

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**



**Identificación y evaluación de microorganismos antagonicos frente a hongos fitopatógenos *in vitro***

Por:

**AZALIA CAROLINA MAGDALENO LÓPEZ**

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**Identificación y evaluación de microorganismos antagonicos frente a  
hongos fitopatógenos *in vitro***

POR:

**AZALIA CAROLINA MAGDALENO LÓPEZ**

TESIS

**Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
para obtener el título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por:

M. C. Carlos Alberto García Agustince  
Presidente

Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Vocal

Dra. Rebeca Casique Valdés

Vocal

Dra. Susana Genzález Morales  
Vocal

M. C. Sergio Sánchez Martínez  
Coordinador de la División de Ingeniería



Saltillo, Coahuila, México,

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**Identificación y evaluación de microorganismos antagónicos frente a  
hongos fitopatógenos *in vitro***

POR:

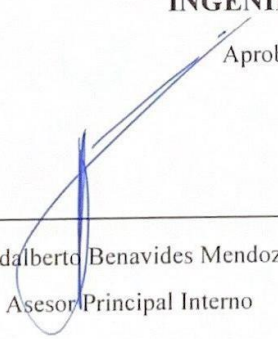
**AZALIA CAROLINA MAGDALENO LÓPEZ**


TESIS

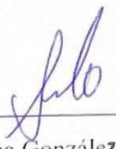
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:


**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor Principal Interno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rebeca Casique Valdés  
Asesora Principal Externa

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Susana González Morales  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
M. C. Carlos Alberto García Agustince  
Coasesor

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2024

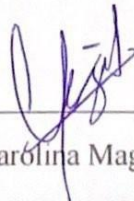
## Derechos de Autor y Declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citar; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



---

Azalia Carólinia Magdaleno López

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco primero a **Dios**, porque nunca me ha dejado sola aún en los momentos más complicados de mi vida, por darme siempre la fuerza para seguir adelante, por las personas que pone en mi camino para brindarme ayuda y hacerla más fácil.

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por darme la oportunidad de estudiar en ella y poder cumplir una meta de mi vida, el cursar la carrera de Ingeniero en Biotecnología.

A mis padres **Elizabeth López** y **Benjamín Magdaleno**, porque siempre me aplaudieron y apoyaron mis decisiones, porque nunca me dejaron sola aún a la distancia. Por darme esta oportunidad de mi vida.

Le agradezco a **mi familia** por su apoyo en cada momento de mi preparación, por su esfuerzo para darme esta oportunidad de estudiar en una de las mejores universidades de México, por creer en mí y nunca dejarme sola aun en los momentos más difíciles.

A mi gemela **Dalita** porque sin ella mi camino hubiese sido más difícil, por su compañía, por sus consejos, por su ayuda incondicional y por su amor de hermana.

A mi hermana **Quetzalli**, porque ha sido mi ejemplo para seguir adelante, por su dedicación y sus muchos logros que me hacen admirarla.

A mis **amigos**, Vanessa López, Agustín Chan, Emmanuel Ureña, Ricardo Coronado, Marisol Botello, Dulce Sifuentes, Adolfo Morales, Mónica Valenzuela y las chicas del fútbol. Porque siempre de alguna manera me dieron aliento para seguir adelante y buscaron la manera de poder ayudarme cuando más lo necesitaba. A mi asesora la **Dra. Rebeca Casique**, por darme la oportunidad de trabajar con ella durante este tiempo, por ser la primera en creer en mí al terminar mi proyecto de tesis y nunca dejarme sola. Por su optimismo y amor por la ciencia.

A la **Dra. Susana González Morales** por dejarme formar parte de este proyecto y por su disposición durante todo el proceso.

## DEDICATORIA

A mis padres, **Elizabeth** y **Benjamín**, los culpables de que esté aquí, escribiendo estas líneas. Gracias por soportarme durante todos estos años de estudio, por darme la oportunidad de estudiar lo que me gusta, por las palabras de aliento cuando más lo necesitaba y por ser mi refugio en los momentos más difíciles. Este triunfo es también el suyo.

A mis hermanos

**Enrique Magdaleno, Quetzally Magdaleno, Xicoténcatl Magdaleno, Atahualpa Magdaleno** y **Jazmín Magdaleno**, los que siempre me retan desde el momento que tomé la decisión de estudiar Ing. Biotecnología, los que siempre me dieron consejos desde su experiencia para seguir adelante, los que me ayudaron en mi toma de decisiones y nunca dejaron de confiar en mí.

A mis cuñadas, primos y mis sobrinos

**Yuni, Ary, Lupita** y **Sara**. Por su hermosa compañía y por formar parte de mi familia.

A mis **amigos**

Vanessa López, Agustín Chan, Marisol Botello, Carla Ruíz, Mario Carrasco, Emanuel Ureña, Violeta Guerrero, Mariana Ordás, Mariana Obregón, Dulce Sifuentes, Mónica Valenzuela, Adolfo Morales, Ricardo Coronado, Luis Hernández, Alfonso Bastidas y todas las chicas del fútbol. Por compartir parte de su vida conmigo y darme las mejores experiencias a lo largo de esta etapa.

A mis asesores

La **Dra. Rebeca Casique** y **Dra. Susana Gonzáles** por darme la oportunidad de trabajar con ellas en este proyecto tan importante para concluir mi formación académica.

**A mí**

Porque siempre afronté mis decisiones, porque nunca me di por vencida aún con muchas adversidades en mi camino, por la fe que siempre tuve al cumplir este propósito y por mi esfuerzo en todas las actividades que se me han presentado a lo largo de mi vida.

**A Dios**

A ti que me diste la oportunidad de vivir al lado de todas estas personas que me han querido y me han ayudado durante mi camino.

A la **UAAAN**, por aceptarme en ser parte de su equipo de formación.

## **TABLA DE CONTENIDO**

I. RESUMEN .....	1 .....	11
------------------	---------	----

II. INTRODUCCIÓN .....	3
III. OBJETIVO GENERAL.....	6
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
6.1 Microorganismos endófitos .....	7
6.2 Hongos endófitos .....	8
6.3 Bacterias endófitas.....	11
6.3.1 <i>Bacillus</i> .....	13
6.3.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	13
6.3.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	14
6.3.4 <i>Azotobacter</i> .....	14
6.4 Uso de bacterias para el control biológico.....	14
6.5 Uso de hongos para el control biológico.....	16
6.7 Metabolitos que producen las bacterias endófitas.....	17
6.8 Uso de bacterias endófitas para el control de hongos fitopatógenos .....	18
6.9 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal .....	19
6.9.1 <i>Azospirillum</i> .....	20
6.9.2 <i>Herbaspirillum</i> .....	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
7.1 Aislamiento de cepas antagónicas .....	24
7.2 Identificación de cepas bacterianas por técnicas de biología molecular.....	26
7.2.1 Obtención de inóculo bacteriano para la extracción de ADN.....	26
7.2.2 Método de Dumolin para la extracción de ADN de bacterias aisladas .....	27
7.2.3 Método CTAB modificado para la extracción de ADN de bacterias aisladas .....	28
7.2.4 Calidad del ADN; Electroforesis horizontal de agarosa al 1% .....	28
7.2.5 Cuantificación de ADN por el método de absorbancia .....	29
7.2.6 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	30
7.2.7 Electroforesis horizontal de agarosa al 3% .....	31
7.2.8 Secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR punto final .....	31
7.3 Identificación de hongos fitopatógenos por técnicas de biología molecular .....	32
7.3.1 Obtención de hongos fitopatógenos.....	32
7.3.2 Extracción de ADN de hongos filamentosos .....	32
7.3.2 Método de CTAB modificado para hongos fitopatógenos.....	33
7.3.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para hongos filamentosos .....	33
7.4 Prueba de efectividad antagónica contra <i>Alternaria</i> sp.....	34

7.4.1 Evaluación de efectividad antagónica frente a hongos fitopatógenos.....	35
7.5 Prueba de inoculación de bacterias endófitas en plántulas de tomate.....	36
7.5.1 Obtención de la plántula .....	36
7.5.2 Preparación del inóculo de bacterias endófitas para las plántulas.....	37
7.5.2.1 Determinación de la concentración del inóculo por escala de McFarland (1907) .....	39
7.5.2.2 Conservación de cepas bacterianas .....	39
7.5.3 Inoculación de plántulas de tomate.....	40
7.5.4 Determinación de variables agronómicas de plantas inoculadas.....	41
7.6 Análisis estadístico .....	42
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
8.1 Métodos de extracción de ADN de bacterias.....	43
8.2 Identificación de bacterias endófitas por PCR punto final.....	44
8.3 Métodos de extracción de ADN de hongos.....	45
8.4 Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> .....	47
8.5 Medición de la escala de McFarland para la obtención del inóculo .....	52
8.6 Bioensayo en invernadero con bacterias endófitas en plántulas de tomate .....	53
IX. CONCLUSIÓN .....	56
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Bacterias endófitas presentes en algunas plantas. Tomado de Orjuela Corchuelo (2018) .....	12
<b>Tabla 2.</b> Composición del medio Czapek-Dox .....	27
<b>Tabla 3.</b> Composición del cóctel para la reacción de PCR para identificación gen 16S para bacterias .....	30



<b>Tabla 4.</b> Componentes de caldo nutritivo para 1.8 L de agua purificada .....	38
<b>Tabla 5.</b> Preparación de la escala de McFarland. Tomado de Arcos et al. 2004 .....	39
<b>Tabla 6.</b> Concentración de ADN por el método Dumolin .....	45
<b>Tabla 7.</b> Concentración de ADN por el método CETAB .....	45
<b>Tabla 8.</b> Identificación de las secuencias obtenidas de cepas endófitas en base de datos GenBank. ....	46
<b>Tabla 9.</b> Concentración de ADN por el método Dumolin .....	48
<b>Tabla 10.</b> Concentración de ADN por el método CTAB .....	48
<b>Tabla 11.</b> Identificación de las secuencias obtenidas de cepas de hongos fitopatógenos en base de datos GenBank. ....	49
<b>Tabla 12.</b> Crecimiento radial de los hongos fitopatógenos evaluados con las cepas endófitas seleccionadas. ....	51
<b>Tabla 13.</b> Concentraciones para $20 \times 10^8$ células bacterianas por ml .....	54
<b>Tabla 14.</b> Variables agronómicas .....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras características de <i>Cadophora</i> sp. y <i>Periconia macrospinososa</i> en un sistema de inoculación artificial con <i>Zea mays</i> . (a) Se visualizan las hifas septadas intra e intercelulares y los microesclerocios de <i>Cadophora</i> sp. después de teñirlas con azul de anilina. También se pueden ver estructuras hifales pigmentadas intracelulares en la raíz. (b) Colonización de raíces por <i>P. macrospinososa</i> con hifas apenas teñibles. Se puede ver su conidióforo pigmentado con conidios espinosos característicos. Barras de escala de 30 $\mu$ m. Tomado de: Knapp et al. 2014. ....	10
--	----

<b>Figura 2.</b> Biomasa aérea y radicular de las plantas de <i>N. tabacum</i> inoculadas con las diferentes cepas de los hongos endófitos: <i>Phialocephala fortinii</i> (E-1), <i>Penicillium melinii</i> (E-13), <i>Umbelopsis dimorpha</i> (E-14) y <i>Preussia cymatomera</i> (E-36).....	11
<b>Figura 3.</b> Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> (A) y <i>Rhizoctonia solani</i> desarrollado en medio PDA (B). Tomado de Castro-del Ángel et al. 2021. ....	19
<b>Figura 4.</b> Rutas de colonización de plantas por bacterias endófitas, tomado de Audipudi et al. 2017. ....	23
<b>Figura 5.</b> Desinfección de raíces de <i>Pinus cembroides</i> para el aislamiento de microorganismos endófitos. ....	24
<b>Figura 6.</b> Aislamiento de bacterias endófitas con capacidad antagonica. ....	25
<b>Figura 7.</b> Prueba preliminar de antagonismo contra <i>Alternaria</i> sp. de las cepas de bacterias obtenidas. ....	26
<b>Figura 8.</b> Gel de electroforesis en Transiluminador de luz UV del DNA obtenido de bacterias aisladas.....	29
<b>Figura 9.</b> Obtención de tejido micelial de hongos usando nitrógeno líquido. ....	33
<b>Figura 10.</b> Cepas de bacterias antagonicas en contacto con el hongo <i>Alternaria</i> spp. ...	35
<b>Figura 11.</b> Hongos fitopatogénos frente a cepas bacterianas (J1-2, J4-1, J5-1, J2-1, J3-4, J3-6, J4-3) 7 días después de su incubación. A. <i>Alternaria alternata</i> , B. <i>Fusarium</i> sp., C. <i>Fusarium oxysporum</i> , D. <i>Fusarium verticilloides</i> , E. <i>Samsoniella hepiali</i> . ....	36
<b>Figura 12.</b> A. Siembra de tomate variedad Floradade en semilleros con sustrato estéril. B. Plántulas de tomate con cuatro días de emergencia. C. Trasplante de las plántulas a los 15 días de emergencia. ....	37
<b>Figura 13.</b> Proceso de elaboración del inóculo. A. Raspado de las cepas bacterianas y agregación a los medios de caldo nutritivo, B. Incubación en Shaker a 150 rpm y temperatura ambiente (28°C). ....	38
<b>Figura 14.</b> Inoculación de las plántulas de tomate con bacterias endófitas 15 días después del trasplante. ....	41
<b>Figura 15.</b> Establecimiento del ensayo con bacterias endófitas en plántulas de tomate	42
<b>Figura 16.</b> Determinación de variables agronómicas en plántulas de tomate inoculadas con bacterias endófitas. ....	43
<b>Figura 17.</b> Gel de agarosa al 1.3% con ADN de las técnicas realizadas, arriba= método de Dumolin, abajo= método de CTAB .....	44
<b>Figura 18.</b> Gel de agarosa al 1.3% con ADN de las técnicas realizadas, arriba= método de Dumolin, abajo= método de CTAB .....	47
<b>Figura 19.</b> Hongo <i>Fusarium verticilloides</i> frente a bacterias antagonicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1. ....	52
<b>Figura 20.</b> Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> frente a bacterias antagonicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1. ....	52
<b>Figura 21.</b> Hongo <i>Fusarium</i> sp. frente a bacterias antagonicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1 .....	53
<b>Figura 22.</b> Hongo <i>Samsoniella hepiali</i> frente a bacterias antagonicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1.....	53
<b>Figura 23.</b> Plántulas inoculadas con cepas de bacterias endófitas, de izquierda a derecha, Testigo, J21= <i>Brucella intermedia</i> , J4-1= <i>Bacillus atrophaeus</i> , J5-1= <i>Bacillus atrophaeus</i> .....	55

