

## Pruebas de antibiosis de rizobacterias contra hongos fitopatógenos *in vitro*

Antonio de Jesús Ramírez Frías<sup>1</sup>, Lucero Alejandra González Tejeda<sup>1</sup>, Luis Ernesto Flores Zelocuahtecat<sup>1</sup>, Blanca Estela Gómez Luna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Ingeniería en Biotecnología  
adj.ramirezfrías@ugto.mx<sup>1</sup> la.gonzaleztejeda@ugto.mx<sup>1</sup> le.floreszelocuahtecat@ugto.mx<sup>1</sup> be.gomez@ugto.mx<sup>1</sup>

### Resumen

El cuidado de los cultivos agrícolas es una parte esencial en el proceso de producción y es por esto que los métodos para proteger a los cultivos de agentes patógenos se han vuelto más agresivos. Entre estos, los hongos son una de las principales amenazas. Para esto, el uso de rizobacterias resulta una alternativa atractiva más amigable con el ambiente, ya que además de crecer rápidamente, realizan diversas acciones beneficiosas en la planta, como sintetizar fitohormonas que facilitan el crecimiento de la raíz, secretar compuestos que mejoran la estructura del suelo, facilitar la captación de nutrientes y proteger a la planta contra patógenos.

En este estudio se confrontaron 3 hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp y *Alternaria* sp) contra 41 cepas de bacterias, todas las pruebas se realizaron en placa Petri medio PDA. Resultando en un total de 120 pruebas, en las cuales se realizó la medición de crecimiento del hongo con la bacteria presente en el mismo medio, para después obtener una cinética de crecimiento ponderada y se seleccionaron aquellas bacterias con más índice de inhibición fúngica.

**Palabras clave:** *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp, inhibición.

### Abstract

The care of agricultural crops is an essential part of the production process, which is why the methods to defend vegetables have become more aggressive against unwanted organisms. Among these, fungi are one of the main threats. For this, the use of rhizobacteria is an attractive alternative, since in addition to growing rapidly, they perform various beneficial actions on the plant, such as: synthesize phytohormones that facilitate root growth, secrete compounds that improve soil structure, facilitate nutrient uptake, and protect the plant against pathogens.

In this study, 3 phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp and *Alternaria*) were compared against 41 strains of bacteria, all tests were performed in PDA medium Petri dish. Resulting in a total of 120 tests, in which the growth of the fungus was measured with the bacteria present in the same medium, to later obtain a weighted growth kinetics and those bacteria with the highest rate of fungal inhibition were selected.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, inhibition.

### Introducción

Una causa importante de pérdidas de cosechas en México y el mundo es la pudrición de cultivos pre y post cosecha por hongos, que causan desde putrefacción de raíces y tallos hasta pudrición de frutos contaminados una vez ya cosechados. Estas pérdidas son variables año con año y han estado en función de las condiciones climáticas, manejo del cultivo y control químico y biológico utilizado, llegando en algunos casos a alcanzar pérdidas del 100%, como es el caso del estado de Guanajuato donde la pudrición blanca del ajo puede ocasionar pérdidas del 100% .

México es un país megadiverso, tanto en climas como en ecosistemas, por lo que los requerimientos edafoclimáticos son los óptimos para el cultivo a gran escala de una gran variedad de especies vegetales. Asimismo, el sector agrícola del estado de Guanajuato ha incrementado en los últimos años, teniendo un ritmo de crecimiento de 4.23% respecto al del sector nacional, el cual fue de 2.64%. La participación en el PIB agroalimenticio nacional entre el periodo 2010-2019 fue de 5.25%, posicionándose en el quinto lugar a nivel nacional (INEGI, 2020).

Guanajuato destaca en la producción de productos agrícolas como maíz grano, cebada, avena forrajera, trigo grano, chile verde, fresa, tomate rojo y otras más (SIAP, 2018). No obstante, entre el periodo 2019-2020 se registró a nivel nacional una disminución en los volúmenes de producción de la gran mayoría de los cultivos, como se aprecia en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Variación de producción de cultivos entre el periodo 2019-2020

Cultivo	Producción en 2020 (toneladas)	Producidos en 2019 (toneladas)	Variación (%)
Avena grano	18 349	17 781	3.194
Cebada grano	332 780	410 944	-19.021
Chile verde	1 108 168	1 167 360	-5.071
Fresa	425 007	585 835	-27.453
Maíz grano	8 307 866	8 758 364	-5.144
Tomate rojo	1 279 336	1 397 515	-8.456
Trigo grano	2 805 631	3 148 261	-10.883

