis, con gel de agarosa al 0.8 %, y corrimiento durante 30 min a 100 volts.

Una vez verificada la presencia de material genético, se procedió a cuantificar la concentración mediante espectrofotometría. Se partió de la dilución 1:100 de DNA en agua estéril para medir su densidad óptica a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro PerkinElme´s LAMBDA 25. La concentración fue calculada de acuerdo a Roda y Taboada (1998).

7.5.2 PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es una técnica que permite amplificar una secuencia de DNA y obtener fragmentos específicos in vitro.

Se utilizó un par de iniciadores fd1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') para la amplificación del gen 16s rDNA. Se realizó una mezcla para la reacción de 12.5 µl de PCR Master Mix (Promega), 5 µL del cebador rio arriba [10 µM], 5 µL del cebador rio abajo [10 µM], 12.5 µl de agua libre de nucleasas (Promega), 10 µl de agua estéril y 5 µl de DNA templado.

La solución PCR Master Mix es una pre-mezcla que contiene *taq* DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, y un buffer que provee concentraciones óptimas para una eficiente amplificación de los templados de DNA.

La amplificación por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento por 1min a 63.2 °C, extensión a 72

°C por 2 min y una extensión final de 5 min. a 72 °C. Los productos de PCR se purificaron con el Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit #K0701.

La verificación de los productos de PCR fue comprobada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, 1:30 h a 80 volts.

7.5.3 Enzimas de restricción

La enzima endonucleasa Msp1 (Promega) fue seleccionada para las restricciones de amplificadores de PCR ya que ella corta los fragmentos de DNA en secuencia específicas 3' C[▼]CG G 5' y 5' G GC[▲]C 3'. Se realizó una mezcla de 30 µL como volumen final, que contenía: 2 µL de Msp1, 2.5 µL de Buffer B 10X Buffer, 0.2 µL Bovine Serum Albumin, Acetylated (todos de marca Promega), 5.3 µL de Agua estéril y 20 µL de producto de PCR. Se incubaron a 37°C, temperatura óptima para la enzima durante 4 h, posteriormente se desactivó a 65°C por 20 min.

Los cortes por la endonucleasa se observaron por medio de la electroforesis en gel de agarosa al 3 %, sometido a 80 volts de corrimiento durante 1:30 h.

7.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la determinación de índoles y en el método de sanidad de semillas fueron sometidos a la prueba de análisis de varianza. Cuando el análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p \leq 0.5$) se aplicó la prueba de contrastes múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica 8.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas de antagonismo realizadas con la colección bacteriana del Centro de Investigaciones Microbiológicas de la BUAP contra los dos hongos *Fusarium* sp. Condujeron a la selección de 27 cepas.

Cuadro 1. Cepas bacterianas seleccionadas por su efecto inhibitor sobre 2 hongos del genero *Fusarium* sp., todas aisladas de rizósfera de maíz y su variedad.

Clave	Especie	Variedad	Antagonismo vs <i>Fusarium</i> sp.	
			Maíz	Cacao
AM1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Criollo amarillo		X
AM6	<i>Burkholderia gladioli</i>	Criollo amarillo	X	X
AM33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Criollo amarillo		X
AM51	<i>Burkholderia gladioli</i>	Criollo amarillo	X	X
C17	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Criollo azul	X	X
CA35	<i>Pseudomonas luteola</i>	Criollo azul		X
CA39	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Criollo azul		X
CN49	<i>Burkholderia cepacia</i>	Criollo azul	X	X
CD	<i>Azospirillum brasilense</i>	Cepa de referencia		X
CR4	<i>Ralstonia pickettii</i>	Criollo rojo		X
CR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Criollo rojo	X	
CR48	<i>Burkholderia cepacia</i>	Criollo rojo	X	X
CR56	<i>Burkholderia cepacia</i>	Criollo rojo		X
P5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	QPM	X	X
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM	X	
P14	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	QPM		X
P17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM	X	X
P27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	QPM		X
P28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM		X
P32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM	X	X
P36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	QPM		X
P45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM		X
P46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	QPM		X
T19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Teocintle		X
T36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Teocintle		X
T42	<i>Pseudomonas luteola</i>	Teocintle		X
TRZ1-Az	<i>Azospirillum</i>	Teocintle		X

El género bacteriano que presentó mayor frecuencia antagónica hacia los hongos fue *Pseudomonas* con trece cepas: dos de la especie *P. luteola*, tres son *P. aeruginosa* y ocho pertenecen a *P. fluorescens* (Cuadro1).

Cinco cepas del género *Burkholderia* también disminuyeron el desarrollo de *Fusarium* entre ellas dos bacterias identificadas como *B. gladioli*, y las tres restantes son clasificadas como *B. cepacia*. Este género ha sido reconocido por su potencial como control biológico, debido a la producción de metabolitos secundarios como cepacina, pirrolnitrina, anteridina y otros compuestos aun no identificados (Parra *et al.*, 2009). Lo encontrado va de acuerdo a lo reportado por Bravo y Guigón (2014) quienes señalan que después de *Bacillus*, los géneros más estudiados y usados comercialmente son *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

Además, tres bacterias identificadas como *Ochrobactrum anthropi* también fueron efectivas contra *Fusarium* spp., de acuerdo a la literatura este género bacteriano se encuentra en suelo, plantas y su rizósfera, también se ha reportado a la especie *O. haematophuillum* como BPCV por su producción de sideróforos, síntesis de AIA, además de sus actividad antifúngica (Bathe *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012). Este género se ha empleado en la biorremediación de pesticidas (Qiu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012).

Dos cepas de la especie *Azospirillum brasilense* también presentan este carácter antagónico, mientras que se encontró solo un representante de las especies *Chryseobacterium indologenes*, *Ralstonia pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Cuadro1).

Las cepas: CA35, CA39, P36 y T36 de la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y que tuvieron efecto antagónico sobre los hongos, fueron caracterizadas por medio de tinción de Gram, Oxidasa-catalasa y a través de pruebas bioquímicas con el Sistema API 20E y 20NE, junto con sus pruebas complementarias como la oxido-fermentativa (O-F). Estas bacterias son Gram negativas, solo la cepa CA35 fue catalasa positivo, mientras que las cepas CA39 y T36 son oxidasa positivo así como oxido-fermentativas. Ninguna de las bacterias es móvil.

Los resultados obtenidos a través del software apiwebTM de Biomerieux sugieren que la cepa CA35 corresponde a *Pseudomonas luteola* en 99%, mientras que P36 y T36 pertenecen *Ochrobactrum anthropi*, para la cepa CA39 no se definió claramente la especie a la que pertenece, ya que puede ser *Ochrobactrum anthropi* o *Pseudomonas fluorescens*, según la información obtenida por el software.