## **I. RESUMEN**

Los problemas fitosanitarios son en gran medida la causa de pérdidas económicas a nivel mundial de los cultivos agrícolas los cuales, son causados principalmente por hongos fitopatógenos. Con las nuevas regulaciones y restricciones en el uso de plaguicidas y la demanda de productos orgánicos, crece el interés por el uso de técnicas alternativas para el manejo de enfermedades, particularmente, el uso de microorganismos benéficos y sus metabolitos primarios y secundarios. En años recientes, se ha evidenciado que los microorganismos endófitos asociados a

muchas especies vegetales producen metabolitos secundarios con acción antifúngica, entre éstos, se encuentran las bacterias endófitas que pueden ser promotoras de crecimiento vegetal y control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos. En este estudio se aislaron cepas de bacterias endófitas de raíces de pino, se realizaron dos técnicas de extracción de ADN (Dumolin y CTAB modificado) y se identificaron por PCR amplificando el gen 16S. Así mismo, se identificaron 5 cepas de hongos fitopatógenos amplificando la región ITS del gen ribosomal 18S. Las cepas aisladas e identificadas se evaluaron en pruebas de antagonismo *in vitro* frente a hongos de los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Samsoniella*. Se realizó un ensayo en invernadero con plántulas de tomate de la variedad Floradade a los 15 días después del trasplante, se inocularon las plantas con las cepas endófitas aisladas para identificar si tienen potencial promotor de crecimiento vegetal. Se evaluaron variables agronómicas después de 30 días de haberse inoculado. Las variables evaluadas fueron altura de la planta (AP), longitud de raíz (LR), diámetro de tallo (DT), peso fresco de raíz (PFR) y peso fresco del tallo (PFT).

Se encontró que la técnica de extracción de Dumolin presentó mejor calidad de ADN y mayor rendimiento. Se aislaron 16 cepas de bacterias endófitas de las cuales 7 se identificaron por métodos de biología molecular, se encontraron las especies *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis* y *Brucella intermedia*. Los hongos fitopatógenos identificados por técnicas de biología molecular fueron: *Alternaria*

1

*alternata*, *Fusarium sp*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloides* y *Samsoniella hepiali*.

En la prueba de antagonismo *in vitro* con los hongos fitopatógenos antes mencionados, se encontró que la cepa que indujo el mayor porcentaje de inhibición fue la cepa J2-1 (*Brucella intermedia*) presentando valores de hasta el 50% de inhibición de los hongos evaluados. Se encontraron diferencias altamente significativas en las pruebas de antagonismo *in vitro* de las cepas evaluadas (7

cepas de bacterias endófitas), a pesar de que algunas no fueron diferentes entre sí, todas presentaron alta diferencia significativa frente al testigo ( $p < 0.001$ ) excepto por las cepas J3-6, J4-1 y J4-3 cuando se evaluaron contra *Fusarium sp*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*. Se encontró que la única cepa que redujo el crecimiento de *Samsoniella hepiali* fue la cepa J5-1 (*Bacillus atrophaeus*).

En el bioensayo en invernadero, se encontró que no existieron diferencias significativas frente al testigo para las variables DT, AP y LR de las plántulas de tomate al ser inoculadas con las cepas J2-1 (*Brucella intermedia*), J4-1 y J5-1 (*Bacillus atrophaeus*), sin embargo, se encontró diferencia altamente significativa entre las variables de PFR y PFT encontrando que la cepa J2-1 (*Brucella intermedia*) y la cepa J5-1 (*Bacillus atrophaeus*) incrementaron en un 46% la biomasa fresca de la raíz y la cepa J2-1 (*Brucella intermedia*) y, J4-1 (*Bacillus atrophaeus*) incrementaron en un 34% la biomasa fresca de la planta. Los datos sugieren que las cepas aquí mostradas inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos y, además, promueven el desarrollo de las plantas en invernadero.

Palabras clave: Antagonismo, *Atrophaeus*, *Bacillus atrophaeus*, Bacterias endófitas, Bioestimulación, *Brucella intermedia*, Hongos fitopatógenos.

## II. INTRODUCCIÓN

México es uno de los países que cuenta con una gran diversidad de cultivos gracias a la variedad de suelos y condiciones climáticas, lo que resulta favorable para la producción hortícola. Una de las regiones de gran relevancia en la producción de alimentos en la República Mexicana, es el noroeste del país, el cual está conformado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora (Martínez-Ruiz et al., 2016). En la República Mexicana, específicamente en el estado de Sonora, la superficie dirigida al cultivo de tomate ha aumentado considerablemente en los recientes años; sin embargo, en ciclos de producción recientes, se ha generado una problemática de control fitosanitario, donde los síntomas de patógenos conocidos, se confunden con aquellos de fitopatógenos ‘nuevos’ que están arribando a las áreas agrícolas y, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta en un 100 % (Martínez-Ruiz et al., 2019). Los problemas fitosanitarios son en gran medida la causa de pérdidas económicas a nivel mundial de los cultivos agrícolas, los cuales son causados principalmente por hongos (Rodríguez, 2022).

Dentro de los factores bióticos que sobresalen como agentes de enfermedades en los suelos agrícolas, se encuentran los hongos fitopatógenos como *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Colletotrichum* spp., los cuales atacan a cultivos de importancia a nivel mundial causando grandes pérdidas económicas.

Con las nuevas regulaciones y restricciones en el uso de plaguicidas y la demanda de productos orgánicos, crece el interés por el uso de tácticas alternativas a los fungicidas para el manejo de enfermedades, particularmente, el uso de microorganismos benéficos y sus metabolitos primarios y secundarios (Dávila Medina et al., 2013). Actualmente, existe un gran interés en la búsqueda de soluciones amigables al medio ambiente para el control de fitopatógenos y, entre estas, se incluye el uso de microorganismos con capacidad antagónica, que se han aislado en algunos cultivos de importancia económica e inclusive, algunos se han comercializado. El uso de

microorganismos además de proveer un control biológico de algunos patógenos también estimula a la planta, disminuye el uso de productos químicos como fungicidas, así como el impacto ecológico que estos causan (Vidal Martínez et al., 2021).

En años recientes, se ha evidenciado que los microorganismos endófitos asociados a muchas especies vegetales producen metabolitos secundarios con acción antifúngica, se ha reportado que en la misma especie botánica coexisten tanto los microorganismos benéficos como las especies patógenas, provocando un papel de antagonismo y una competencia por el nicho donde habitan. Estos microorganismos endófitos pueden residir en los tejidos de las plantas realizando procesos de mutualismo que generan la producción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que en muchos casos, se encargan de brindar protección y resistencia a la planta; la eficacia de estos organismos depende de factores como: la especificidad del huésped, la capacidad de movimiento dentro de los tejidos vegetales y la inducción de resistencia sistémica (Orjuela Corchuelo, 2018).

Dentro de los microorganismos endófitos, se encuentran las bacterias y los hongos, los mecanismos de control biológico mediado por bacterias endófitas están basados en diferentes funciones como ser promotoras de crecimiento vegetal, control biológico sobre una diversidad de fitopatógenos, producir un gran número de metabolitos como antibióticos, metabolitos secundarios incluyendo algunos compuestos antitumorales y agentes antiinflamatorios permitiendo mejorar la productividad agrícola y mejorar la eficiencia de los procesos de fitorremediación de compuestos tóxicos en la rizosfera (Sánchez León, 2021).

El género *Bacillus* presenta un gran potencial como antagonista, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida que generan, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos. El efecto biocontrolador de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium spp.* bajo condiciones de invernadero en el cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis* L) fue evaluado por Corrales et al. (2011), obteniendo que todos los aislamientos de *Bacillus spp.*, presentaron efecto biocontrolador sobre *Fusarium spp.* en romero al disminuir la severidad de la marchitez vascular en las plántulas por debajo

del 50%, lo que valida los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* y lo señalado en la literatura acerca de estas bacterias (Méndez-Úbeda et al., 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias endófitas con capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos es un campo amplio por explorar, que tendría un gran potencial en la agricultura para el desarrollo sostenible. El objetivo de este estudio fue identificar y evaluar cepas antagónicas frente a hongos fitopatógenos del género *Fusarium* y *Alternaria in vitro*.



### III. OBJETIVO GENERAL

-Identificar y evaluar cepas antagónicas frente a hongos fitopatógenos del género *Fusarium* y *Alternaria* *in vitro*.

### IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Aislar cepas de bacterias antagónicas a partir de muestras de raíz de suelos de la región de Saltillo, Coahuila.

-Evaluar dos técnicas de extracción de ADN de cepas de hongos fitopatógenos y bacterias antagónicas.

-Identificar tanto las cepas de hongos fitopatógenos como bacterias antagónicas aisladas mediante técnicas de biología molecular.

-Evaluar *in vitro* las cepas de bacterias antagónicas aisladas frente a *Alternaria alternata*, *Fusarium* *sp.*, *F. verticilloides*, *F. oxysporum* y *Samsoniella* *sp.*

-Realizar un bioensayo *in vivo* con plántulas de tomate en invernadero inoculado con cepas antagónicas.

-Evaluar variables agronómicas en plántulas inoculadas tratadas con cepas antagónicas.

### V. HIPÓTESIS

Las cepas antagónicas aisladas e identificadas mostrarán inhibición de hongos fitopatógenos *in vitro* y aumentarán al menos una variable morfológica de plántulas de tomate inoculadas bajo invernadero.

### VI. REVISIÓN DE LITERATURA

## 6.1 Microorganismos endófitos

Durante los últimos 30 años, el término endófito, ha aparecido cada vez con más frecuencia en la literatura científica. Aunque el origen del término proviene del siglo XIX, cuando Antón de Bary lo utilizó para describir hongos que viven dentro de los tejidos de una planta, su significado actual es diferente. Hoy en día, es un hecho bien establecido que las plantas son hospedantes de muchos tipos de endófitos microbianos, incluyendo bacterias, hongos, arqueas y eucariotas unicelulares, como algas y amebas (Vera Loo et al., 2018). A través de los años, diferentes autores han propuesto definiciones más complejas, coincidiendo en que los microorganismos endófitos son aquellos presentes en la superficie de tejidos vegetales desinfectados o en su interior y que no producen efectos nocivos para la planta, estos se pueden encontrar en espacios intracelulares y en tejidos vasculares de tallos y raíces (Cotes et al., 2018).

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originó de observaciones en los tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra. Este término es actualmente expresado como la asociación biológica en la que los microorganismos colonizan los tejidos internos vivos de las plantas sin causar un efecto negativo o daños aparente a la planta (Pérez et al., 2009). Además, los endófitos tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, aportar nutrientes para su desarrollo, fijar nitrógeno y solidificar el fosfato.

Algunos autores clasifican a los microorganismos endófitos según la dependencia que tengan con la planta, su permanencia y su colonización con esta. Pueden ser obligados, oportunistas y facultativos. Los endófitos “obligados”, son los que requieren de los tejidos de las plantas para completar su ciclo de vida (por ejemplo, los hongos micorrízicos y miembros de los géneros de la familia Clavicipitaceae

(Ascomycota); los endófitos "oportunistas" son los que prosperan principalmente fuera de los tejidos de las plantas y entran esporádicamente en la endosfera de la planta (entre estos se encuentran hongos de los géneros *Hypocrea* y *Trichoderma*); y por último, están los endófitos "facultativos", que comprende la gran mayoría de los microorganismos endofíticos (Dector Arriaga, 2023). Respecto a su clasificación con su permanencia y colonización en la planta, se consideran: (a) Endófitos pasajeros, que son los microorganismos que habitan en el suelo y pueden volverse endófitos por casualidad al ingresar a través de las heridas naturales o realizadas por algún otro microorganismo en la raíz. (b) Endófitos oportunistas, estos colonizan partes específicas de la raíz como el rizoplasma o a su vez invaden tejidos internos de esta. Como última clasificación están los (c) Endófitos competentes, son aquellos que se adaptan en el entorno de la planta colonizando todo de ella, incluyendo el tejido vascular y modificando el metabolismo de esta, manteniendo el equilibrio incluso cuando los microorganismos se encuentran en altas concentraciones (Sanz López, 2020).

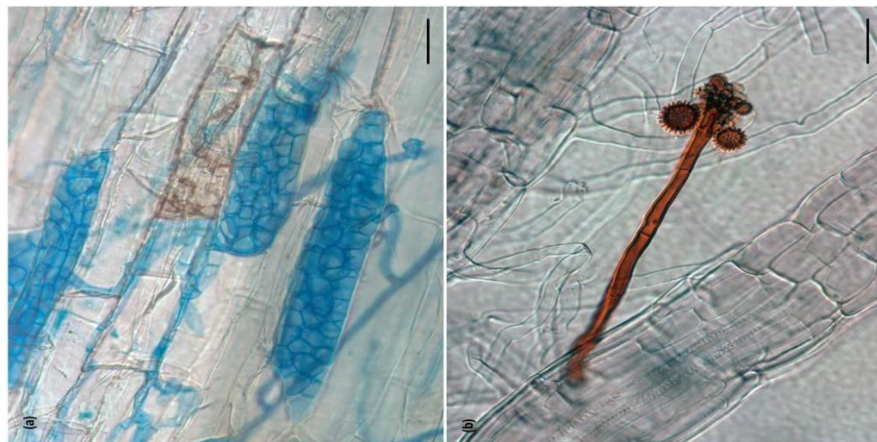
Estos microorganismos han demostrado una variedad de beneficios en la agricultura, incluida la mejora del crecimiento de las plantas, el aumento de la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés abiótico, la promoción de la absorción de nutrientes y la producción de metabolitos que inhiben patógenos, además que pueden incentivar la producción de fitohormonas como giberelinas, estimulando el crecimiento de las plantas hospederas (Torricco et al., 2024).