Esto anterior se puede explicar por el impacto que tuvo la pandemia de COVID-19, ya que este sector fue fuertemente afectado en América Latina por la escases de mano de obra y la falta de liquidez hacia los productores (FAO & CEPAL, 2020). Además, otros factores limitantes en el rendimiento de estos son las enfermedades causadas por diversos factores bióticos y abióticos. Dentro de las enfermedades causadas por patógenos, destacan las producidas por los géneros: *Fusarium* spp., de la cual deriva la especie *Fusarium oxysporum* y *Alternaria*.

### *Fusarium* spp.

Es un hongo fitopatógeno perteneciente a la clase *Sordariomycetes*, al Orden *Hypocreales* y a la familia *Nectriaceae*. Tiene una distribución cosmopolita y es endémico de zonas maiceras presentes en todo el mundo. En México, su presencia y daños al maíz ha sido reportado en los estados de Tamaulipas, Chiapas, Durango y Guanajuato (Figueroa, y otros, 2010; Moreno, 1996).

Se considera de interés agrícola debido a que causa enfermedades a un gran número de especies vegetales diferentes y se encuentra distribuido en las partes aéreas y subterráneas de la planta, así como en sus restos (Booth, 1971; Burgess, 1981). Además, produce clamidosporas resistentes a condiciones adversas, permitiendo al hongo sobrevivir por periodos prolongados en el suelo. *Fusarium* spp. requiere de climas húmedos y calurosos para su desarrollo, favoreciendo la germinación de las esporas del hongo en heridas existentes en la superficie de la planta. En zonas donde la humedad es baja, la infección afecta únicamente al inóculo (Mokobi, 2020).

Sus daños desencadenan en el hospedante una serie de afecciones de carácter irreversible, en la mayoría de los casos. En presencia de raíces, las clamidosporas germinan y penetran en plantas susceptibles,

ingresando al xilema, tapando el tejido y reduciendo el movimiento del agua en estos. Produce toxinas que hacen que el follaje se vuelva amarillo. En semillas, el hongo invade y ocasiona manchas en la cubierta externa, disminuyendo el porcentaje de germinación por la muerte del embrión. En las plántulas y plantas adultas, genera inclinación en el tallo de la planta y, en etapas más avanzadas, marchitez y coloración café en el sistema vascular.

### *Fusarium oxysporum*

Esta especie proviene del género *Fusarium*, descrito anteriormente. Su presencia se ha descrito en un gran número de países y en México puede afectar a estados agrícolas como: Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Nayarit. Es un hongo ascomiceto y se encuentra en suelos y sustratos, lo que le permite ingresar por las raíces, infectándola (SENASICA, 2021).

Sobrevive en invierno en forma de esporas o micelio en el residuo de cultivos, pero también forma clamidosporas asexuales de paredes gruesas, resistentes a la deshidratación. La supervivencia puede ser a muy largo plazo y a mucha profundidad subterránea. Ocasiona amarillamiento en las hojas adultas de la planta hasta provocar su marchitez, cambios en la coloración de los haces vasculares con líneas de color café, rojo o amarillo a lo largo del tallo y su posterior debilitamiento. Además, genera pudrición en el tejido radicular.

### *Alternaria* sp

Es un hongo fitopatógeno perteneciente a la clase *Dothideomycetes*, al Orden *Pleosporales* y a la familia *Pleosporaceae*. Se ha reportado ampliamente su presencia alrededor de todo el mundo, ya que muchas de sus especies tienen una distribución cosmopolita (Fernández, 2015). Es saprofito y se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y materia orgánica en descomposición.

*Alternaria* requiere de condiciones altas de humedad y actividad de agua, pues la temperatura idónea para la esporulación oscila en los 25°C. No obstante, es capaz de crecer entre -3°C hasta 35°C, por lo que puede afectar a alimentos vegetales en condiciones de refrigeración o congelación. Respecto a la actividad de agua, su crecimiento es óptimo a valores de 0.99, con una mínima de 0.84.

Se caracteriza por su producción de conidios pardos que son capaces de diseminarse a través del viento, agua e insectos. Estos son capaces de colonizar la planta germinando e infectando las hojas, tallos o frutos, provocando lesiones que aumentan según el grado de infección. Este hongo causa destrucción del tejido vegetal a través de lesiones necróticas debido a la producción de metabolitos tóxicos para la planta (fitotoxinas).