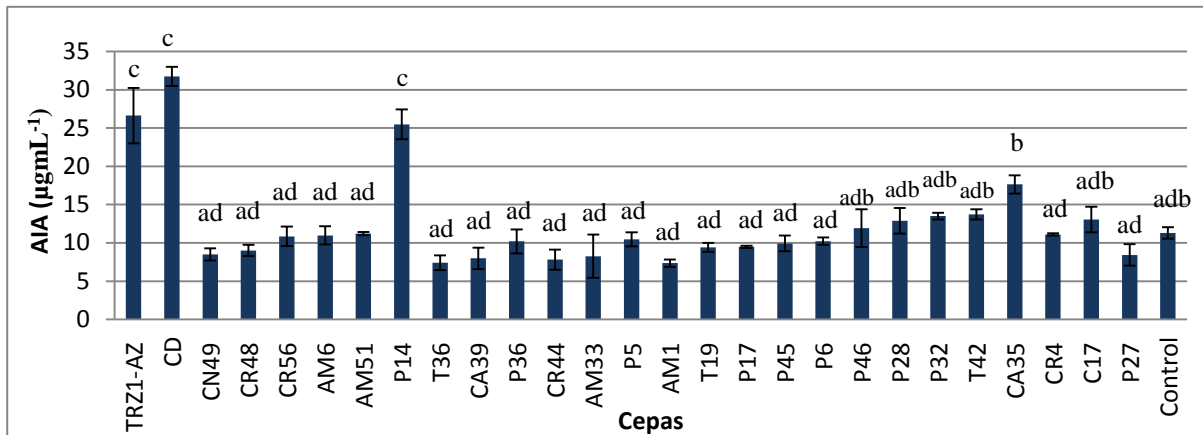


Figura 9. Producción de índoles totales por cepas bacterianas, inoculadas en caldo de soya y tripticaseína (CST).

En cuanto a la producción de índoles totales por las cepas seleccionadas con efecto antagónico contra *Fusarium* sp. señalan que todas las bacterias estudiadas producen AIA en diferentes concentraciones, desde 7.3 µg mL⁻¹ en el caso de la cepa AM51 de la especie *Pseudomonas fluorescens* hasta 31.74 µg mL⁻¹ por *Azospirillum brasilense* Cd (Figura 9). En relación a la producción de índoles totales, se han reportado valores para *Azospirillum* que varían de 2 hasta 49.66 µg mL⁻¹ (Carcaño *et al.*, 2006), lo que coincide con lo registrado para las dos cepas Cd y TRZ1-Az, pertenecientes a este género.

También se determinó que la síntesis de índoles de *Chryseobacterium indologenes* cepa P14 (25.49 µg mL⁻¹) no tiene diferencias significativas con *A. brasilense* cepas Cd y TRZ1-Az (31.74 y 26.64 µg mL⁻¹ respectivamente) ver Cuadro 2.

La concentración de índoles totales registrada entre las especies de *Burkholderia* no presentó variación significativa ($p \leq 0.05$) y los valores encontrados 8.49 y 11.22

$\mu\text{g mL}^{-1}$ y están dentro de lo reportado (5.93 y 21.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en otros estudios (Hernández *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Producción de índoles totales de bacterias aisladas de maíz.

Clave de la cepa	Especie	Índoles totales	
		($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
TRZ1-Az	<i>Azospirillum brasilense</i>	26.64 ± 3.62	c
Cd	<i>Azospirillum brasilense</i>	31.74 ± 1.25	c
CN49	<i>Burkholderia cepacia</i>	8.49 ± 0.79	ad
CR48	<i>Burkholderia cepacia</i>	9.00 ± 0.73	ad
CR56	<i>Burkholderia cepacia</i>	10.85 ± 1.28	ad
AM6	<i>Burkholderia gladioli</i>	10.98 ± 1.19	ad
AM51	<i>Burkholderia gladioli</i>	11.22 ± 0.21	ad
P14	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	25.49 ± 1.95	c
T36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	7.41 ± 0.95	ad
CA39	<i>O. anthropi</i> o <i>P. aeruginosa</i>	7.98 ± 1.40	ad
P36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	10.19 ± 1.57	ad
CR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.81 ± 1.33	ad
AM33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.25 ± 2.83	ad
P5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.45 ± 0.92	ad
AM1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7.35 ± 0.48	ad
T19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9.42 ± 0.59	ad
P17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9.49 ± 0.15	ad
P45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9.93 ± 1.03	ad
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.22 ± 0.49	ad
P46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11.93 ± 2.46	adb
P28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12.88 ± 1.67	adb
P32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13.50 ± 0.45	adb
T42	<i>Pseudomonas luteola</i>	13.72 ± 0.68	adb
CA35	<i>Pseudomonas luteola</i>	17.64 ± 1.19	b
CR4	<i>Ralstonia pickettii</i>	11.11 ± 0.13	ad
C17	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	13.04 ± 1.67	adb
P27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8.43 ± 1.40	ad
Control	Control	11.30 ± 0.76	adb

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

Las bacterias *O. anthropi* (T36, CA39 y P36) tienen una producción semejante de índoles totales entre ellas, así como también a las de *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *R. pickettii* y *S. maltophilia*.

Las bacterias del genero *Pseudomonas* sintetizan índoles totales entre 7.35 y 17.64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, encontrándose diferencias significativas en algunas cepas de *P. fluorescens* (P46, P28 y P32) y *P. luteola* (T42 y CA35) con respecto de las demás cepas.

La concentración de índoles totales en *S. paucimobilis* es similar estadísticamente a algunas cepas de *P. fluorescens* y *P. luteola* (Cuadro 2).

Se ha observado que la síntesis de índoles varía incluso entre cepas de la misma especie (Carcaño *et al.*, 2006), tal como fue observado en este trabajo, pero hay que tener en cuenta que la biosíntesis de las auxinas también varía en respuesta a estímulos ambientales, tales como la luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes, es decir la biosíntesis tiene respuestas flexibles a diversos estímulos endógenos y exógenos (Sauer *et al.*, 2013).

Con ayuda de la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), se determinó la presencia de ácido fenilacético (PAA) en los metabolitos sintetizados por las 27 bacterias antagónicas de *Fusarium* sp., solo 16 presentaron un corrimiento próximo al del fenilacético comercial con $R_f=0.76$.

Por la intensidad de las marcas que se distinguen en la separación de compuestos, es notorio que las cepas AM51, CN49 y P14 posiblemente sintetizan ácido fenilacético en mayor concentración (Cuadro 3).

La actividad antagónica hacia el hongo *Fusarium* spp. homólogo y heterólogo de maíz, la síntesis de índoles totales y de PAA, fueron las características que llevaron hacia una segunda selección de cepas bacterianas (AM51, CN49, P14, AM6, P6 y CR44) para determinar en ellas la síntesis de metabolitos secundarios en el medio de cultivo Jean Patriquin, recomendado para determinar la producción de compuestos tipo auxínicos, hecho a base de sales minerales, ácido succínico, fructuosa y triptófano.

Cuadro 3. Producción de ácido fenilacético por las cepas bacterianas que tuvieron efecto antagónico contra *Fusarium* spp.