## **6.2 Hongos endófitos**

Los hongos endófitos son microorganismos que en su mayor parte de ciclo de vida colonizan los tejidos de la planta hospedera sin causar un daño evidente o, ningún daño, pueden encontrarse en especies como: pastos, algas, musgos, y plantas vasculares (Figura 1); la temperatura en la cual sobrevive e interactúa el microorganismo con la planta, es variada ya que, puede crecer en un rango amplio de

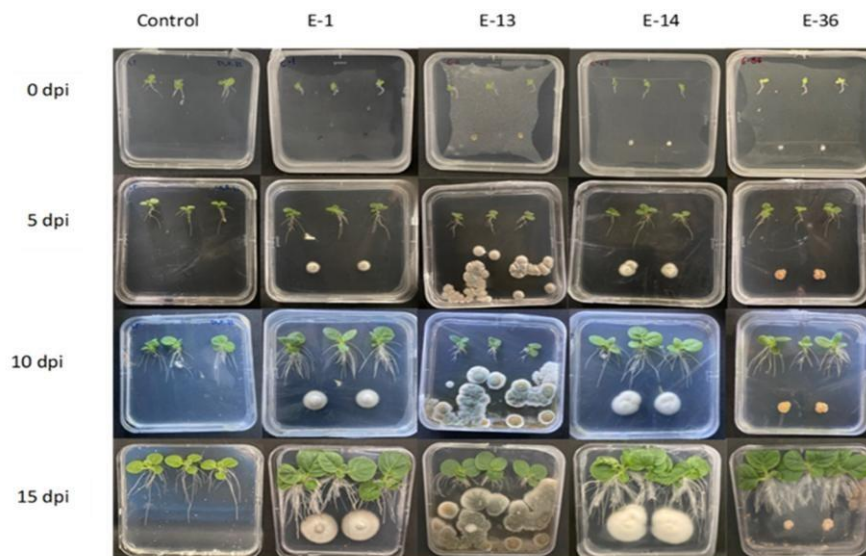
temperaturas lo que deriva en que pueden estar presentes en diferentes ambientes y pisos térmicos (Orjuela Corchuelo, 2018). Desde hace un par de décadas, se ha descubierto que los hongos endófitos le confieren varios tipos de beneficios a las plantas como mejorar la tolerancia a las altas presiones osmóticas y a las altas temperaturas, así como también ayudan a su hospedadora en procesos biológicos como mejorar el mecanismo de defensa, suprimir microorganismos fitopatógenos u oportunistas, incrementar la adquisición de nutrientes y ayudar a tolerar el estrés abiótico (Baez Castro, 2024).

La clasificación de los hongos endófitos es muy diversa, algunos estudios los dividen de acuerdo con los sitios hospederos en la planta, otros autores los clasifican en dos grupos: Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos. El primer grupo hace referencia a microorganismos causantes de síndromes tóxicos en herbívoros que consumen la planta hospedante; estos están presentes en el tallo y los rizomas, ayudan a la tolerancia de factores de sequía que afectan la planta. El grupo no Clavicipitáceos son los hongos endófitos presentes en diferentes partes de la planta, le confieren tolerancia a estrés biótico y abiótico, son los encargados de la producción de metabolitos secundarios, incrementando la protección a la misma frente a patógenos, y otros factores externos que la perjudican (Orjuela Corchuelo, 2018).



**Figura 1.** Estructuras características de *Cadophora* sp. y *Periconia macrospinosa* en un sistema de inoculación artificial con *Zea mays*. (a) Se visualizan las hifas septadas intra e intercelulares y los microesclerocios de *Cadophora* sp. después de teñirlas con azul de anilina. También se pueden ver estructuras hifales pigmentadas intracelulares en la raíz. (b) Colonización de raíces por *P. macrospinosa* con hifas apenas teñibles. Se puede ver su conidióforo pigmentado con conidios espinosos característicos. Barras de escala de 30  $\mu$ m. Tomado de: Knapp et al. 2014.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar un daño evidente, incluso en algunos casos son necesarios para la sobrevivencia de las especies vegetales. Esta interacción entre los hongos endófitos y su huésped es descrita como mutualista ya que los hongos endófitos brindan beneficios a su huésped, lo que excluye de esta definición a hongos patógenos y/o saprófitos. Mientras la interacción hongo-planta se mantenga equilibrada, el hongo obtiene nutrientes de la planta hospedante y, a cambio, ofrece beneficios para ella (Figura 2). Entre estos beneficios se ha descrito que los hongos endófitos pueden aportar a las plantas un mayor contenido de nutrientes, protección, estimulación del crecimiento radicular y aéreo, y aumento de la tolerancia al estrés (biótico y abiótico) al producir metabolitos secundarios con una amplia diversidad estructural que les brindan a las plantas protección y resistencia contra herbívoros, microorganismos patógenos y distintos estreses ambientales (Díaz-Valenzuela et al. 2024).



**Figura 2.** Biomasa aérea y radicular de las plantas de *N. tabacum* inoculadas con las diferentes cepas de los hongos endófitos: *Phialocephala fortinii* (E-1), *Penicillium melinii* (E-13), *Umbelopsis dimorpha* (E-14) y *Preussia cymatomera* (E-36).

### 6.3 Bacterias endófitas

En su inicio, las bacterias endófitas fueron consideradas como patógenos latentes o como contaminantes de una incompleta desinfección de la superficie, hoy en día, se les considera a las bacterias endófitas como habitantes de los tejidos de las plantas, especialmente espacios intercelulares y, dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta; tienen la capacidad de establecerse en la rizosfera, el filósfero, epífitos y el interior de tejidos de plantas desarrollando un papel benéfico, neutro o perjudicial dependiendo a las condiciones ambientales (Sánchez León, 2021). Estas bacterias son promotoras del crecimiento vegetal, lo cual hace referencia a un grupo de microorganismos que estimulan el desarrollo de las plantas por lo que son de gran interés en la agricultura coadyuvando a la fertilidad de la tierra promoviendo la disponibilidad de nutrientes por sus mecanismos de solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno (Vasquez Espejo et al., 2018).

Las bacterias endofíticas alcanzan a tener dos efectos principales.

1. Incrementan la capacidad de las plantas ayudándolas en la absorción de nutrientes del suelo mediante el incremento y desarrollo de raíces, además son factor clave en la solubilización de fosfatos y fijación biológica del nitrógeno.
2. Son agentes controladores de patógenos. Este fenómeno de biocontrol se presenta debido a que los endófitos pueden establecer una relación mutualista con la planta desde su interior, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Sánchez León, 2021).

Dentro de las especies vegetales en las que comúnmente se encuentran están: árboles leñosos, y plantas herbáceas; cabe resaltar que pueden coexistir más de una bacteria (Orjuela Corchuelo, 2018) como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Bacterias endofíticas presentes en algunas plantas. Tomado de Orjuela Corchuelo (2018)

Planta	Bacteria endofítica
Fresa ( <i>Fragaria ananassa</i> )	<i>Pseudmona fluorescens</i> , <i>Pseudmona corrugata</i> , <i>Pseudmona tolaassi</i> , <i>Pseudmona paucimbilis</i> <i>Xanthomonas ssp.</i>
Plantas cítricas	<i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. magaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>methylbacterium extroquenes</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> .
Limón áspero ( <i>Citrus limón</i> )	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>
Maíz ( <i>Zea mays</i> )	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i>
Canola ( <i>Brassica napus</i> )	<i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Rathayibacter sp.</i>

Se ha reportado que los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia* son efectivas en la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo*

de microorganismos fitopatógenos y se encuentran entre los géneros más utilizados. Mientras tanto, otras especies endófitas de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* e *Isophtericola* mejoran el estrés a la sequía, el calor y la salinidad en diferentes cultivos (Loor et al., 2021).

### **6.3.1 *Bacillus***

El género *Bacillus* destaca por su empleo en el biocontrol de fitopatógenos, aunque últimamente, se ha ampliado la utilización de cepas para la promoción del crecimiento vegetal. Este género presenta ventajas como la formación de endosporas que le proporcionan mayor sobrevivencia en el suelo, elevada velocidad de crecimiento y, amplia versatilidad en la producción de metabolitos. La mayor parte de los estudios nacionales e internacionales de este género bacteriano, analizan el control de plagas por *Bacillus thuringiensis*; en otros casos se han hecho aislamientos y caracterizaciones parciales relacionadas con sus atributos como promotor del crecimiento de las plantas o antagonista de patógenos (Rojas Badía et al., 2021). Tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* han demostrado características endófitas, ya que tienen la capacidad de colonizar el interior del tejido vegetal, un proceso crítico para la interacción entre microbios benéficos y plantas, que puede tener varios mecanismos que confieren efectos beneficiosos sobre el crecimiento del huésped (Beltrán-Acosta et al., 2023).

### **6.3.2 *Bacillus cereus***

Meléndez et al., (2024) mencionan que las bacterias del género *Bacillus*, entre las que se encuentran *Bacillus cereus* han demostrado capacidad para suprimir patógenos causantes de enfermedades del arroz, debido a mecanismos de acción como la antibiosis, competencia por nutrientes, micoparasitismo, inducción de resistencia sistémica en las plantas. Esta multiplicidad de mecanismos permite



seleccionar al microorganismo como un agente de control biológico. Así también, se observa la tendencia de aplicar enfoques integrados para aprovechar la diversidad microbiana mejorando la salud de las plantas y reduciendo la dependencia de agroquímicos.

### **6.3.3 *Pseudomonas fluorescens***

Esta especie bacteriana habita la rizosfera, promueve el crecimiento vegetal y exhibe una gran capacidad de adaptación y colonización a diferentes tipos de suelos, por lo que se asocia a una gran variedad de especies vegetales. *P. fluorescens* ofrece efectos directos e indirectos en la interacción con plantas, entre los efectos directos se encuentran la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilizadoras de minerales y síntesis de una gran cantidad de compuestos volátiles. Los efectos indirectos incluyen la inhibición de hongos fitopatógenos que estén interactuando en el mismo ambiente rizosférico (Álvarez-García et al., 2020).

### **6.3.4 *Azotobacter***

Medina (2019), menciona que las bacterias del género *Azotobacter* tienen la potencialidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar elementos minerales y producir un grupo de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal. Además, que tienen varias actividades metabólicas de interés como: la fijación de nitrógeno de vida libre, solubilización de fósforo, producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal, degradación de hidrocarburos y control de hongos fitopatógenos. Según Dev et al (2015) producen sustancias fungistáticas con amplio espectro activo contra los hongos *Fusarium*, *Aspergillus*, *Helmintosporium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium rolfsii*.

## **6.4 Uso de bacterias para el control biológico**

Govin Sanjudo et al. (2019), evaluaron la actividad antagonista de cepas endofíticas de *Bacillus*, de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis* Borhidi, frente a los hongos *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. y a tres especies del género *Fusarium*; en dicho estudio se encontró la producción de sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN) y de enzimas líticas como amilasas, proteasas y lipasas, se obtuvieron resultados del 100% en la producción de proteasas, amilasas y HCN además que todas las cepas afectaron el crecimiento de los hongos durante los ensayos de antagonismo. La cepa *Bacillus* sp. ER11 mostró el mayor porcentaje de inhibición de los hongos, con valores superiores al 70 % en todos los casos.

Barboza-García et al. (2023), evaluaron *in vitro* la capacidad promotora de crecimiento vegetal de bacterias endófitas aisladas de diferentes tejidos de variedades de arroz aislando las bacterias endófitas y evaluando cualitativamente la capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de sideróforos, comprobaron que de los 22 aislados, 11 mostraron capacidad de solubilizar fosfato, 6 de producir sideróforos, y 5 de fijar nitrógeno. En los resultados del secuenciamiento comprobaron la identidad de *Bacillus cereus* y *B. thuringiensis*, los cuales tuvieron la capacidad de promover el crecimiento en cultivo de arroz mediante la solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos.

Rentería Martínez et al. (2019), aislaron doce cepas con actividad de fijación de nitrógeno a partir de la rizósfera de zacate bermuda (*Cynodon dactylon*) ruderal. Lograron identificar *Pseudomonas monteillii* y *Chryseobacterium massiliae* mediante la amplificación, secuenciación y análisis de fragmentos del gen ribosomal 16S, donde ambos aislados mostraron actividad de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol-3-acético, ácido giberélico y sideróforos, así como también mostraron inhibición contra: *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme*, *F. Oxysporum* y *Ceratobasidium* sp. Por otra parte, Silva et al. (2012), evaluaron un total de 234 cepas de bacterias endófitas y hongos de los tejidos de la planta de cafeto para controlar la roca de la hoja de café (*Hemileia vastatrix*) y promover el crecimiento de las plántulas. Comprobaron que 119 cepas de bacterias presentaron resultados superiores en comparación con el

tratamiento control. *Escherichia fergusonii* Farmer, *Acinetobacter calcoaceticus* Brisou y Prévot y *Salmonella entérica* serovar Typhi, presentaron resultados positivos en producción de fosfatasa, producción de ácido indolacético, sideróforos, citoquininas y giberelinas, lo que podría relacionarse con la capacidad de bacterias endófitas en la promoción del crecimiento. Las cepas bacterianas *Brevibacillus choshinensis* Takagi, *Pectobacterium carotovorum* Jones, *Bacillus megaterium* Bary, *Microbacterium testaceum* Komagata & Lizuka y *Cedecea davisae* Grimont presentaron capacidad antagónica y reducción de severidad de la enfermedad en un 97 % y 100 %.