Por décadas, los agricultores han combatido con el empleo de agroquímicos las diversas enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos con moderado éxito, sin embargo, el uso excesivo puede inducir el desarrollo de resistencia en los patógenos, a la vez que se generan residuos tóxicos en alimentos y medio ambiente; a raíz de ello, en años recientes se han realizado diversos estudios que proponen el empleo de otros microorganismos para combatir las enfermedades en plantas, como es uso de rizobacterias con propiedades antifúngicas para controlar hongos fitopatógenos.

Estos tres hongos mencionados afectan a un gran número de especies vegetales alrededor de todo el mundo, causando importantes pérdidas económicas. Debido a esto, en los últimos años se han estudiado diferentes propuestas más amigables con el ambiente, por esto por lo que este trabajo pretende evaluar la actividad antagónica de bacterias promotoras de crecimiento en planta contra estos hongos fitopatógenos.

## **Materiales y métodos**

El presente estudio se realizó en el laboratorio de investigación de la Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra de la sede Mutualismo y para las pruebas se contó con una colección de 40 bacterias aisladas anteriormente en el laboratorio. El material biológico de interés utilizado fue una colección de cepas bacterianas proveniente de una colección aislada de muestras de suelo tomadas en la zona radical de árboles de encino (*Quercus rugosa*) perteneciente al área natural protegida "El cerro del Culiacán" del estado de

Guanajuato (Coordenadas 20°22'00" latitud norte, 100°55'00" longitud oeste y altitud sobre el nivel del mar de 2,830 metros).

*Preparación del medio de cultivo PDA papa dextrosa agar*

Se preparó 1 L, se pesaron 200 g de papa cortadas en fragmentos pequeños, estos se hirvieron por 20 min en 1 L de agua, después se filtró, después se adicionaron 20 g de dextrosa y 20 g agar bacteriológico y se esterilizo 15 min a 121°C y 15 lb de presión.

*Pruebas de confrontación in vitro entre rizobacteria y hongo fitopatógeno*

Se colocó una rodaja con micelio del hongo fitopatógeno sobre el medio y se dejó crecer por 2 días a 28°C. Después se inoculó la bacteria y se incubó por 8 días más hasta apreciar la inhibición o el crecimiento del hongo como se aprecia en la Figura 1.



*Figura 1. Confrontación de Fusarium sp en medio PDA con rizobacteria.*

*Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial PICR*

Una vez que en la placa se apreciaba el crecimiento deseado de ambos organismos, se midió el radio desde el punto de inicio de desarrollo del hongo hasta donde finalizaba el micelio que se encontraba en dirección a la bacteria con ayuda de un vernier y se registraron las medidas en una hoja de Excel para el cálculo del porcentaje de inhibición.

$$PICR = \left( \frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$

Donde:

R1 es el crecimiento radial (mm) del hongo en el control.

R2 crecimiento radial (mm) del hongo en interacción con la bacteria.

Una vez obtenidos los resultados, con ayuda de la Tabla 2 se registraron las observaciones necesarias para determinar si la bacteria alteró el desarrollo del hongo.

**Tabla 2.** Escala cuantitativa de escalas antagónicas, modificada por (Bell, 1982)

Grado	Capacidad antagónica	% de inhibición equivalente
1	La bacteria detiene completamente el crecimiento radial del fitopatógeno, sin mantener contacto.	80-100%
2	La bacteria deforma el crecimiento radial del fitopatógeno, sin mantener contacto.	60-80%
3	La bacteria deforma el crecimiento radial del fitopatógeno, manteniendo contacto.	40-60%
4	El área radial del fitopatógeno comienza a cubrir parte de la bacteria.	20-40%
5	El fitopatógeno invade en su totalidad el espacio de la bacteria	0-20%

## Resultados y discusiones

A continuación, se muestran los resultados de las confrontaciones entre los hongos fitopatógenos y la colección bacteriana.