Clave	Especie	PAA
AM1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++
AM33	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
AM51	<i>Burkholderia gladioli</i>	+++
AM6	<i>Burkholderia gladioli</i>	++
C17	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
CA35	<i>Pseudomonas luteola</i>	-
CA39	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	++
CD	<i>Azospirillum brasilense</i>	++
CN49	<i>Burkholderia cepacia</i>	+++
CR4	<i>Ralstonia pickettii</i>	++
CR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++
CR48	<i>Burkholderia cepacia</i>	+
CR56	<i>Burkholderia cepacia</i>	+
P14	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	+++
P17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++
P27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
P28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+
P32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
P36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-
P45	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
P46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
P5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
T19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
T36	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	+
T42	<i>Pseudomonas luteola</i>	-
TRZ1-AZ	<i>Azospirillum brasilense</i>	++

Se observó que la síntesis de AIA se llevó a cabo en ambos medios de cultivo (CST y Jean Patriquin), sin embargo, la mayor producción de este metabolito del tipo auxínico se presentó cuando los microorganismos fueron propagados en CST, en todas las cepas de estudio (Figura 10). La eficiencia de diferentes rizobacterias para la producción de auxinas se ve afectada por el medio de cultivo, según lo reportado en diversos estudios, por ejemplo en presencia o ausencia de triptófano (Carcaño *et*

al., 2006; Tsavkelova *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2011); por lo que la síntesis de AIA se llevó a cabo en ambos medios, debido a que fueron suplementados con el precursor, como se ha observado en algunas especies de *Azospirillum* y *Pseudomonas*, donde las condiciones de cultivo como pH, presencia o ausencia del precursor, así como su concentración, afectan la producción de índoles (Cassan *et al.*, 2013).

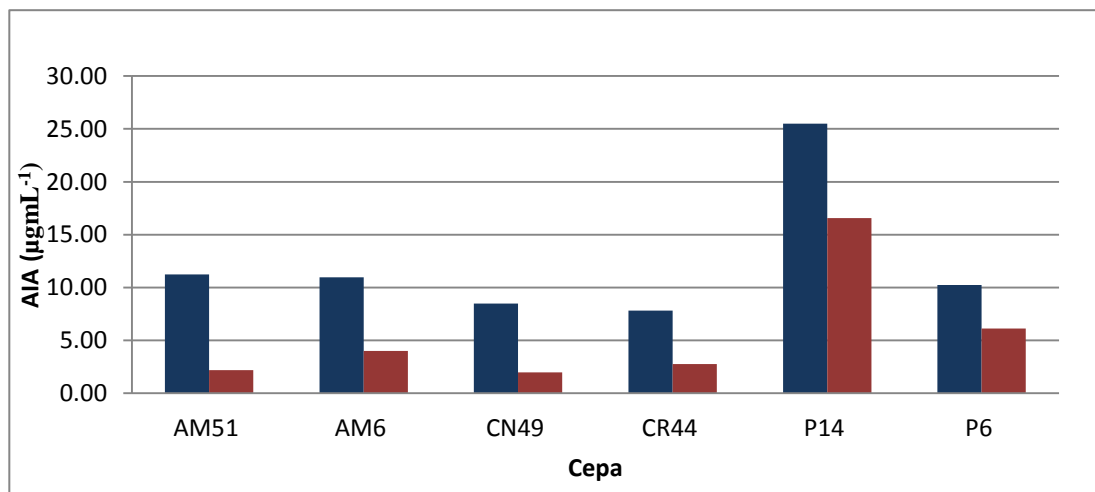


Fig. 10. Comparación de la síntesis de índoles totales de cepas bacterianas propagadas en medio Jean Patriquin (JP), barras color rojo y caldo de soya y tripticaseína (CST), barras color azul.

Los datos obtenidos a partir de la lectura al espectrofotometro muestran que el medio de Jean Patriquin es propicio para la sintesis de indoles, sin embargo se obtienen mejores resultados en cuanto a la concentracion de acidos indolicos en CST, la produccion de los dos medios es diferente significativamente para todas las cepas, excepto para *Chryseobacterium indologenes* (P14), ver Cuadro 4.

Sajid *et al.* (2011), llegana a la conclusion de que la composicion del medio esta usualmente relacionado con la biosintesis de antibioticos, por lo tanto su funcion es la provicion de nutrientes y precursores al cultivo de los microorganismos. Este estudio apoya la idea de que la composicion del medio impacta significativamente en la sintesis de compuestos metabolicos secundarios, como el AIA y el PAA.

Cuadro 4. Concentración de indoles totales y desviación estándar sintetizado por bacterias antagonicas de maíz reproducidas en caldo de soya y tripticaseina (CST) y Jean Patriquin (JP).

Clave	Especie	CST	JP
		AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
AM6	<i>Burkholderia gladioli</i>	10.98 \pm 1.19 a	3.99 \pm 0.10 b
AM51	<i>Burkholderia gladioli</i>	11.22 \pm 0.21 a	2.17 \pm 0.63 b
CN49	<i>Burkholderia cepacia</i>	8.49 \pm 0.79 a	1.97 \pm 0.79 b
CR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.81 \pm 1.33 a	2.75 \pm 0.44 b
P14	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	25.49 \pm 1.95 a	16.56 \pm 1.04 a
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.22 \pm 0.49 a	6.12 \pm 0.54 b

Letras minúsculas diferentes entre columnas representan diferencias significativas ($p < 0.05$)

El ácido fenilacético no se percibe en todos los extractos cuando las bacterias son crecidas en medio Jean Patriquin, excepto en dos cepas del género *Burkholderia* (AM51 y CN49), según lo que se observa en la cromatografía de capa fina (Figura 11).

La vía de síntesis de PAA no está bien definida. Sin embargo, se ha reportado que la presencia o ausencia del ácido fenilacético y otros metabolitos secundarios dependen de los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Hwang *et al.*, 2001; Slininger *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004). Por ejemplo la cepa de *Enterobacter cloacae* produce altas concentraciones de PAA y tirosol cuando se desarrolla en Caldo de Maltosa Sabouraud, en contraste cuando se cultiva en medio líquido mínimo, estos compuestos no son detectables, por lo tanto sugieren que las cualidades de control biológico puede cambiar con el medio de cultivo utilizado para el crecimiento celular (Slininger *et al.*, 2004).

Además la presencia de PAA podría estar influenciada por la especie y cepas bacterianas como se muestra en la figura 11; las bacterias del género *Pseudomonas* y *Burkholderia* sintetizaron PAA en CST, ninguna sintetiza en medio JP.

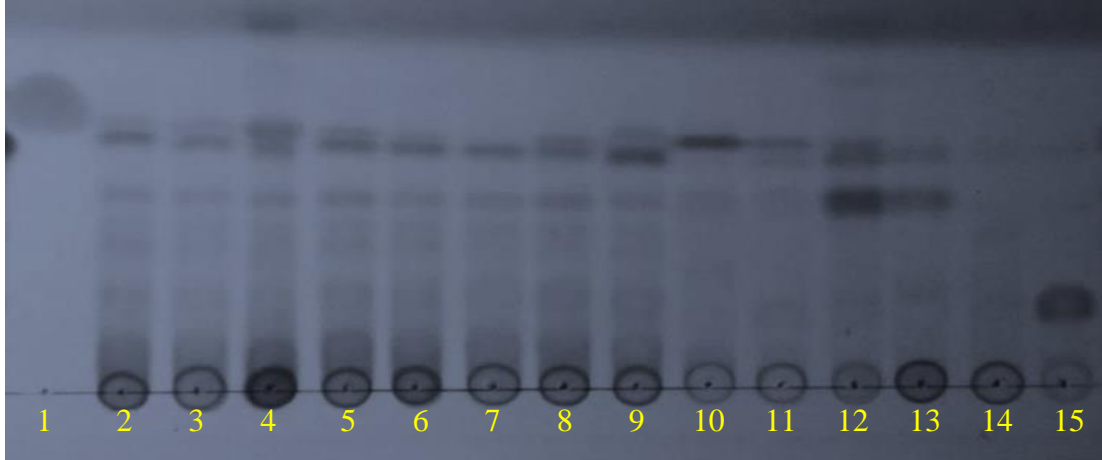


Figura 11. Placa de sílica con corrimiento de extractos bacterianos propagados en CST: 1)Ácido fenilacético, 2)*Burkholderia gladioli* (AM51), 3)*Burkholderia cepacia* (CN49), 4)*Chryseobacterium indologenes* (P14), 5)*Ralstonia pickettii* (CR4), 6)*Burkholderia gladioli* (AM6), 7)*Pseudomonas fluorescens* (P6), 8)*Pseudomonas aeruginosa* (CR44), 9)*Azospirillum brasilense* (Cd). Y extractos propagados en JP: 10)AM51, 11)CN49, 12)P14, 13)AM6 , 14)P6, 15)CR44.