## 6.5 Uso de hongos para el control biológico

Polanco-Florián et al. (2020), aislaron e identificaron cepas de microorganismos de suelo y evaluaron su capacidad antagónica *in vitro* frente a los patógenos de cítricos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae*. Los aislamientos que obtuvieron los evaluaron preliminarmente por observación y confrontación del crecimiento. De 70 cepas que aislaron, 15 presentaron actividad antagónica con porcentajes de inhibición de 39-91%. Como resultado obtuvieron que las cepas de los actinomicetos y el hongo *Penicillium citrinum*, causaron inhibición de 84, 91 y 85% respectivamente contra *L. theobromae* y de 83, 91 y 91% respectivamente contra *F. meliae*.

Ortiz-Espinoza et al. (2020), evaluaron el efecto de cepas comerciales de hongos endófitos entomopatógenos (HEE) y de aislados de suelos agrícolas sobre el crecimiento, fotosíntesis, intercambio de gases y producción en plantas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.) a través de dos métodos: 1) inoculación en semilla; y 2) aspersión del sustrato. Comprobaron que los hongos endófitos entomopatógenos aislados a partir de suelos agrícolas pueden competir con cepas comerciales en la promoción del crecimiento de plantas de chile poblano, además que la inoculación directa de HEE sobre la semilla genera mejores resultados y un mayor crecimiento en las plantas se asoció con la colonización endófitas.

## 6.7 Metabolitos que producen las bacterias endófitas

Las bacterias endófitas son fuentes de una gran diversidad de diferentes metabolitos, la mayoría de estos compuestos han sido identificados en las plantas, pero estas bacterias son una fuente inagotable de más de 20.000 compuestos biológicamente activos, que influyen en el rendimiento y supervivencia de otros organismos endófitas (Zambrano Basurto, 2022), además promueven el crecimiento vegetal de forma directa e indirectamente. La promoción directa del crecimiento vegetal implica la producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos para la captación de hierro del suelo y también facilitar la disponibilidad y absorción de nutrientes, por otra parte los mecanismos indirectos se deben a la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, actuando como agentes de biocontrol de fitopatógenos mediante la liberación de sideróforos,  $\beta$ 1, 3-glucanasas, quitinasas, antibióticos, entre otras (Mamani Huanca, 2019).

Las fitohormonas son las moléculas señal, que actúan como mensajeras químicas, controlando el crecimiento y desarrollo vegetal, entre las fitohormonas se encuentran el ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y ácido abscísico (ABA). El Ácido Indolacético (AIA) es una de las mayores auxinas fisiológicamente activas, producto del metabolismo del L-triptófano, y es producido por diversidad de microorganismos, que incluyen bacterias, hongos y levaduras. Al igual que otras fitohormonas (por ejemplo, las giberelinas), el AIA es un compuesto esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, teniendo efectos, principalmente sobre la elongación y división celular, promoviendo el crecimiento del tallo, y en las raíces, estimulando su crecimiento y desarrollo (Dector-Arriaga, 2023). Por otro lado, existen metabolitos generados por microorganismos que también son empleados en el control biológico de enfermedades de cultivos agrícolas generadas por fitopatógenos, algunos ejemplos de metabolitos microbianos reportados por su supresión de patógenos en las plantas son: Iturina A producido por *Bacillus subtilis* QST713, metabolito implicado en la inhibición de *Botrytis cinerea* y *R. solani*, que afectan cultivos agrícolas. Pirrolnitrina

producido por *Burkholderia cepacia* como inhibidor del crecimiento de *R. solani* y *Pyricularia oryzae* (Mamani-Huanca, 2019).

## 6.8 Uso de bacterias endófitas para el control de hongos fitopatógenos

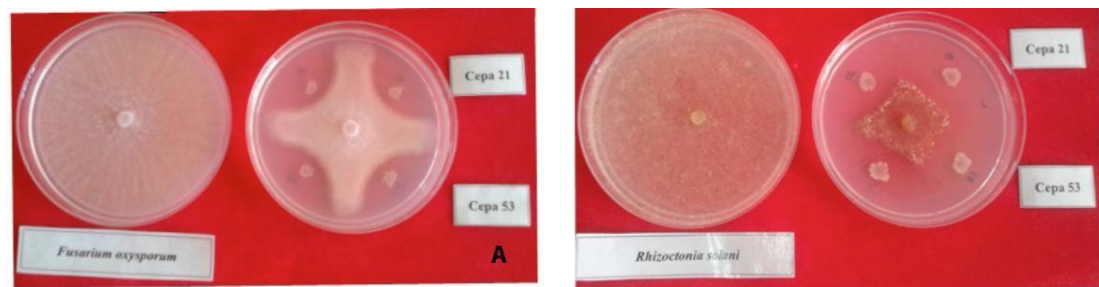
La capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos se ha reportado en ciertos géneros bacterianos como: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* entre otros. Por ejemplo, se reportó que *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia* sp., tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, debido a que producen metabolitos activos que tienen efecto antagónico e inhiben el crecimiento de hongos como son *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *Alternaria alternata* (Mamani-Huanca, 2019).

Castro del Ángel et al., (2021) hicieron una investigación acerca de la actividad antifúngica de dos aislamientos endófitos de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium verticillioides* bajo condiciones de laboratorio e invernadero y obtuvieron valores del 59 al 62% de inhibición *in vitro* en cultivos duales del hongo fitopatógeno, además que las bacterias endófitas redujeron la incidencia y la severidad de *F. verticillioides* más del 80% en las plantas que recibieron el tratamiento con respecto al testigo (Figura 3), así mismo, inocularon plantas de frijol con bacterias endófitas contra *R. solani* y *F. oxysporum*, donde evaluaron la respuesta de inducción de resistencia contra estos hongos fitopatógenos. Los resultados evidenciaron que los microorganismos endofíticos promueven los mecanismos de defensa en frijol, pudiendo propiciar resistencia contra *F. oxysporum* y *R. solani*.

Rojas Badía et al., (2017) evaluaron el efecto antagónico *in vitro* de 14 aislados de *Bacillus* frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* (Schldtll) y *Fusarium moniliforme* (Sheld), que afectan cultivos hortícolas. Estos investigadores hallaron que solo nueve aislados de *Bacillus* mostraron inhibición sobre *F. oxysporum* por encima de 80%, así como que seis aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *F. moniliforme* después de los 15 días de incubación, se demostró el

elevado potencial de cepas de *Bacillus* como antagonistas de *Fusarium*, fitopatógeno de cultivos hortícolas y permitió la selección de los aislados endófitos como promisorios para el control biológico de estos hongos.

Loor et al. (2020) demostraron la actividad inhibitoria *in vitro* de nuevos aislados de bacterias endófitas formadoras de endosporas, pertenecientes a la clase Bacilli, con potencialidades para el control biológico del agente etiológico de la moniliasis del cacao. Obtuvieron resultados que constituyen el primer paso hacia la selección de cepas eficientes para el biocontrol de este hongo fitopatógeno.



**Figura 3.** Inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* (A) y *Rhizoctonia solani* desarrollado en medio PDA (B). Tomado de Castro-del Ángel et al. 2021.

## 6.9 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Se conoce que un número considerable de especies bacterianas asociadas a la rizosfera, filosfera y endosfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en su crecimiento. Este grupo de bacterias llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés: *plant growth promotion rhizobacteria*), se caracterizan por su habilidad de incrementar diferentes parámetros de crecimientos, estos efectos se explican por su capacidad de fijar nitrógeno, producción de fitohormonas, enzimas, solubilización de fosfatos y protección de las plantas contra fitopatógenos. Este término fue introducido por Kloepper y Schroth para referirse a

aquellas comunidades bacterianas del que son suelos capaces de colonizar diferentes órganos de las plantas. Los mismos autores en 1981, ampliaron este concepto, incluyendo dentro de la denominación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal a todos aquellos microorganismos capaces de estimular el crecimiento de las plantas posterior a la colonización (Cabrera et al., 2018). Como describieron Kloepper y más recientemente Gray y Smith, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden también penetrar al interior de las raíces y establecerse como poblaciones endófitas (Rives et al., 2007).

El uso de PGPR en la agricultura sostenible se ha vuelto más importante en las últimas décadas, debido a sus efectos benéficos sobre el suelo y sobre la productividad de los cultivos, así como por su impacto en la reducción del uso de fertilizantes químicos, para cuya producción se emplean vastas cantidades de combustibles fósiles, por lo que la reducción en su uso está alineada con las políticas de conservación del medio ambiente y la desaceleración del cambio climático. En este grupo de PGPR, los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* destacan por sus mayores aportes en la agricultura (Buitrago et al., 2021).

### **6.9.1 *Azospirillum***

*Azospirillum* es una de las PGPR más ampliamente estudiada y utilizada comercialmente en la agricultura. Pertenece a la clase *Alphaproteobacteria* y es una bacteria fijadora de nitrógeno que ejerce un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento de muchos cultivos. Puede colonizar la parte interna y externa de la raíz, donde las bacterias tienden a formar pequeños agregados; sin embargo, también es posible encontrar células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie de la raíz. El efecto de su inoculación sobre pastos, cereales y legumbres ha sido mostrado en gran nivel de detalle (Loredo-Osti et al., 2004).

### **6.9.2 *Herbaspirillum***

*Herbaspirillum* es un género de PGPR que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir sideróforos, además de que modula el desarrollo radicular por medio de la producción de diferentes reguladores del crecimiento vegetal, la combinación de estos mecanismos puede contribuir a mejorar la eficiencia del uso de fertilizantes nitrogenados en cultivos de importancia agrícola. Adicionalmente, se han estudiado en procesos de fitorremediación, estimulando la fitoextracción de metales pesados por medio de la producción de compuestos asociados a la promoción del crecimiento vegetal (Punschke & Mayans, 2011).

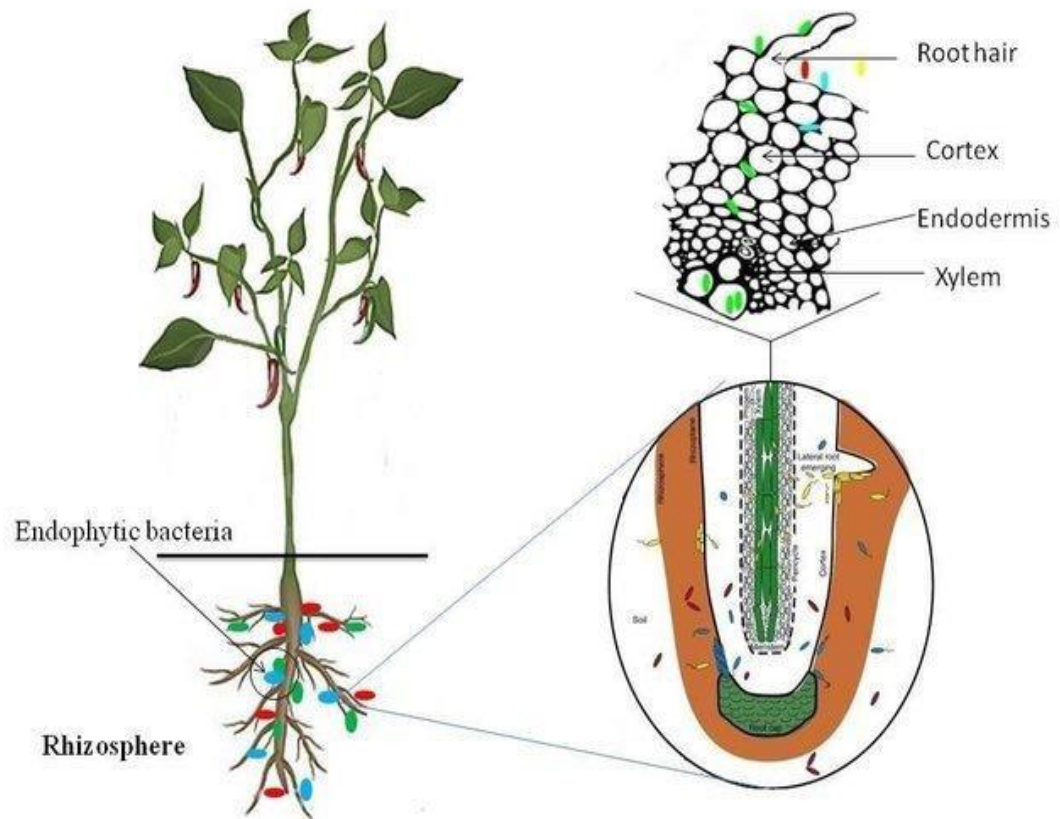
Los cultivos hoy en día están siendo afectados por enfermedades de etiologías microbianas, causadas por hongos fitopatógenos en los que destaca el género *Fusarium*. Este hongo penetra las plantas y obstruye los vasos del xilema donde colapsan e impiden el flujo de nutrientes ocasionando marchitez y la muerte para las plantas. *Fusarium*, además, produce un grupo de enzimas que degradan la pared celular de la planta, facilitando el proceso de infección y afectando otros órganos como tallos, flores y frutos. (Velasco-Belalcázar et al., 2019). Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control contra fitopatógenos en diversos cultivos, debido a que las bacterias endófitas colonizan el mismo nicho ecológico compitiendo con fitopatógenos, exhibiendo un potencial como agentes de “control biológico” y esto las hace como una alternativa amigable y de bajo costo para el control de hongos fitopatógenos (Mamani Huanca, 2019). Diversos tipos de géneros bacterianos, incluyendo *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Rhizobium* y *Serratia*, han sido potencialmente considerados como PGPB (Ngalimat et al., 2021).

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias endófitas exhiben notables capacidades, tales como la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización del fosfato del suelo y la mineralización de macro y microelementos esenciales



(Gamez, 2024). Entre los cultivos de importancia en los que las bacterias endófitas han demostrado su capacidad promotora del crecimiento vegetal se encuentran la papa, tomate, arroz, además de otras cosechas anuales como trigo, haba, lechuga, frijol, maíz, cebada y otras plantas. La caña de azúcar es un cultivo ampliamente estudiado en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno por parte de bacterias diazótrofes que aportan el requerimiento de nitrógeno a la planta, minimizando así, la cantidad de fertilizantes adicionados (Dector-Arriaga, 2023).