### *Fusarium oxysporum*

**Tabla 3.** Grados de inhibición de las cepas de rizobacterias contra *Fusarium oxysporum*.

Cepa	Medición	Grado de inhibición
101	8.2	60-80%
114	8	
264	8	
103	7.7	40-60%
111	7.2	
112	8.2	
112	8.2	
116	No hay medición	
203	8.2	
222	No hay medición	
225	7.4	
231	No hay medición	
263	8	
265	8.2	
317	7.5	
318	7.2	
106	No hay medición	20-40%
261	No hay medición	0-20%

De las 40 cepas iniciales, 17 fueron seleccionadas al final del estudio debido a que el resto presentaron contaminaciones que no hicieron posible evaluar su actividad antagónica. Las cepas 101, 114 y 264 fueron

capaces de inhibir el crecimiento del hongo, por lo que son potenciales candidatos de estudio para pruebas más avanzadas que permitan confirmar su actividad inhibitoria contra *Fusarium oxysporum*.

*Alternaria* sp

**Tabla 4.** Grados de inhibición de las cepas de rizobacterias contra *Alternaria* sp.

Cepa	Medición	Grado de inhibición	
253	6.44	80-100%	
263	6.94		
264	6.7		
305	5.8		
314	5.92		
314	5.92	60-80%	
101	5.24		
102	5.71		
103	6.75		
109	7		
114	7.2		
117	5.71		
225	6.8		
266	6.31		
304	7.8		
318	6.95	40-60%	
264	7.6		
275	7.4		
102	8.4		
111	6.61		
116	7.6		
123	6.23		
203	5.82		
207	7.6		
213	No hay medición		
222	7	20-40%	
266	7.4		
302	7.2		
106	5.42		
214	5.51		
231	7.32		
256	7.45		
303	9.4		
210	Dominó casi totalmente		0-20%
213	Dominó totalmente		
261	Dominó totalmente		

De las 40 cepas iniciales, se descartaron 4 cepas iniciales debido a que estas presentaron contaminaciones que no hicieron posible evaluar su actividad antagónica. Las cepas 253, 263, 264, 305 y 314 fueron capaces

de frenar el crecimiento del hongo, por lo que son potenciales candidatos de estudio para pruebas más avanzadas que permitan confirmar su actividad inhibitoria contra *Alternaria*.

*Fusarium* spp.

**Tabla 5.** Grados de inhibición de las cepas de rizobacterias contra *Fusarium* spp.

Cepa	Medición	Grado de inhibición
-	-	80-100%
317	6.63	60-80%
256	6.27	
206	5.67	
223	5.72	
263	5.03	
304	6.57 Contaminado	
101	6.25	40-60%
102	6.03	
111	6.1	
115	6	
117	5.68	
121	5.79	
207	5.72	
231	5.76	
264	6.04	
275	6.3	
302	6.56	
305	5.73	
308	6.22	
314	6.51	
203	6.42	20-40%
210	6.75	
214	6.37	
258	6.74	
266	6.28	
301	6.93	
106	7.26 Dominó casi totalmente	0-20%
112	6.56 Dominó casi totalmente	
213	4.49 Dominó casi totalmente	
222	7.06 Dominó casi totalmente	
303	7.63 Dominó casi totalmente	

De las 40 cepas iniciales, se descartaron 9 cepas iniciales debido a que estas presentaron contaminaciones que no hicieron posible evaluar su actividad antagónica. Debido al crecimiento lento de *Fusarium* spp., el estudio se extendió por más tiempo que los anteriores, sin embargo, ninguna de las cepas restantes fue capaz de detener completamente el crecimiento radial del fitopatógeno sin mantener contacto. No obstante,



las cepas 317, 256, 206, 223, 263 y 304 fueron capaces de deformar el crecimiento radial del hongo, lo que plantea la posibilidad de que estas tengan una leve capacidad inhibitoria contra *Fusarium* spp.