En la prueba de sanidad de semillas se utilizaron los extractos metabólicos de las bacterias CN49, AM51, AM6 y P6 para evidenciar su efecto sobre la patogenicidad de los hongos del género *Fusarium*, estas cepas fueron seleccionadas por la síntesis de PAA y su antagonismo contra un hongo homologa a maíz, principalmente.



Figura 12. Síntoma 1 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Fusarium* sp.



Figura 13. Síntoma 2 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Acremoniella* spp.

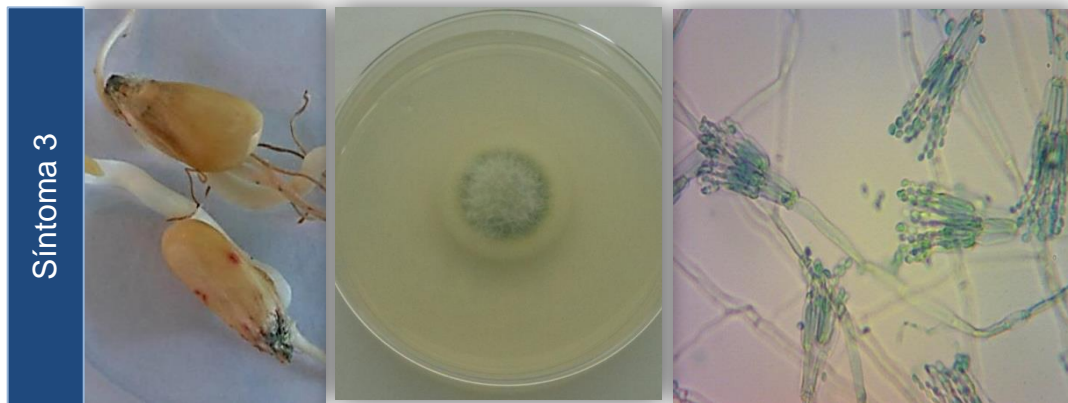


Figura 14. Síntoma 3 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Penicillium* spp.

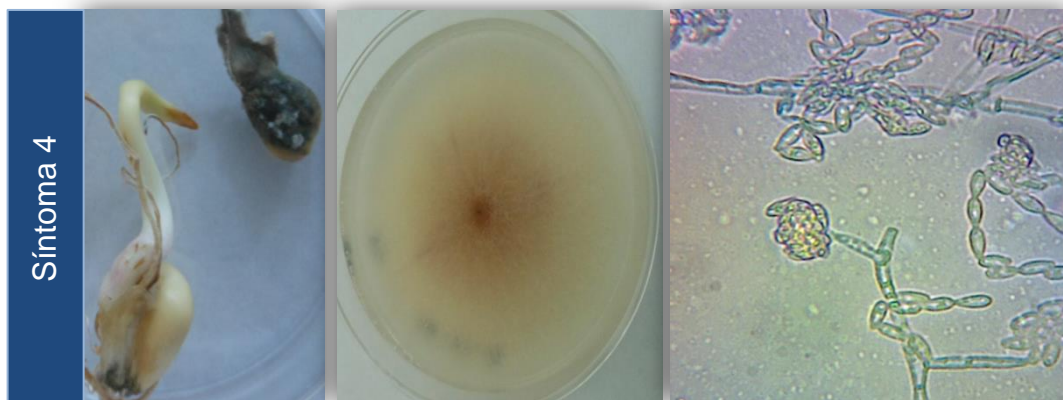


Figura 15. Síntoma 4 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Acremonium* spp.

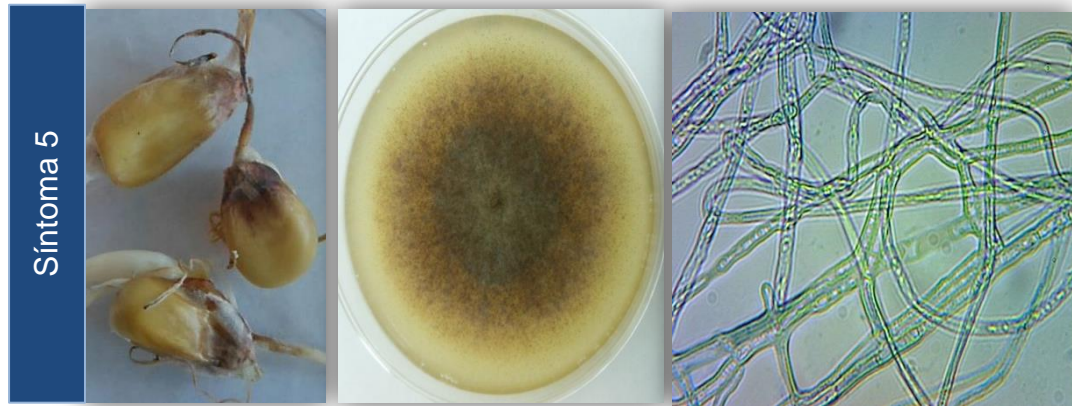


Figura 16. Síntoma 5 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: No identificado.

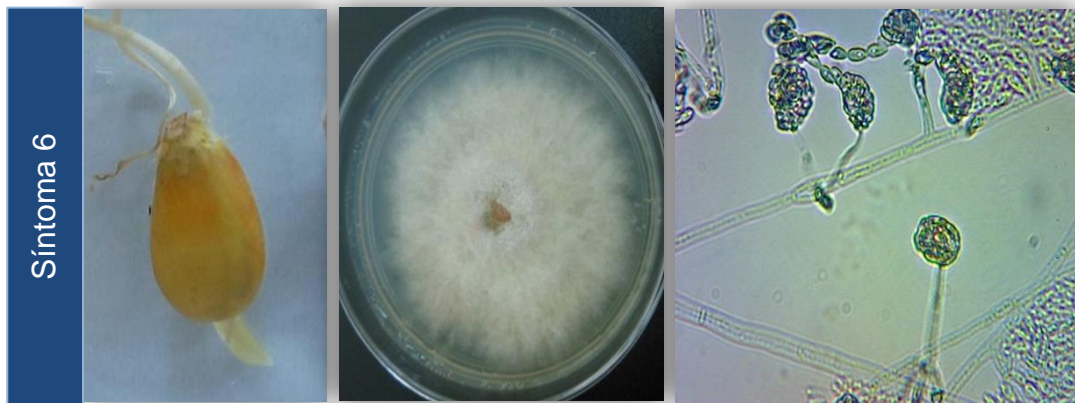


Figura 17. Síntoma 6 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Monilia* sp.