Las interacciones entre plantas y microbios que promueven la salud y el desarrollo de las plantas han sido objeto de considerables estudios para la agricultura sostenible. Se hace evidente un renovado interés en la colonización interna de plantas sanas por bacterias no rizobianas y en la explotación de su potencial en la agricultura. Las bacterias de la rizosfera que pueden colonizar fácilmente las raíces y los tallos internos son una fuente importante de endófitos y, a menudo, las bacterias de la filosfera también pueden ser una fuente de endófitos (Figura 4). Aunque cada planta individual que existe en la tierra es hospedadora de uno o más endófitos, solo unas pocas de estas plantas han sido estudiadas completamente en cuanto a su biología endófitas (Audipudi et al. 2017).



**Figura 4.** Rutas de colonización de plantas por bacterias endófitas, tomado de Audipudi et al. 2017.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Aislamiento de cepas antagónicas

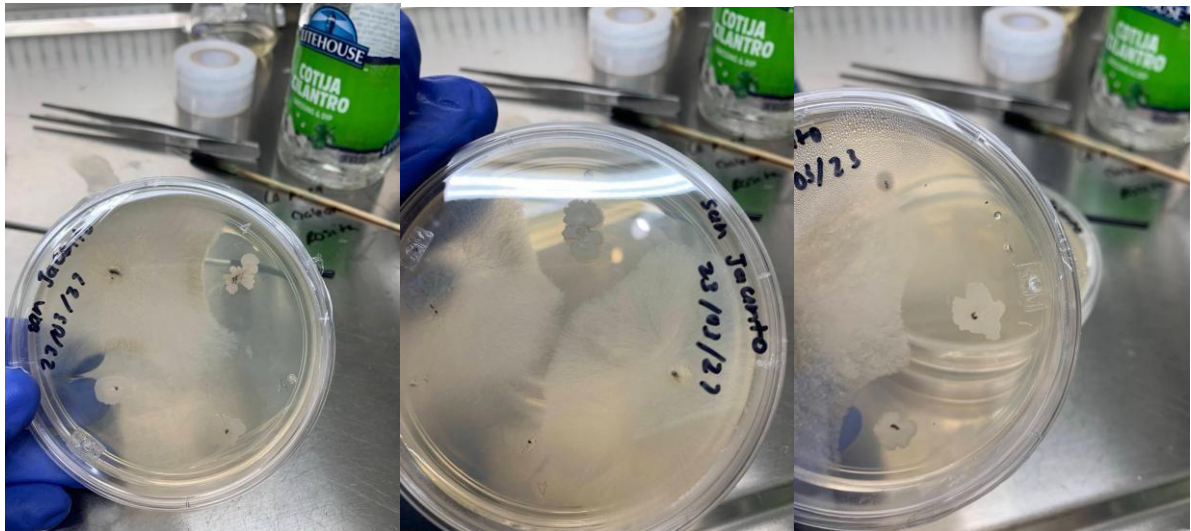
Se colectaron raíces de 20 árboles de pino de la localidad Cañón de caballos, Saltillo Coahuila (25°14'47.63", 100°53'07.84"), esta localidad tiene clima árido, semicálido, temperatura entre 18°C y 22°C, temperatura del mes más frío menor de 18°C, temperatura del mes más caliente mayor de 22°C, lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal del 5% al 10.2% del total anual.

Las raíces se cortaron en fragmentos de 1 cm con la ayuda de un bisturí y se lavaron con agua de la llave en un colador para no perder el material vegetal. Se desinfectaron en una serie de pasos que constituyeron: 5 minutos en peróxido de hidrógeno al 3%, lavado con agua destilada estéril, 1 minuto en etanol al 70%, lavado con agua estéril, 1 minuto en solución clorada al 6% y dos lavados con agua destilada estéril (Figura 5).



**Figura 5.** Desinfección de raíces de *Pinus cembroides* para el aislamiento de microorganismos endófitos.

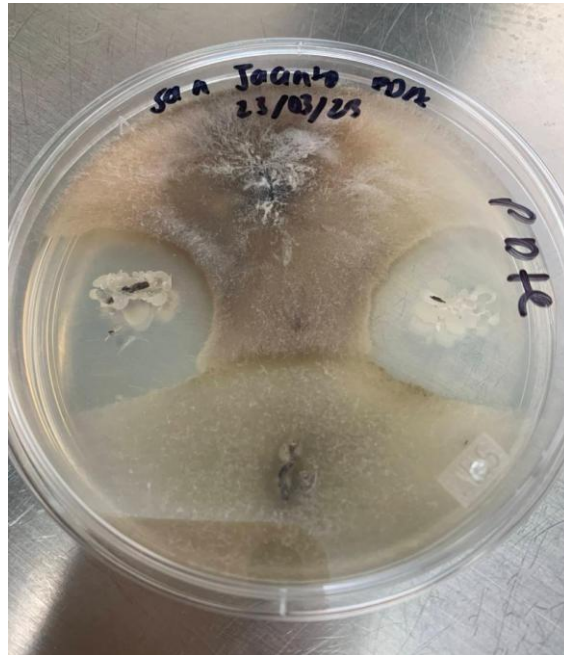
Las raíces se secaron con la ayuda de unas pinzas en papel secante estéril y se sembraron en agar PDA con la búsqueda de bacterias y hongos endófitos. Las placas se incubaron durante 72 horas y se eligieron aquellas cajas que tuvieran presencia de colonias adheridas a la raíz y se aislaron y sembraron en agar PDA (Agar de Dextrosa y Papa) (Figura 6).



**Figura 6.** Aislamiento de bacterias endófitas con capacidad antagónica.

Se aislaron un total de 16 cepas de bacterias antagónicas las cuales fueron etiquetadas como J5-3, J5-1, J5-4, J4-2, J2-1, J3-2, J3-5, J4-1, J3-1, J1-2, J3-4, J3-6, J1-3, J1-4, J4-3, y, J5-2.

Se realizó una prueba preliminar para escoger las cepas de bacterias que tuvieran mayor actividad antimicrobiana contra *Alternaria* sp. para ello, se colocó un disco de la cepa *Alternaria* sp. en el centro de una placa Petri con agar PDA y alrededor del disco (en 4 lugares diametralmente opuestos) y separados a 0.5 cm de la pared de la caja Petri (Figura 7).



**Figura 7.** Prueba preliminar de antagonismo contra *Alternaria* sp. de las cepas de bacterias obtenidas.

## 7.2 Identificación de cepas bacterianas por técnicas de biología molecular

### 7.2.1 Obtención de inóculo bacteriano para la extracción de ADN

La identificación de las cepas se llevó a cabo por amplificación del gen 16S ADNr. Se propagaron las cepas en medio de Czapek-Dox con glucosa al 30% durante 4 días (Tabla 2) para obtener una mayor producción de biomasa, la cual fue centrifugada a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y a partir de la pastilla, se procedió a la extracción del ADN.

**Tabla 2.** Composición del medio Czapek-Dox

Componente	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.04
MgSO <sub>4</sub>	1.52
KCl	1.52
NaNO <sub>3</sub>	0.32
Glucosa	30.00

### 7.2.2 Método de Dumolin para la extracción de ADN de bacterias aisladas

Se siguió el protocolo de Dumolin *et al.* (1995), la pastilla de bacteria, se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 850 µL de amortiguador de extracción [EDTA 20 Mm, Tris-HCl pH 8.0 0.1 M, NaCl 1.4 M, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2 %, β-mercaptoetanol 1 % y PVP (polivinilpirrolidona) 1 % más 20 µL de proteinasa K con 5 min de zonificación para el caso de bacterias), mismas que se incubaron a 55 °C por 60 min: posteriormente las muestras se dejaron enfriar durante 1º min y se le agregaron 400 µL de diclorometano (cloruro de metileno) y se centrifugó a 10,000 rpm x g por 5 min a 4°C. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 400 µL de isopropanol. Las muestras se incubaron en congelación durante 24 hrs a -20°C. Una vez pasada las 24 horas se centrifugaron a 13,000 rpm x g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y se les agregó y se les agregó al pellet formado 1 ml de etanol al 76% y se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm x g por 10 min a 4°C. Se desechó el etanol y el pellet formado se dejó secar durante 10 min en una liofilizadora añadiendo 100 µL de buffer TE 0.1X y se almacenó a -20 °C.

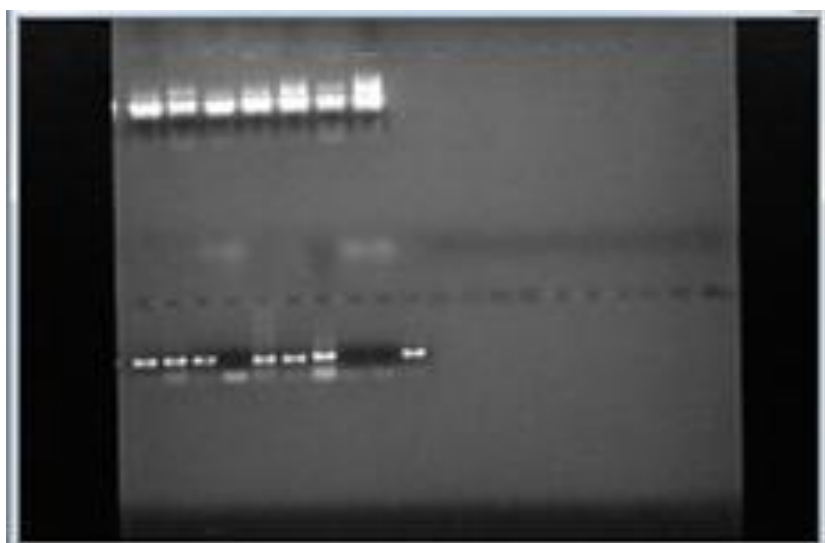
### **7.2.3 Método CTAB modificado para la extracción de ADN de bacterias aisladas**

La pastilla obtenida del paso de centrifugación se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 600 µL de amortiguador salino (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0, NaCl 2 M, albúmina sérica 0.05 %), se mezcló con un vórtex y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 7500 rpm x g por 5 min y el sobrenadante se decantó y se agregaron 600 µL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 Mm pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2.0 %) y 3 µL de β-mercaptoetanol, más 20 µL de proteinasa K con 5 min de zonificación; la muestra se mezcló con vortex e incubó a 55 °C por 60 min. Posteriormente se agregaron 400 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 11,500 rpm x g por 10 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregaron 600 µL de isopropanol (-20 °C), se homogeneizó por inversión y se dejó reposar 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 7500 rpm x g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de etanol al 75 % (-20 °C), se agitó en vórtex y se centrifugó a 7500 rpm x g por 4 min. El sobrenadante se decantó y se evaporó el etanol. La pastilla de ADN se suspendió en 100 µL de agua.

### **7.2.4 Calidad del ADN; Electroforesis horizontal de agarosa al 1%**

Para la preparación del gel de agarosa al 1% se disolvieron 0.45 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M) en un vaso de precipitado, para su homogeneización se utilizó una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine para la formación de los pozos (evitando dejar burbujas en el gel). Se dejó solidificar el gel durante 15 a 20 minutos y se removió el peine. Para la preparación de las muestras de carga, sobre una tira de papel parafilm se colocó una gota (1 µl) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 µg/mL de red

gel), y se colocaron 5  $\mu$ l del ADN de una muestra y 4  $\mu$ l de marcador molecular 100 pb marca Axygen, posteriormente se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces con ayuda de una micropipeta. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90-95 volts por 45 minutos. Una vez pasado el tiempo otorgado, se logró la visualización de las bandas correspondientes a cada gen, esto con ayuda del Transiluminador de luz UV (Figura 8).



**Figura 8.** Gel de electroforesis en Transiluminador de luz UV del DNA obtenido de bacterias aisladas.

### **7.2.5 Cuantificación de ADN por el método de absorbancia**

Para la cuantificación de ADN, se diluyó la muestra de ADN tanto del método de Dumolin como el método CTAB a una dilución 1:100, para ello, se tomaron 2  $\mu$ l del ADN obtenido y se mezclaron con 198  $\mu$ l de agua inyectable estéril. El ADN se mezcló gentilmente subiendo y bajando con una pipeta. Se esperó a que las burbujas se aclararan y se utilizó TE en la celda de referencia (en blanco), se midió la absorbancia a 280 nm y 260 nm.



Se calcularon los valores de A280 y A260 en donde la concentración de ADN en ng/ $\mu$ L = A260  $\times$  100 (factor de dilución)  $\times$  50 (factor de conversión) y el cociente A260/A280 para identificar la pureza (contaminación con proteínas), se realizó al dividir el A260 corregido por el A280 corregido.

### 7.2.6 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Una vez obtenidos los valores de absorbancia de ADN y el cociente A260/A280 de ambos métodos y, visualizando el gel en el transiluminador para cotejar la buena calidad para las técnicas de extracción de ADN (banda nítida y gruesa), se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S empleando los iniciadores (27f/1492r; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'/5'CTACGGCTACCTTGTACGA-3').

Las muestras se vertieron en microtubos de 0.2 ml (se etiquetaron respecto a su gen correspondiente) y se incubaron en el refrigerador y/o congelador para su conservación. Antes de su utilización se colocaron en hielo durante 8 min para que se descongelaran gradualmente y se agitaron en el vortex (5 segundos) para una mayor dilución.

Se realizó el cóctel colocando en un tubo de 0.6 ml los reactivos que se muestran en la tabla 3, se utilizó el buffer Taq<sup>TM</sup> polimerasa 2X Boline®

**Tabla 3.** Composición del cóctel para la reacción de PCR para identificación gen 16S para bacterias

Reactivos	Cantidad (para 1 muestra)
Agua destilada desionizada estéril	19 $\mu$ l
Buffer myTaq PCR 10x	25 $\mu$ l
Iniciador fwd 5'-3' (20mM)	1.0 $\mu$ l
Iniciador rev 3'-5' (20mM)	1.0 $\mu$ l
ADN	4.0 $\mu$ l

---

Se depositaron 46  $\mu$ l del cóctel en un tubo de 0.2 ml y se adicionaron 4  $\mu$ l del ADN de la muestra mezclando con una micropipeta. Los tubos se introdujeron al Termociclador marca Labnet donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador. Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada muestra.