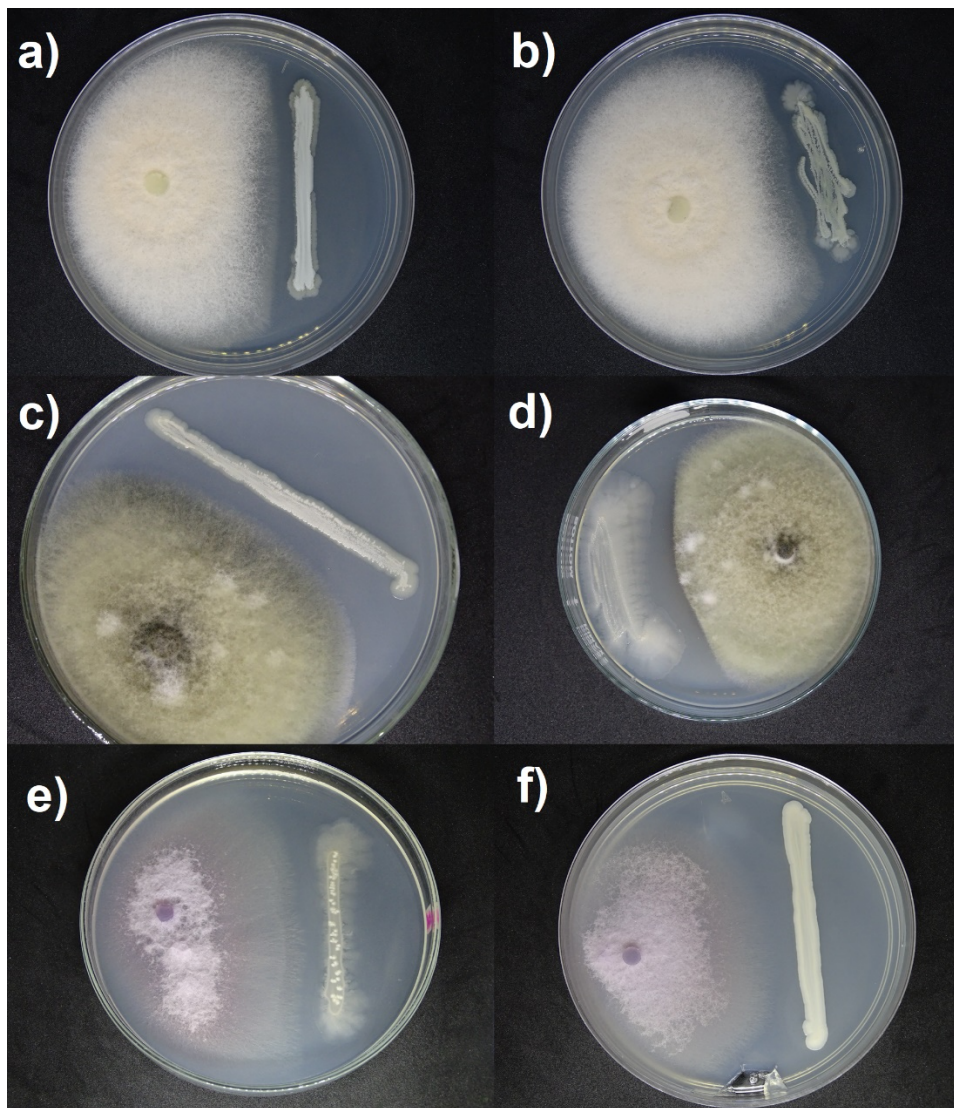


Figura 3. Fotografías de la capacidad antagonica de: *Fusarium oxysporum*, donde a) es la confrontación con la cepa 101 y b) es la confrontación con la cepa 114; *Alternaria* sp, donde c) es la confrontación con la cepa 109 y d) es la confrontación con la cepa 117; y *Fusarium* spp., donde e) es la confrontación con la cepa 117 y f) es la confrontación con la cepa 263. En cada una se puede observar la deformación del crecimiento radial en el hongo fitopatógeno.



En la Tabla 6, se muestran todas las cepas utilizadas en el presente trabajo, así como los hongos contra las que se les evaluó su capacidad antagonista:

**Tabla 6.** Cepas de rizobacterias empleadas contra qué hongo.

Cepa	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium spp</i>
101	✓	✓	✓
102	✗	✓	✓
103	✓	✓	✗
106	✓	✓	✓
109	✗	✓	✗
111	✓	✓	✓
112	✓	✗	✓
114	✓	✓	✗
115	✗	✗	✓
116	✓	✓	✗
117	✗	✓	✓
121	✗	✗	✓
123	✗	✓	✗
203	✓	✓	✓
206	✗	✗	✓
207	✗	✓	✓
210	✗	✓	✓
213	✗	✓	✓
214	✗	✓	✓
222	✓	✓	✓
223	✗	✗	✓
225	✓	✓	✗
231	✓	✓	✓
253	✗	✓	✗
256	✗	✓	✓
258	✗	✗	✓
261	✓	✓	✗
263	✓	✓	✓
264	✓	✓	✓
265	✓	✗	✓
266	✗	✓	✗
275	✗	✓	✓
301	✗	✗	✓
302	✗	✓	✓
303	✗	✓	✓
304	✗	✓	✓
305	✗	✓	✓
308	✗	✗	✓
314	✗	✓	✓
317	✓	✗	✓
318	✓	✓	✗
Total: 41 cepas	17 cepas empleadas	31 cepas empleadas	31 cepas empleadas