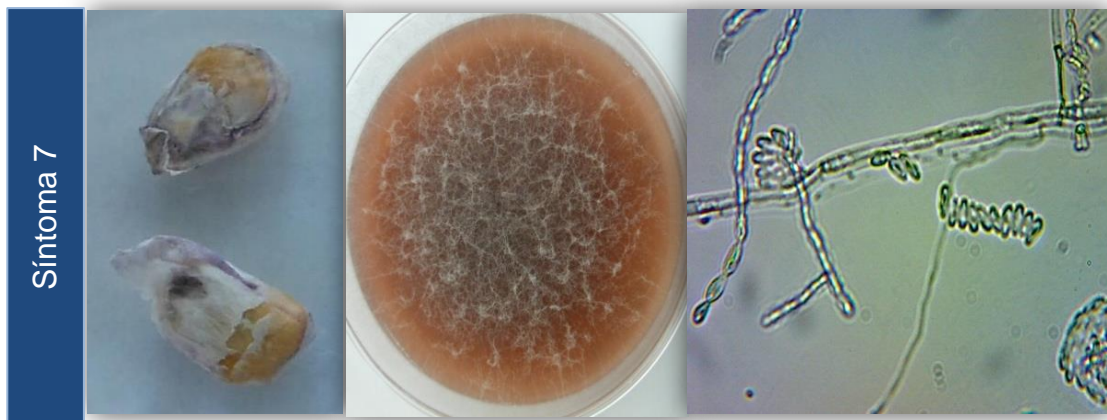


Figura 18. Síntoma 7 en semillas de maíz, desarrollo del crecimiento fúngico y aspecto microbiológico de agente etiológico: *Fusarium* sp.

Al determinar la presencia de desarrollo fúngico sobre las semillas de maíz se clasificaron los síntomas distintivos en cuanto a su color y textura. Fue posible identificar al menos siete síntomas (Figuras 12 a la 18), además se observó que más de un hongo infectaba a las semillas de maíz por tal motivo, la mezcla de hongos infectantes fue caracterizado como un síntoma diferente. También se cuantifico el número de semillas que no presentaban ningún hongo patógeno y las semillas que no germinaron.

Se identificaron seis hongos procedentes de las semillas infectadas y un hongo que no fue posible identificarlo ya que no se observaron estructuras características para su identificación microscópica. Se estableció con ayuda de claves taxonómicas la presencia del género *Fusarium* spp.

Las semillas de maíz son portadoras de una microbiota, que puede afectar la producción de los cultivos, y *Fusarium* spp. es un hongo que ataca a las plantas en todas las etapas de crecimiento, desde semillas. Los patógenos transmitidos por los granos de maíz pueden ser identificados a través de pruebas de sanidad de semillas, para proporcionar información acerca de la calidad de las estas respecto a la presencia o ausencia de microorganismos causantes de enfermedades. Esta técnica también resultó útil para identificar el efecto de los extractos metabólicos sobre la presencia o ausencia de hongos patógenos en granos de maíz.

En general el número de semillas germinadas aumento cuando fueron tratadas con los metabolitos bacterianos, esto pudo deberse a que dentro de los compuestos metabólicos sintetizados por las bacterias están las auxinas y otras fitohormonas, que estimulan la germinación de las semillas de acuerdo a lo reportado por Reyes *et al.*, (2008) que incrementó la germinación un 20% al inocularlas con *Azospirillum* sp.

Cuadro 5. Numero de semillas que presentan síntomas de infección por hongos, tratadas con metabolitos de cuatro cepas bacterianas *B. gladioli* (AM6), *B. cepacia* (CN49), *B. gladioli* (AM51), *P. fluorescens* (P6) y sus combinaciones.

Síntoma	Tratamiento										
	Control (%)	AM6 (%)	CN49 (%)	AM51 (%)	P6 (%)	AB (%)	AC (%)	AD (%)	BC (%)	BD (%)	CD (%)
SNG	42 (14)	20 (6.7)	13 (4.3)	12 (4)	13 (4.3)	17 (5.7)	34 (11.3)	14 (4.7)	6 (2)	8 (2.7)	11 (3.7)
1	10 (3.3)	25 (8.3)	5 (1.7)	8 (2.7)	16 (5.3)	2 (0.7)	6 (2)	9 (3)	4 (1.3)	9 (3)	9 (3)
2	172 (57.3)	82 (27.3)	185 (61.7)	147 (49)	97 (32.3)	173 (57.7)	131 (43.7)	197 (65.7)	181 (60.3)	172 (57.3)	109 (36.3)
3	6 (2)	89 (29.7)	14 (4.7)	22 (7.3)	18 (6)	5 (1.7)	38 (12.7)	4 (1.3)	3 (1)	13 (4.3)	42 (14)
4	6 (2)	1 (0.3)	3 (1)	1 (0.3)	-	7 (2.3)	6 (2)	3 (1)	8 (2.7)	5 (1.7)	5 (1.7)
5	12 (4)	10 (3.3)	19 (6.3)	13 (4.3)	37 (12.3)	1 (0.3)	11 (3.7)	10 (3.3)	6 (2)	4 (1.3)	27 (9)
6	1 (0.3)	-	-	1 (0.3)	-	1 (0.3)	3 (1)	1 (0.3)	-	-	-
7	8 (2.7)	-	3 (1)	14 (4.7)	4 (1.3)	8 (2.7)	10 (3.3)	5 (1.7)	5 (1.7)	12 (4)	5 (1.7)
1,2	7 (2.3)	5 (1.7)	5 (1.7)	11 (3.7)	2 (0.7)	4 (1.3)	7 (2.3)	6 (2)	3 (1)	9 (3)	13 (4.3)
1,6	1 (0.3)	9 (3)	1 (0.3)	-	1 (0.3)	-	1 (0.3)	-	3 (1)	-	2 (0.7)
2,3	1 (0.3)	7 (2.3)	2 (0.7)	-	1 (0.3)	-	9 (3)	1 (0.3)	3 (1)	6 (2)	10 (3.3)
2,4	2 (0.7)	-	-	1 (0.3)	-	3 (1)	-	2 (0.7)	6 (2)	-	1 (0.3)
2,5	7 (2.3)	1 (0.3)	-	2 (0.7)	2 (0.7)	1 (0.3)	4 (1.3)	8 (2.7)	3 (1)	4 (1.3)	13 (4.3)
2,6	3 (1)	-	-	-	1 (0.3)	6 (2)	3 (1)	2 (0.7)	7 (2.3)	-	-
2,8	13 (4.3)	-	1 (0.3)	5 (1.7)	2 (0.7)	20 (6.7)	4 (1.3)	5 (1.7)	3 (1)	5 (1.7)	1 (0.3)
3,5	7 (2.3)	-	1 (0.3)	1 (0.3)	-	-	-	2 (0.7)	2 (0.7)	-	21 (7)
2,3,5	1 (0.3)	-	-	-	-	-	1 (0.3)	-	1 (0.3)	1 (0.3)	4 (1.3)
TSl	257 (85.7)	229 (76.3)	239 (79.7)	226 (75.3)	181 (60.3)	231 (78)	234 (78)	255 (85)	238 (79.3)	240 (80)	262 (87.3)

SNG, semillas no germinadas; A, *B. gladioli* (AM6); B, *B. cepacia* (CN49); C, *B. gladioli* (AM51); D, *P. fluorescens* (P6); TSl, total de semillas infectadas.