### **7.2.7 Electroforesis horizontal de agarosa al 3%**

En un vaso de precipitado se disolvieron 4.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de papel parafilm se colocó una gota (1  $\mu$ l) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60  $\mu$ g/mL de red gel), se colocaron 5  $\mu$ l del ADN de una muestra (4  $\mu$ l de marcador molecular 600 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente al gen.

### **7.2.8 Secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR punto final**

Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental (LANBAMA) ubicado en San Luis Potosí México. Para la secuenciación del amplificado se utilizaron los iniciadores (27f/1492r; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3').

La búsqueda de homología de secuencias se llevó a cabo empleando la herramienta BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

### **7.3 Identificación de hongos fitopatógenos por técnicas de biología molecular**

#### **7.3.1 Obtención de hongos fitopatógenos**

Las cepas probadas fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Fusarium osyxporum*, *Fusarium verticilloide* y *Samsoniella hepiali*. Estas fueron donadas por el departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y el departamento de microbiología de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, estas cepas estaban identificadas a nivel de género y especie por pruebas taxonómicas sin embargo no tenían su identificación por técnicas de biología molecular por lo que se procedió a la extracción de ADN, PCR y Secuenciación.

#### **7.3.2 Extracción de ADN de hongos filamentosos**

Para la extracción de ADN de hongos filamentosos, se usaron 200 mg de tejido fúngico, para ello, se usaron placas petri con micelio de cada cepa (2 repeticiones), se molieron con la ayuda de nitrógeno líquido (Figura 9) hasta obtener un polvo fino.



**Figura 9.** Obtención de tejido micelial de hongos usando nitrógeno líquido.

El siguiente paso fue la extracción de ADN por el método de Dumolín, en el cual se dejó incubar a 60°C durante 1 hora con el buffer de extracción, para este paso, no se usó la proteinasa K y los pasos posteriores a este proceso, están descritos en la metodología para bacterias endófitas.

### **7.3.2 Método de CTAB modificado para hongos fitopatógenos**

La extracción de ADN por el método de CTAB consistió en tomar 200 mg de micelio molido con la ayuda de nitrógeno líquido, se dejó incubar a 60°C durante una hora con el buffer de extracción, para este método, no se usó la proteinasa K y, los pasos posteriores a este proceso están descritos en la metodología para bacterias endófitas.

### **7.3.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para hongos filamentosos**

Una vez obtenidos los valores de absorbancia de ADN y el cociente A260/A280 de ambos métodos y, visualizando el gel en el transiluminador para cotejar la buena calidad para las técnicas de extracción de ADN (banda nítida y gruesa), se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN de la región interna espaciadora ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (ADNr) 18S - 5.8S y 5.8S-28S al utilizar los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') / ITS2 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990).

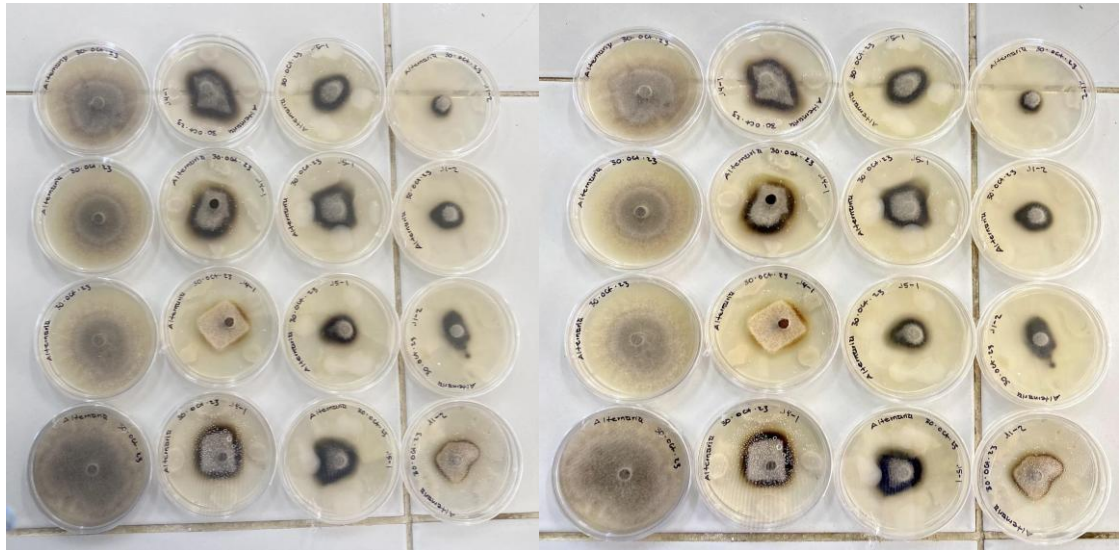
Las muestras se vertieron en microtubos de 0.2 ml (se etiquetaron respecto a su gen correspondiente) y se incubaron en el refrigerador y/o congelador para su conservación. Antes de su utilización se colocaron en hielo durante 8 min para que se descongelaran gradualmente y se agitaron en el vortex (5 segundos) para una mayor dilución.

Se realizó el cóctel colocando en un tubo de 0.6 ml los reactivos que se muestran en la tabla X, se utilizó el buffer Taq™ polimerasa 2X Bioline ®

#### **7.4 Prueba de efectividad antagónica contra *Alternaria* sp.**

Para la prueba de efectividad, se hizo una prueba preliminar para identificar la patogenicidad de las cepas bacterianas aisladas, las 16 cepas obtenidas se evaluaron en una prueba antagónica con *Alternaria* sp. (Figura 10).

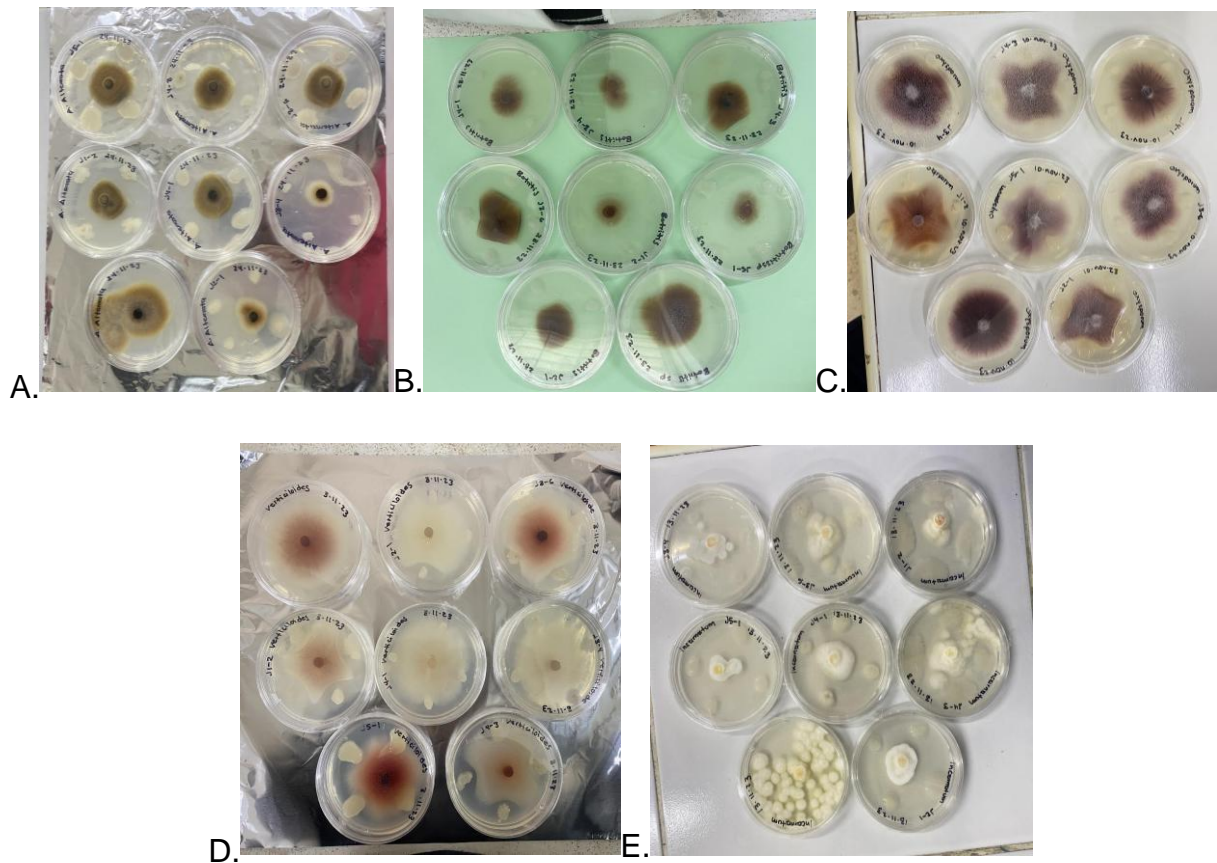
Para cada cepa bacteriana endófito obtenida, se realizaron 4 repeticiones por prueba en el cual, se colocó un explante de 0.5 cm de diámetro del hongo *Alternaria* sp. al centro de la placa y con un asa bacteriológica se colocaron cuatro puntos diametralmente opuestos a 3 cm del explante y 0.5 cm de la pared de la placa. Se incubaron a 25°C durante una semana y transcurrido el tiempo de incubación, se midió con la ayuda de una regla, el crecimiento radial del hongo (se realizó un promedio del lado por el ancho del crecimiento). Esto permitió la selección de 7 cepas (J1-2, J4-1, J5-1, J2-1, J3-4, J3-6, J4-3) que mostraron mejor antagonismo frente al hongo.



**Figura 10.** Cepas de bacterias antagonicas en contacto con el hongo *Alternaria* spp.

#### **7.4.1 Evaluación de efectividad antagonica frente a hongos fitopatogénicos.**

Se usaron en esta segunda prueba los hongos *Alternaria alternata* (Figura 11A), *Fusarium* sp. (Figura 11B), *Fusarium osyxporem* (Figura 11C), *Fusarium verticiloides* (Figura 11D) y *Samsoniella hepiali* (Figura 11E), estos hongos fueron identificados molecularmente. Se colocó un disco de 0.5 cm aproximadamente de diámetro de cada hongo en cajas Petri y se colocaron 4 puntos diametralmente opuestos de la cepa bacteriana endófito a analizar alrededor del disco a una distancia de 3 cm. Se sembraron 4 repeticiones de cada cepa bacteriana endófito por hongo y se incubaron durante 7 días a 25°C hasta que el testigo con el explante del hongo y sin bacterias llenara la placa Petri. Los datos que se registraron fueron de crecimiento radial considerando el largo por el ancho y realizando un promedio de estas dos lecturas.



**Figura 11.** Hongos fitopatógenos frente a cepas bacterianas (J1-2, J4-1, J5-1, J2-1, J3-4, J36, J4-3) 7 días después de su incubación. A. *Alternaria alternata*, B. *Fusarium* sp., C. *Fusarium osyxporum*, D. *Fusarium verticilloides*, E. *Samsoniella hepiali*.

## 7.5 Prueba de inoculación de bacterias endófitas en plántulas de tomate

### 7.5.1 Obtención de la plántula

Para obtener las plántulas de tomate, se utilizó la variedad Floradade que se encontraba en refrigeración. Se esterilizó sustrato compuesto por 50% peat moss y 50% perlita y se esterilizó en la autoclave a 120°C, 1.5 libras de presión por 2 horas.

Se utilizó un semillero de germinación el cual se llenó con el sustrato estéril y se le colocaron de 2 a 3 semillas de tomate en cada pocillo (Figura 12A) debido a que la semilla ya tenía varios meses de haberse adquirido.

A los 4 días posteriores de la siembra, se comenzó a ver surgimiento de las plántulas (Figura 12B) y a los 8 días después de su crecimiento se trasladaron 40 plántulas (10 plántulas para cada tratamiento más el testigo) en vasos de unicel de 500 mL (Figura 12C).

La inoculación con las bacterias endófitas se realizó a los 15 días posteriores al trasplante (Figura 12D).



**Figura 12.** A. Siembra de tomate variedad Floradade en semilleros con sustrato estéril. B. Plántulas de tomate con cuatro días de emergencia. C. Trasplante de las plántulas a los 15 días de emergencia.

### 7.5.2 Preparación del inóculo de bacterias endófitas para las plántulas.

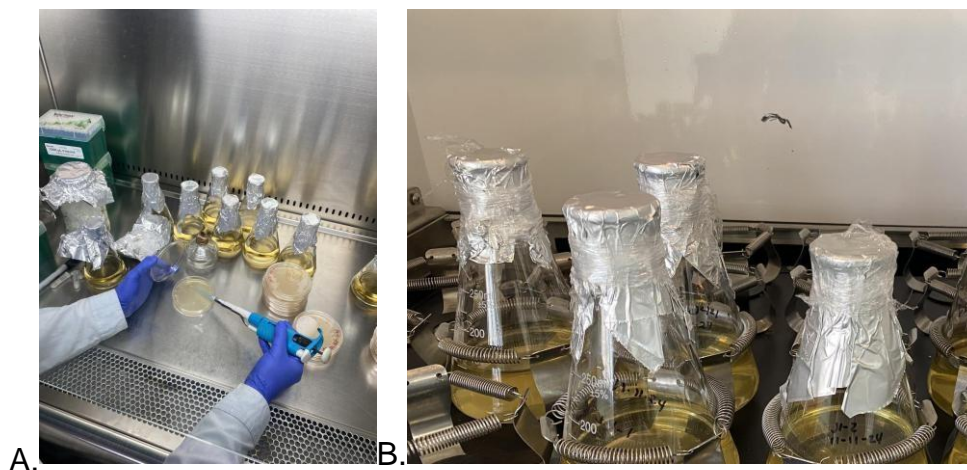
Para la preparación del inóculo se pesaron 14.4 g de caldo nutritivo y se mezclaron en 1.8 L de agua destilada mezclando hasta homogeneizar (Tabla 4).