## Conclusiones

De las 41 cepas usadas para el estudio solamente 13 (3: 60-80%, 3: 40-60%, 3: 20-40%, 4: 0-20%) cumplieron con el crecimiento adecuado para tomarlas en consideración, la vasta mayoría no crecieron lo suficiente como para tener una interacción con la bacteria que pudiera ser tomada en cuenta, ya sea por tiempo insuficiente o contaminaciones, no fue posible obtener más bacterias que indicaran algún grado de inhibición; sin embargo las 3 cepas en el rango de 60-80% cumplieron con el objetivo propuesto y fueron capaces de mantener bajo control al hongo, dando éxito al objetivo del estudio.

Aun con los pocas bacterias que cumplieron con las condiciones esperadas, se obtuvieron 3 variantes que cumplen con el grado 1 de antagonismo, demostrando que pueden ser una alternativa factible como sistema de cuidado en los cultivos agrícolas, especialmente por ser una alternativa más amigable con el ambiente.

## Referencias

- Bell, D., Well, H., & Markham, C. (1982). In vitro<sup>o</sup> antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 379-382.
- Booth, C. (1971). The Genus Fusarium. *Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England*, 237.
- Burgess, L. W. (1981). General ecology of the fusaria. *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*, 225-235.
- Carlile, J. M., Watkinson, S. C., & Graham, W. (2003). *The Fungi*. doi10.1017/S0953756203237679
- FAO, & CEPAL. (2020). Sistemas alimentarios y COVID-19 en América Latina y el Caribe: Impactos y oportunidades en la producción de alimentos frescos. *Boletín* 11. doihttps://doi.org/10.4060/cb0501es
- Fernández, M. V. (2015). Identificación y caracterización de grupos de especies de Alternaria y Pithomyces asociados a enfermedades del trigo en Argentina. *Repositorio Institucional de la UNLP*, 2-15.
- Figuroa, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., Jiménez-Bremont, J. F., Mendoza-Elos, M. (2010). Caracterización de Especies de Fusarium Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 124-134.
- García, M. S., Shagarodsky, T., Fresneda, J. A., Fundora, Y. H., & González, J. (2007). Caracterización de especies del género Fusarium en el cultivo del garbanzo (Cicer arietinum) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 32(11), 63-66.
- Hernández, D. S., Reyes, L. A., García, O., Mayek, P., & Reyes, M. (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos de maíz (Zea mays L.) almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25, 127-133.
- INEGI. (2020). *Sistemas de Cuentas Nacionales de México*. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/?idserPadre=10200035#D10200035>.
- Koike, S. T., Wilen, C. A., Raabe, R. D., McCain, A. H., & Grebus, M. E. (2019). Fusarium Wilt.
- Mendoza, E. M., Lopez, B., Oyervides, G. A., Martínez, Z. G., De León, C., & Moreno, M. E. (2003). Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (Zea mays L.) causada por Fusarium moniliforme Sheld. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 267-271.
- Mokobi, F. (2020). Fusarium spp.
- Moreno, M. E. (1996). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas 1996. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 383.
- Moretti, A., & Solfrizzo, M. (2009). Alternaria toxins and plant diseases: An overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*.
- Pastor, F. G., & Guarro, J. (2008). Alternaria infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect*, 14, 734-746.
- Pérez-Moreno, L., Belmonte-Vargas, J. R., Núñez-Palenius, H. G., Guzmán-Mendoza, R., & Mendoza-Celedón, B. (2015). Sensibilidad in vitro de dos especies de Sclerotinia spp. y Sclerotium cepivorum a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 256-267.
- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., & Belmonte-Vargas, J. R. (2019). Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. *Acta universitaria*, 29. doi.org/10.15174/au.2019.2339

SENASICA. (2021). *FICHA TÉCNICA: Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical (syn. Fusarium odoratissimum)*. Dirección General de Sanidad Vegetal Centro Navional de Referencia Fitosanitaria.

SIAP. (2018). *Guanajuato. Infografía Agroalimentaria 2018*.

Thomma, B. P. (2003). Pathogen profile *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 4(4), 225–236. 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x