En general se presentó una disminución en la infección fúngica cuando las semillas tuvieron contacto con metabolitos bacterianos, excepto para los tratamientos con *Burkholderia gladioli* y *P. fluorescens* (cepas AM6-P6 y AM51-P6). La cepa de *P. fluorescens* P6, fue la que obtuvo la mayor cantidad de semillas sin contaminación fúngica, los estudios con rizobacterias señalan a esta especie como potente antagonista contra hongos como *F. oxysporum*, *A. alternata*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* sp., pero Trujillo *et al.* (2007). También de *P. capsici* produce metabolitos que evitan el desarrollo de los microorganismos fúngicos patógenos de arroz y maíz mencionados anteriormente (Hwang *et al.*, 2001).

El hongo que infectó mayor cantidad de semillas de maíz fue *Acremonium* spp., su presencia disminuyó con los extractos de AM6, P6 y su combinación (27.3%, 32.3% y 36.3%, respectivamente) ver cuadro 6.

La infección de *Penicillium* spp., disminuyó con la combinación de CN49-AM51 y AM6- P6. En cuanto a *Fusarium* sp. se redujo su presencia con AM6-CN49, CN49-AM51 y C49 (0.7%, 1.3% y 1.7%, respectivamente) estas cepas pertenecen a *B. gladioli* y *B. cepacia*, tal como otros estudios apoyan el hecho de que las bacterias de este género y sus extractos tienen efectos antagonistas contra *F. oxysporum*, *F. solani* y *Fusarium* sp., entre otros patógenos (Trujillo *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2009). En ensayos de la actividad antifúngica de cepas de *Burkholderia cepacia* frente a *F. solani* y *F. moniliforme* no se obtuvo inhibición de crecimiento, este fenómeno se le atribuye a la utilización de diferentes mecanismos en la elaboración de compuestos antifúngicos que actúan sobre sustancias químicas (enzimas) indispensables para hongos como *T. viride*, pero de las que carece *Fusarium* o posee rutas alternativas que evitan el bloqueo enzimático o bien transforman estas sustancias en otras formas que no sean tóxicas (Parra *et al.*, 2009). Además Trujillo *et al.* (2007) encontraron que tanto las cepas de *P. fluorescens* y *B. cepacia* y sus metabolitos activos ejercen efecto antagonista sobre *F. sp.*, *Curvularia* sp., *F. oxysporum* y *Alternaria* (Trujillo *et al.*, 2007).

La cepa que inhibió el crecimiento de *Fusarium* sp. en un 50% y que además se encontró la síntesis de PAA fue CN49. Somers *et al.* (2005), encontraron a través de

técnicas como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de gas-espectrometría de masas (GC-MS), que rizobacterias con actividad antifúngica hacia *F. oxysporum* f sp. *matthiolae*, *A. brassicicola* y *N. acrasa*, tienen actividad antimicrobiana por el ácido fenilacético. Y en otro estudio se observó que el aumento de la concentración de ácido fenilacético y otros compuestos inhibió la enfermedad por Phytophthora en plantas de pimiento en la etapa de primera rama (Hwang *et al.*, 2001).

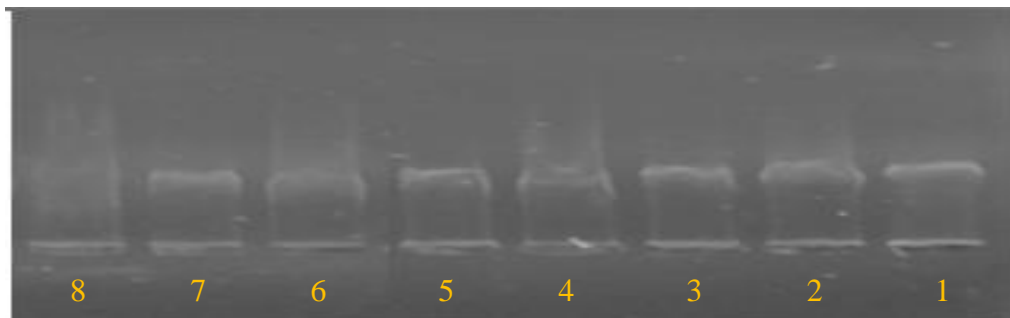


Figura 19. Gel de agarosa. Presencia de ADN de las bacterias: 1)Cd, 2)AM51, 3)CN49, 4)P14, 5)CR4, 6)AM6, 7)P6, 8)CR44.

Las técnicas moleculares hoy son una herramienta para la caracterización de microorganismos, e incluso para su identificación. En este trabajo se echó mano de técnicas como extracción de ADN, PCR y enzimas de restricción.

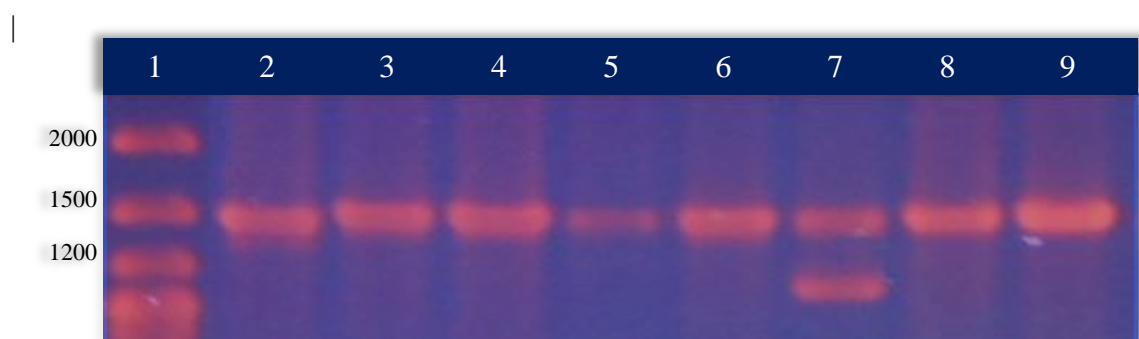


Figura 20. Amplificación del ADNr 16S de las siguientes cepas: 1)Marcador de peso molecular, 2)*Azospirillum brasilense* (Cd), 3)*Burkholderia gladioli* (AM51), 4)*Burkholderia cepacia* (CN49), 5)*Chryseobacterium indologenes* (P14), 6)*Burkholderia gladioli* (AM6), 7)*Pseudomonas fluorescens* (P6), 8)*Pseudomonas aeruginosa* (CR44), 9)*Ralstonia pickettii* (CR4).

Con la técnica de PCR fue posible amplificar el DNA ribosomal 16S, obteniendo una banda de aproximadamente 1500 pb (pares de bases) (Figura 20), excepto para la cepa P6 clasificada como *Pseudomonas fluorescens* de la cual se obtuvieron 2 bandas una de 1500 pb aproximadamente y la segunda de alrededor de 1200 pb. Al material genético amplificado se le realizó cortes con enzimas de restricción, para caracterizar a las cepas bacterianas que presentaron actividad antagónica contra el hongo *Fusarium* sp. y que además se demostró que son capaces de sintetizar ácido fenilacético.