**Tabla 4.** Componentes de caldo nutritivo para 1.8 L de agua purificada

Componente	g/L
Peptona de gelatina:	9 g
Extracto de carne:	5.4 g

Una vez obtenido el caldo nutritivo, se vaciaron 150 ml de la mezcla en 12 matraces con la misma concentración cada uno. Para la preparación del inóculo, se seleccionaron las cepas bacterianas que tuvieron mejor inhibición (J5-1, J4-1, J1-2), las cuales se encontraban en placas Petri. Se les agregó 3 mL de medio nutritivo a cada placa Petri y con ayuda de la micropipeta y una puntilla se hizo un ligero raspado de la bacteria para poder obtener una mejor concentración de la muestra (Figura 13A). Se hicieron tres repeticiones por cepa agregando 1 mL del raspado de la muestra en cada uno de los matraces y para el testigo únicamente fueron las tres repeticiones de caldo nutritivo sin bacteria. Los inóculos más el testigo se metieron en una incubadora Shaker (Figura 13B) a 150 rpm con una temperatura de 28°C para mantener los microorganismos en un ambiente controlado durante las próximas 48 horas, después se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.



**Figura 13.** Proceso de elaboración del inóculo. A. Raspado de las cepas bacterianas y agregación a los medios de caldo nutritivo, B. Incubación en Shaker a 150 rpm y temperatura ambiente (28°C).

### 7.5.2.1 Determinación de la concentración del inóculo por escala de McFarland (1907)

Se prepararon los diez patrones de turbidez de la escala de MacFarland, con cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1% (Tabla 5). Cada patrón de turbidez representó una concentración bacteriana, expresada en un número aproximado de bacterias viables  $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$  (Arcos et al., 2004).

Para la cuantificación de bacterias en el medio de cultivo, la densidad óptica de los diez patrones de la escala de MacFarland se determinó a 540 nm, usando tres réplicas para cada patrón de turbidez.

**Tabla 5.** Preparación de la escala de McFarland. Tomado de Arcos et al. 2004

Patrón N°	Cloruro de bario 1% (ml)	Ácido sulfúrico 1% (ml)	Concentración bacteriana (células X $10^8 \text{ ml}^{-1}$ )
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

De acuerdo con los datos de densidad, se ajustó la concentración de cada muestra a  $20 \times 10^8$  células por mL.

### 7.5.2.2 Conservación de cepas bacterianas

Existen varios métodos para la conservación de bacterias. Para las cepas de bacterias antagonistas utilizadas en esta investigación se utilizó el método de glicerol al 10%. Este método consiste en congelar las células (en este caso células bacterianas) en suspensión en un líquido con glicerol utilizado como criopreservante protegiéndolas durante el proceso de congelación y descongelación.

En un matraz Erlenmeyer con 90 mL de agua destilada se le agregó 10 mL de glicerol, la muestra se mezcló para una mejor homogeneización y se esterilizó en la autoclave ya que la alta presión y temperatura de este método no altera su estructura química ni sus propiedades.

### 7.5.3 Inoculación de plántulas de tomate

Las plántulas se inocularon 15 días después de la emergencia de las plántulas, se les ajustó la concentración a  $20 \times 10^8$  células por mL con la escala de McFarland realizada (Figura 14).

Las plántulas se estuvieron inoculando cada semana durante tres semanas y al mes después del trasplante, se tomaron los datos agronómicos de las plántulas



**Figura 14.** Inoculación de las plántulas de tomate con bacterias endófitas 15 días después del trasplante.

Las plántulas se colocaron en invernadero a 16 horas luz, 8 oscuridad a una temperatura aproximadamente de 28°C, el término del ensayo fue a los 30 días después del trasplante (Figura 15), se realizaron 10 plantas por tratamiento.



**Figura 15.** Establecimiento del ensayo con bacterias endófitas en plántulas de tomate

#### **7.5.4 Determinación de variables agronómicas de plantas inoculadas**

Una vez transcurrido el tiempo en invernadero, se tomaron las variables: longitud de raíz, altura de la planta, diámetro de tallo, peso fresco de la raíz, peso fresco del tallo (Figura 16) con la ayuda de un vernier para el diámetro de tallo y una regla para la altura y longitud de raíz. Tanto el peso fresco de raíz y tallo se determinó en una balanza analítica.



**Figura 16.** Determinación de variables agronómicas en plántulas de tomate inoculadas con bacterias endófitas.

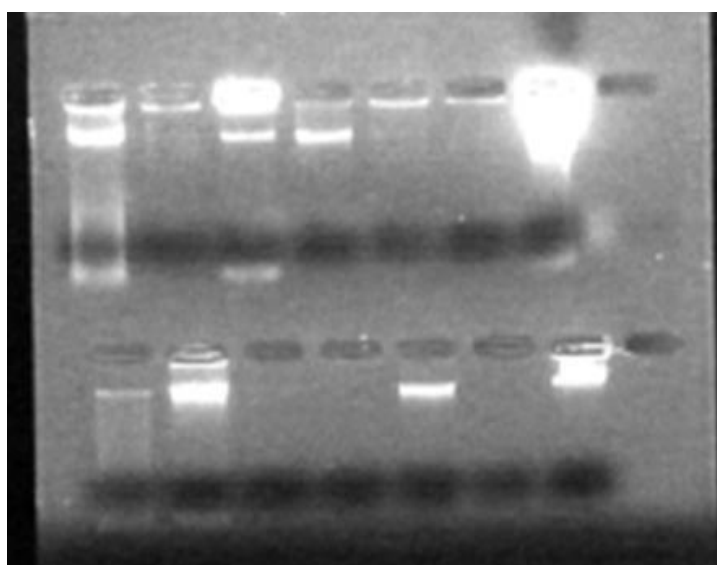
## 7.6 Análisis estadístico

Tanto los valores de crecimiento radial del hongo con las cepas utilizadas y las variables agronómicas se analizaron mediante un análisis de varianza y separación de medias por el método de Tukey utilizando el programa R cran gui versión 4.2.3. Se consideraron los tratamientos significativos cuando  $p < F$  fue menor a 0.05.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Métodos de extracción de ADN de bacterias

En la Figura 17, se muestra el gel de agarosa observado en el transiluminador UV, se observa que el método de Dumolin (parte de arriba) fue el que mostró mayor cantidad de bandas y más claras en comparación al método CTAB (parte de abajo).



**Figura 17.** Gel de agarosa al 1.3% con ADN de las técnicas realizadas, arriba= método de Dumolin, abajo= método de CTAB

En cuanto a la calidad y concentración de ADN obtenido por ambos métodos, se observa que en algunas cepas se obtuvo mejor calidad en el método de Dumolin (J1-2, J4-3, J3-6) y en el caso de la cepa J2-1, J4-3 y J4-1, el método de CTAB presentó mejor calidad, esto al determinar el cociente 260/280 mayor a 1.5

Los resultados de concentración por el método de Dumolin variaron de 7.5 ng totales a 129.5 (Tabla 6) mientras que en CTAB de 4 ng a 243 ng (Tabla 7).

**Tabla 6.** Concentración de ADN bacteriano por el método Dumolin  
**Método Dumolin (1995)**

Cepa identificada	$\lambda$ 260	$\lambda$ 280	R	ug/ml	ug totales (50 ul)
J2-1	0.03	0.081	0.37	150	7.5
J1-2	0.048	0.018	2.66	240	12
J3-4	0.071	0.098	0.72	355	17.75
J4-3	0.077	0.057	1.35	385	19.25
J5-1	0.518	0.099	5.23	2590	129.5
J3-6	0.032	0.016	2	160	8
J4-1	0.094	0.029	3.24	470	23.5

**Tabla 7.** Concentración de ADN bacteriano por el método CETAB  
**Método CTAB modificado**

Cepa identificada	$\lambda$ 260	$\lambda$ 280	R	ug/ml	ug totales (50 ul)
J2-1	0.088	0.051	1.72	440	22
J1-2	0.05	0.145	0.34	250	12.5
J3-4	0.016	0.068	0.23	80	4
J4-3	0.246	0.114	2.15	1230	61.5
J5-1	0.066	0.143	0.46	330	16.5
J3-6	0.025	0.076	0.32	125	6.25
J4-1	0.972	0.052	18.69	4860	243

## 8.2 Identificación de bacterias endófitas por PCR punto final

Se encontró el género *Bacillus* y *Brucella* en las cepas aisladas (Tabla 8). El porcentaje de identidad para la cepa J2-1 fue de 95.56% con *Brucella intermedia* (número de acceso GenBank MK249656.1) y el 94.93% con *Bacillus subtilis* (Número de acceso GenBank HQ256520.1) para la cepa J3-6 indicando que es necesario un análisis filogenético para poder identificar mejor el taxón obtenido.

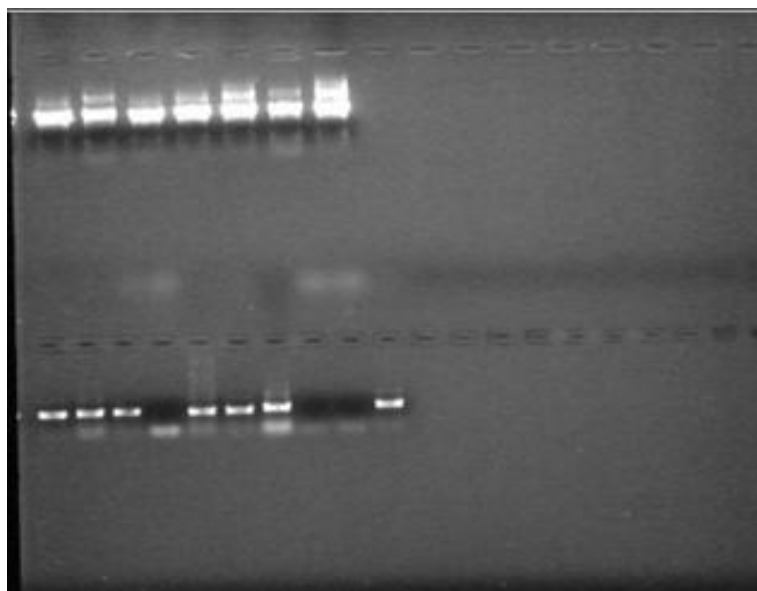
Se identificó a la especie *Bacillus atrophaeus* con un 100% de identidad para las cepas J3-4 y J5-1 (Números de acceso MT434773.1 y KU836511.1 respectivamente) y 99.86% con la cepa J4-2 (número de acceso MN826517.1) y 95.86% *Bacillus atrophaeus* con el número de acceso KJ469797.1 de la cepa J4-1.

**Tabla 8.** Identificación de las secuencias obtenidas de cepas endófitas en base de datos GenBank.

Cepa	Organismo identificado	% de identidad Genbank	Número de acceso GenBank
J2-1	<i>Brucella intermedia</i>	95.56%	MK249656.1
J3-6	<i>Bacillus subtilis</i>	94.93%	HQ256520.1
J1-2	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99.87%	MN826517.1
J3-4	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100%	MT434773.1
J5-1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100%	KU836511.1
J4-1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	95.86%	KJ469797.1
J4-3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99.86%	MN826517.1

### 8.3 Métodos de extracción de ADN de hongos

En la figura 18, se muestra el gel de agarosa observado en el transiluminador UV. Se puede observar que con el método Dumolin, se generaron las bandas más anchas que al método de CTAB (parte de abajo).



**Figura 18.** Gel de agarosa al 1.3% con ADN de las técnicas realizadas, arriba= método de Dumolin, abajo= método de CTAB, Hongos de izquierda a derecha= *Alternaria alternata*,



*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloides* y *Samsoniella hepiali*

Como se puede observar, los dos métodos mostraron buena calidad de bandas, solo el método de CTAB generó las bandas más delgadas (menor concentración de ADN). Respecto a la cuantificación de la concentración de ADN obtenido por ambos métodos, se muestra que se obtuvo mejor calidad con el método Dumolin (Tabla 9).

Los resultados de concentración se observan en las tablas 9 y 10, se aprecia que la mayor concentración de µg totales obtenidos fueron por el método de Dumolin donde variaron de 25 ng totales a 182.5 ng mientras que en CTAB de 7 ng a 41.25 ng (Tabla 10).

**Tabla 9.** Concentración de ADN por el método Dumolin

<b>Método Dumolin (1995)</b>					
<b>Cepa identificada</b>	<b>λ 260</b>	<b>λ 280</b>	<b>R</b>	<b>ug/ml</b>	<b>ug totales (50 ul)</b>
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.437	0.18	2.42	2185	109.25
<i>Alternaria alternata</i>	0.1	0.105	0.95	500	25
<i>Fusarium sp.</i>	0.245	0.178	1.37	1225	61.25
<i>Fusarium verticilloides</i>	0.73	0.25	2.92	3650	182.5
<u><i>Samsoniella hepiali</i></u>	<u>0.43</u>	<u>0.145</u>	2.96	2150	107.5

**Tabla 10.** Concentración de ADN por el método CTAB

<b>Método CTAB modificado</b>					
-------------------------------	--	--	--	--	--

Cepa identificada	$\lambda$ 260	$\lambda$ 280	R	ug/ml	ug totales (50 ul)
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.08	0.53	0.150	400	20
<i>Alternaria alternata</i>	0.028	0.135	0.207	140	7
<i>Fusarium sp.</i>	0.095	0.056	1.69	475	23.75
<i>Fusarium verticilloides</i>	0.111	0.171	0.64	555	27.75
<u><i>Samsoniella hepiali</i></u>	<u>0.165</u>	<u>0.077</u>	2.14	825	41.25

En la identificación de los hongos fitopatógenos, se encontraron los géneros *Fusarium*, *Alternaria* y *Samsoniella* en las cepas aisladas (Tabla 11). Los porcentajes de identidad de las cepas de los hongos estuvieron entre el 99%, donde se obtuvo para la cepa IN un 99.08% de identidad con *Samsoniella hepiali*, FO un 99.20% con *Fusarium verticilloides*, FC un 99.60% con *Fusarium oxysporum* y BO un 99.63% con *Fusarium sp.*

Se identificó a la cepa AA con el hongo *Alternaria alternata* con un 99.81%.