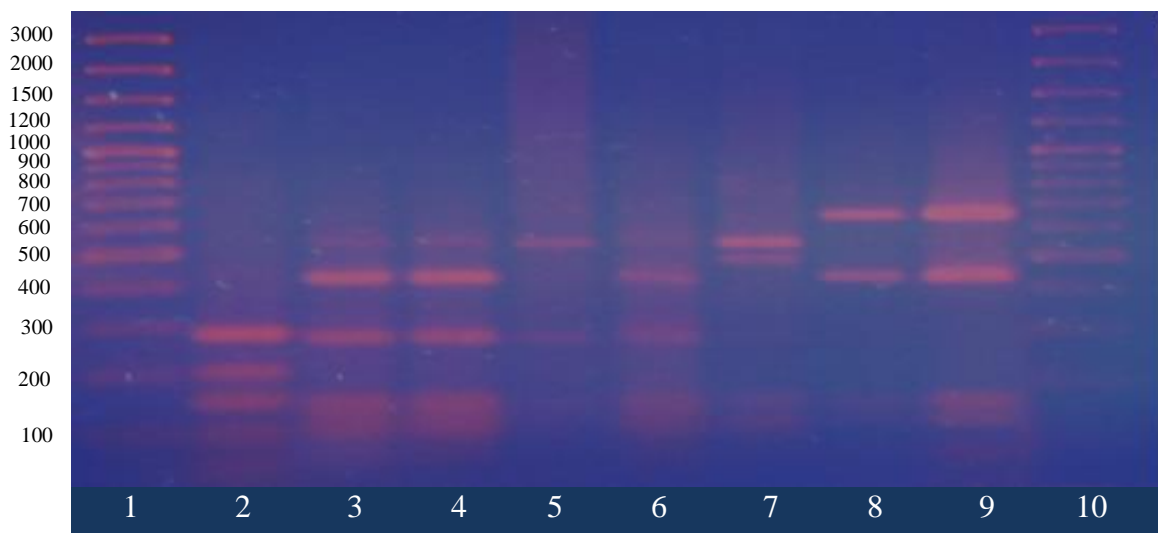


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 3%, digestión con la enzima Msp1. 1) Marcador de peso molecular, 2) *Azospirillum brasilense* (Cd), 3) *Burkholderia gladioli* (AM51), 4) *Burkholderia cepacia* (CN49), 5) *Chryseobacterium indologenes* (P14), 6) *Burkholderia gladioli* (AM6), 7) *Pseudomonas fluorescens* (P6), 8) *Pseudomonas aeruginosa* (CR44), 9) *Ralstonia pickettii* (CR4), 10) *Burkholderia cepacia* (CR56), 11) Marcador de peso molecular.

La enzima Msp1 generó cinco bandas en las cepas AM51, CN49 y P6 ya que pertenecen al mismo género, aunque sean de especies diferentes, sin embargo a pesar de que CR56 pertenece a *Burkholderia* los cortes no fueron del mismo tamaño que las anteriores. Las dos cepas del género *Pseudomonas* difieren en el número y el tamaño de los cortes con la enzima Msp1 (Cuadro 6 y figura 21).

Cuadro 6. Fragmentos (bp) obtenidos para los productos de PCR del gen 16S rDNA con la enzima Msp1.

Cepa	Especie	No. Bandas	Tamaño aproximado de fragmentos (bp)
Cd	<i>Azospirillum brasilense</i>	5	300, 200, 180, 100, <100
AM51	<i>Burkholderia gladioli</i>	5	550, 450, 300, 180, 100
CN49	<i>Burkholderia cepacia</i>	5	550, 450, 300, 180, 100
P14	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2	550, 300
AM6	<i>Burkholderia gladioli</i>	4	550, 450, 300, 180, 100
P6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	550, 500, 180,
CR44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	650, 440
CR4	<i>Ralstonia pickettii</i>	4	650, 440, 180, 140
CR56	<i>Burkholderia cepacia</i>	3	440, 300, 180

La caracterización bacteriana a través de PCR para la amplificación del gen 16S rDNA y la digestión con enzimas de restricción ayudaron a describir a las bacterias que pueden tener un efecto benéfico en el maíz.

8. CONCLUSIONES

Se caracterizaron 27 cepas bacterianas que pertenecen a las especies *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Chryseobacterium indologenes*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Ralstonia Pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Stenotrophomonas maltophilia* con actividad antifúngica sobre *Fusarium* sp.

Las 27 cepas bacterianas sintetizaron índoles totales entre $7.41 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $31.74 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las bacterias *A. brasilense* y *C. indologenes* son las que sintetizan mayor concentración de estos metabolitos bacterianos.

Las cepas de *B. gladioli*, *B. cepacia*, *C. indologenes*, *R. pickettii*, *O. anthropi*, *P. fluorescens* y *A. brasilense* sintetizan ácido fenilacético en caldo de soya y tripticaseína. Mientras que *B. gladioli* y *B. cepacia* también producen PAA en el medio Jean Patriquin.

Se observó que *B. cepacia* (CN49) actuó efectivamente disminuyendo el número de semillas infectadas y en 50% la infección por *Fusarium* sp., además es productora de índoles y ácido fenilacético en CST y JP.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahemad, M. y M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1): 1-20.
- Antoun H. 2013. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Barnner's Encyclopedia of Genetics*. 2nd edition vol. 5 pp: 353-355.
- Arbeláez A. 2000. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17:11-22.
- Bathe S., W. Achouack, A. Hartmann, T. Heulin, M. Schloter y M. Lebuhn. 2006. Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 272-280.
- Beneduzi A., A. Ambrosini y L. Passaglia. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):1044-1051.
- Bravo L. y C. Guigón. 2014. Control Biológico de enfermedades de plantas en México. *Control de enfermedades de plantas en América Latina y Caribe*. Bettiol, W., Rivera, M.C., Mondino, P., Montealegre, J.R., Colmenárez, Y.C. (Eds.) 265-285.
- Brimecombe M.J., De Leji F.A.A.M. y J.M Lynch. 2007. Rhizodeposition and microbial populations. En Pintor R., Veranini Z. y Nannipieri P. (Eds.). *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York, USA: Taylor y Francis Group.
- Camelo M., S.P. Vera y R.R Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12(2): 159-166.
- Cassan F., J. Vanderleyden y S. Spaepen. 2013. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal Plant Growth Regulation* 33: 440-459.
- Compant S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement y E. Ait Barka. 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.

- Campitelli, P., A. Aoki, O. Gudelj, A. Rubenacker y R. Sereno. 2010. Selección de indicadores de calidad del suelo para determinar los efectos del uso y prácticas agrícolas en un área piloto de la región central de Córdoba. *Ciencia del Suelo* 28(2):223-231
- Carcaño M.G., R. Ferrera, J. Pérez, Y. Bashan y J.D. Molina. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos, y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24(4):493-502.
- Carrillo L. 2003. *Microbiología Agrícola*. Editorial Universidad de Salta ISBN 978-9381-16-5. <http://www.unsa.edu.ar/matbib>
- Celis L.J. y I. R. Gallardo. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Tesis Facultad de ciencias microbiología agrícola y veterinaria Bogotá. Pontifica Universidad Javeriana.
- De la Torre M.E., D. Sánchez, E. Galeana y J. Plasencia. 2014. Fumonisin – Síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides* – Maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas* 17(1): 77-91.
- FAO. s.f. Market Summary: MEXICO Maize (AMIS Statistics Source: FAO-CBS). Recuperado el 17 abril del 2015 de <http://statistics.amis-outlook.org/data/index.html#>
- Figuroa M.G., R. Rodríguez, B.Z. Aguilar, M.M. González, J.L. Pons, J.F. Jiménez, J.G. Ramírez, E. Andrio y M. Mendoza. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2):124-134.
- Fu J y S. Wang. 2011. Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*. 2(74):1-7
- Gaspar T., C. Kervers, C. Penel, H. Greeppinn. D.M. Reid y T.A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 32:272-289.
- Glickman E. y Y. Dessaux. 1994. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):793-796.
- Guigón C., V. Guerrero, F. Vargas, E. Carvajal, G.D. Avila, L. Bravo, M. Ruocco, S. Lanzuise, S. Woo. y M. Lorito. 2010. Molecular identification of *Trichoderma*

- spp. Strains, in vitro growth rate and antagonism against plant pathogen fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2):87-96.
- Haas D. y G. Défago. 2005. Biological controls of soil-borne pathogens by fluorescent Pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3:307-319.
- Hartmann, A., M. Schmid, D. V. Tuinen y G. Berg. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235-257.
- Hernández A., M. Heydrich, Y. Acebo, M.G. Velázquez y A.N. Hernández. 2008. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology* 39:180-186.
- Hwang B.K., S.W. Lim, B.S. Kim, J.Y. Lee y S.S. Moon. 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(8): 3739-3745.
- Ibáñez, C., S. Palomeque y F. Fontúrbel. 2004. Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del suelo. En Fontúrbel, F., C. Ibáñez y G. Abruzzese (eds.). *El recurso del suelo: Bases edafológicas, problemática, administración y contaminación*. Publicaciones Integrales. La Paz.
- Jankiewicz L.S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Mundi- Prensa México, S.A. de C.V. México. Pág. 15.
- Jiménez D. R. 2000. Interacciones Planta-hongo: Mecanismo de infección, patogénesis y resistencia. pp. 739-769. In Llancer G., M. López, A. Trapero & A. Bello (eds). *Patología vegetal*. España.
- Jordán M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología vegetal* (15).
- Lara C., Oviedo L.E. y Betancur C.A. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia tropical* 29(2): 187-194.
- Ludwig P. y Lucas Magalhaes. 2012. Hongos del suelo saprofitos y patógenos de plantas. *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. Moreira F., E. J. Huising y D. E. Bignell (Eds.). Pág. 243-278. México.

- Loredo O., L. López y V. Espinosa. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *TERRA Latinoamericana* 22:225-239.
- Manero J. y A. Lobo. 2000. Bacterias productoras de giberelinas y estimulantes de crecimiento vegetal.
- Mendoza Elos, M., E. Andrio Enríquez, A. López Benítez, R. Rodríguez Guerra, L. Latournerie Moreno y S.A. Rodríguez Herrera. 2006. Tasa de infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía mesoamericana* 17(1): 19-24.
- Molina M., J. C y L. Córdova T. (eds.). 2006. Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura: Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México.
- Narayanasamy, P. 2008. *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management*. Springer Science Business Media. New York. Pp.15.
- Narayanasamy, P. 2011. *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*. Springer Science Business Media. New York. pp1.
- Nihorimbere V, M. Ongena, M. Smargiassi y P. Thonart. 2011. Beneficial effect of the rizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(2):327-337.
- Ordaz F. 2014. Evaluación del sector agropecuario a través de la percepción de las comunidades locales. Un estudio de caso. Observación de la economía latinoamericana 197. Disponible en <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/do/2014/sector-agropecuario-dajabon.html>.
- Paliwal R.L., G. Granados, H.Renee Lafitte y A. D. Violic. 2001. *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Parra E., S. Centeno y Y. Araque. 2009. Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la sociedad venezolana de microbiología* 29:103-109.
- Pedraza, R.O. 2015. Siderophores production by *Azospirillum brasilense*: Biological importance, assessing methods and biocontrol activity. p 251-262. En: Cassán.

- Qiu X., W Bai, Q. Zhong, M. Li, F. He y B. Li. 2006. Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl parathion mineralizing activity. *Journal of Applied Microbiology* 101:986-994.
- F.D., Y. Okon y C, M, Creus (Editores). *Handbook for Azospirillum*. Springer International Publishing. Zwitterland.
- Rada A., G. Taboada. 1998. Método de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. *BIOFARBO* 5: 63-68.
- Reyes I., L. Álvarez, H. El-Ayoubi y A.Valery. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *BIOAGRO* 20(1):37-48.
- Robles, Sánchez R. 1986. *Producción de granos y Forrajes*. Ed. Limusa S.A. de C.V. Cuarta edición, segunda reimpresión, México pp. 81.
- Rodas A. 2006. La agricultura y microorganismos. Artículo en línea disponible en <http://www.engormix.com/MA-agricultura/cultivos-tropicales/articulos/la-agricultura-y-microorganismos-t1129/078-p0.htm>.
- Rodríguez M.P. 2001. Biodiversidad de hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana* 1:53-78.
- Sajid I., K.A. Shaaban, S. Hasnain. 2011. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces malachitofuscus* CTF9. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:592-604.
- Sarabia M., R. Madrigal, M. Martínez, Y. Carreón. 2010. Plantas, hongos micorrizicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12(1):65-71.
- Sauer M S. Robert, y J. Kleine-Venh. 2013. Auxin: simply complicated, *Journal of Experimental Botany* 64(9): 2565-2577.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2014). Cierre de producción agrícola por cultivo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: México. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- Slininger P.J., K.D. Burkhead y D.A. Schisler. 2004. Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, índole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 31:517-524.

- Somers E., D. Ptacek, P. Gysegom, M. Srinivasan y J. Vanderleyden. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):1803-1810.
- Trapero A. 2000. Hongos fitopatógenos. In Llancer G., M. Lopez, A, Trapero & A. Bello (eds). *Patología vegetal*. España. pp. 713-738
- Trujillo I., A. Díaz, A. Hernández y M. Heydrich. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y del maíz. *Revista Protección Vegetal* 22(1): 41-46.
- Tsavkelova E, S. Klimova, T. Cherdyntseva y A. Netrusov. 2006. Microbial Producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42(2): 117-126.
- Villarreal V. T. 2012. Inoculación combinada de hongos micorrizico-arbusculares y *Azospirillum* spp. en plántulas de banano (*Musa paradisiaca*) micropropagadas: efecto sobre el desarrollo y crecimiento durante la fase de aclimatación. Tesis Ingeniería en biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Warham, E.J., L.D. Butler y B.C. Sutton. 1998. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo. CIMMYT. México. D.F. 84p.
- Zhao L., S. Teng y Y. Liu. 2012. Characterization of versatile rhizospheric organism from cucumber identified as *Ochrobactrum haematophilum*. *Journal of Basic Microbiology* 52:232-244.
- Zúñiga O. M. 2009. Crecimiento de *Bacillus pumilus* productor de la auxina ácido indol acético, como base para formular un biofertilizante en polvo. Tesis ingeniería de alimentos. Universidad Austral de Chile.