**Tabla 11.** Identificación de las secuencias obtenidas de cepas de hongos fitopatógenos en base de datos GenBank.

Cepa	Organismo identificado	% de identidad Genbank	Número de acceso GenBank
AA	<i>Alternaria alternata</i>	99.81%	KP794070.1
BO	<i>Fusarium sp.</i>	99.63%	KC895537.1
FC	<i>Fusarium oxysporum</i>	99.60%	MH3110044.1
IN	<i>Samsoniella hepiali</i>	99.08%	OR534531.1
FO	<i>Fusarium verticilloides</i>	99.20%	NN871568.1

#### 8.4 Prueba de antagonismo *in vitro*

En la tabla 12 se muestra el crecimiento radial a los 8 días después de la prueba de antagonismo con las cepas seleccionadas, se encontró que para el hongo *Alternaria alternata*, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (cepas de bacterias endófitas), pero sí una significancia alta contra el testigo en el cual se observa una inhibición del 55%. Camarena Lizarzaburu (2012), reportan la evaluación de la inhibición de cepas antagonistas frente al hongo *Alternaria alternata* después de 120 horas (5 días) de incubación. Las cepas antagónicas presentaron un efecto inhibitorio creciendo sobre el patógeno y actuando sobre el hongo por diferentes mecanismos de acción.

Para el hongo *Fusarium* sp, no se encontraron diferencias significativas entre las bacterias evaluadas, pero sí frente al testigo en la cepa J1-2, J2-1, J4-3, J3-4 y J51, el porcentaje de inhibición para estas cepas frente a *Fusarium* sp. fue varió del 17% al 45%. García López (2020) obtuvo resultados similares en la evaluación de cepas de *Bacillus* frente a *Fusarium* sp. en tiempos de 24, 48 y 72 horas de evaluación, con un 42.8% de inhibición frente al hongo.

Los datos obtenidos para el hongo *Fusarium oxysporum* con las cepas antagónicas J1-2, J2-1 y J4-3 sí mostraron diferencia significativa entre los demás tratamientos evaluados (J3-4, J3-6, J5-1) y el testigo, el porcentaje de inhibición de estas cepas que generó mayor porcentaje de inhibición frente a *Fusarium oxysporum* fue del 50% (J2-1). Los resultados fueron similares a los que obtuvieron Rubio-Tinajero et al. (2021), de dos cepas de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium oxysporum* donde indicaron que no hubo diferencia significativa entre las cepas y ambas disminuyeron el radio de crecimiento de *F. oxysporum* con un 49.6% de inhibición. Mismos autores (Rubio-Tinajero et al., 2021) igual mencionan que el efecto del antagonismo de *B. subtilis*, podría deberse a su producción amplia de compuestos bioactivos, entre los que destacan los lipopéptidos cíclicos (CLP) como la surfactina, iturina y fengycina. Además, *Bacillus* spp. produce antibióticos y enzimas. Por otro lado, Camezán y Lisset (2019) comprobaron la actividad antagonista de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum* en pruebas *in vitro* donde las cepas de *Bacillus* presentaron un porcentaje de inhibición antagonista mayor al generado en este trabajo del 64-71% frente a *F. oxysporum*.

El hongo *Samsoniella hepiali* no mostró diferencias significativas entre las cepas evaluadas, pero sí frente al testigo en la cepa J5-1, con un porcentaje de inhibición de esta cepa frente a *Samsoniella hepiali* del 37% (Figura 22).

Para el hongo *Fusarium verticilloides* si presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y el testigo en donde se observa que la cepa J1-2 inhibió un 50% el crecimiento del hongo (Figura 19). Mamani Huanca (2019), obtuvo resultados parecidos al realizar un ensayo de cepas antagónicas frente a *Fusarium verticilloides* en un periodo de 7 días de incubación con el patógeno, donde cuatro cepas evaluadas mostraron porcentajes de inhibición moderados contra *Fusarium verticilloides* en el rango de 50-71%. Adicionalmente, la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* presentó un porcentaje de inhibición moderado del 52%.

**Tabla 12.** Crecimiento radial de los hongos fitopatógenos evaluados con las cepas endófitas seleccionadas.

Tratamiento	<i>Alternaria alternata</i> (AA)	<i>Fusarium sp.</i> (BO)	<i>Fusarium oxysporum</i> (FC)	<i>Samsoniella hepiali</i> (IN)	<i>Fusarium verticilloides</i> (FO)
J1-2	3.08±0.14 b	3.16±0.38 b	4.28±0.10 b	3.58±0.52 ab	3.63±0.05 d
J2-1	2.83±0.28 b	3.41±0.38 b	4.56 ±0.40 b	3.91±0.17 ab	5.51±0.44 c
J3-4	2.75±0.50 b	2.91±0.38 b	6.25±0.00 a	4.25±1.08 ab	6.46±0.05 ab
J3-6	3.23±0.20 b	3.58±0.38 ab	6.00±0.25 a	6.25±2.04 a	5.70±0.69 bc
J4-1	3.36±0.12 b	3.50±0.43 ab	5.83±0.62 a	4.16±1.15 ab	6.03±0.16 bc
J4-3	3.08±0.28 b	2.91±0.14 b	4.78±0.20 b	4.03±0.62 ab	4.41±0.07 d
J5-1	3.73±0.27 b	2.58±0.38 b	6.41±0.14 a	2.41±0.14 b	5.76±0.20 bc
Testigo	5.00±0.75 a	4.65±0.72 a	6.25±0.25 a	6.50±1.32 a	7.18±0.07 a
Pr(>F)	4.44e-05 ***	0.000959 ***	2.87e-07 ***	0.00443 **	6.97e-09 ***

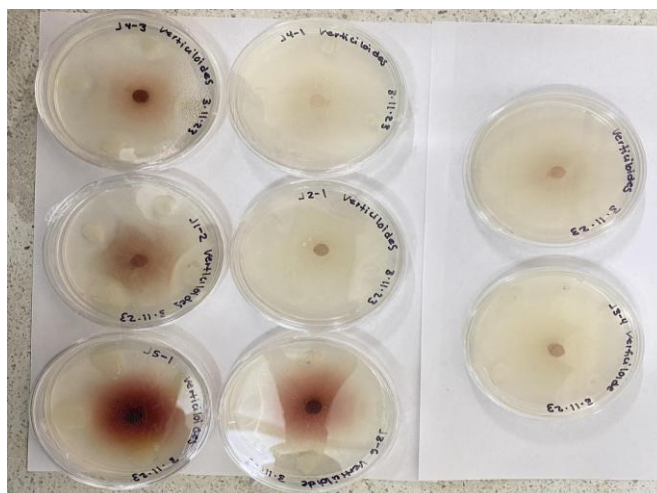
J1-2= *Bacillus atrophaeus*, J2-1= *Brucella intermedia*, J3-4= *Bacillus atrophaeus*, J3-6= *Bacillus subtilis*, J4-1= *Bacillus atrophaeus*, J4-3= *Bacillus atrophaeus*, J5-1= *Bacillus atrophaeus*.

Se observa que todas las cepas evaluadas inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno a excepción de *Fusarium* sp. en el cual no se encontró diferencia significativa entre la cepa J3-6 y J4-1 en comparación al testigo. Para el hongo *F. oxysporum*, no se encontró diferencia significativa entre la cepa J3-4, J3-6, J4-1 y J51 en comparación al testigo, para el hongo *Samsoniella hepiali* únicamente la cepa J51 inhibió el crecimiento radial del hongo y para la cepa *Fusarium verticilloides*, el único tratamiento que no redujo el crecimiento radial fue la cepa J3-4. Se observa que la cepa que inhibe mejor a los hongos fitopatógenos fue la J2-1, *Brucella intermedia*.

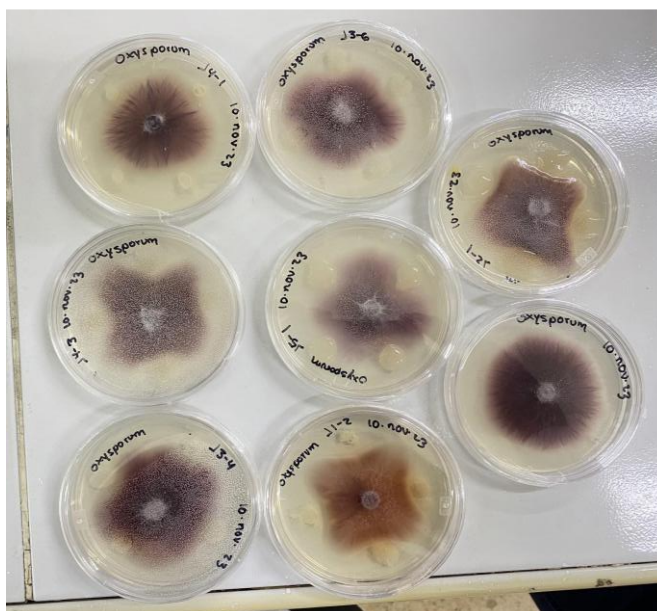
La cepa que presentó menor actividad antimicrobiana fue la J3-6, J4-1 y J4-4, las cuales pertenecen al género *Bacillus*. Se ha reportado que este género produce metabolitos secundarios como péptidos, antifúngicos como micobacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y sobporinas (Ragazzo-Sánchez et al. 2011).

Las cepas de *Bacillus* mostraron estadísticamente ( $p < 0.05$ ) una inhibición *in vitro* frente a los hongos fitopatógenos evaluados, variaron desde el 25% hasta el 50% en *Alternaria alternata*, 23% al 44.5% en *Fusarium* sp., 23% al 31% en *Fusarium oxysporum*, 63% en *Samsoniella hepiali* y 17% al 47% en *Fusarium verticilloides* del 19% al 50%. Dichos datos fueron más bajos con lo reportado por López-Pérez (2014) en donde se observó que la inhibición frente a *F. oxysporum* por el género *Bacillus*, varió del 0 al 47.6%.

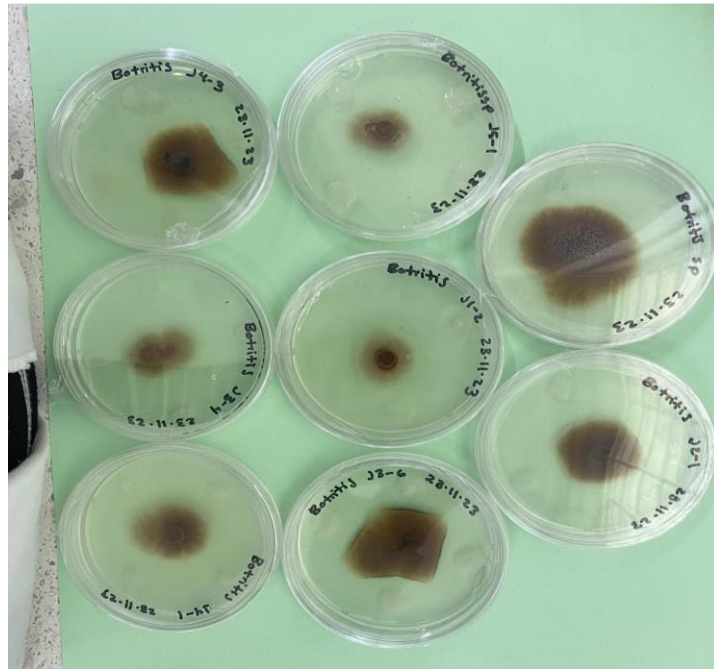
Las figuras 19, 20, 21 y 22 muestran la prueba de inhibición frente a los patógenos evaluados.



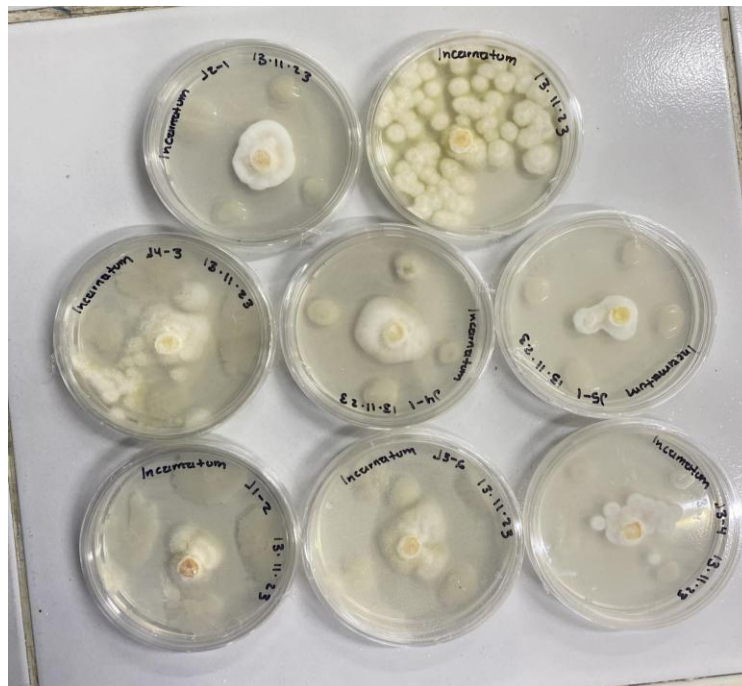
**Figura 19.** Hongo *Fusarium verticilloides* frente a bacterias antagónicas J1-2, J2-1, J3-4, J36, J4-1, J4-3 y J5-1.



**Figura 20.** Hongo *Fusarium oxysporum* frente a bacterias antagónicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1.



**Figura 21.** Hongo *Fusarium* sp. frente a bacterias antagónicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1



**Figura 22.** Hongo *Samsoniella hepiali* frente a bacterias antagónicas J1-2, J2-1, J3-4, J3-6, J4-1, J4-3 y J5-1

### 8.5 Medición de la escala de McFarland para la obtención del inóculo

En la tabla 13 se puede observar los mililitros que se usaron de cada cepa para inocular las plantas de tomate. Una vez obtenida la misma concentración de células en cada tratamiento, se inocularon las plántulas de tomate ajustando a  $20 \times 10^8$  células por mL. Los resultados de absorbancia que se muestran son el promedio de tres repeticiones.

**Tabla 13.** Concentraciones para  $20 \times 10^8$  células bacterianas por ml

Escala de McFarland (1907)			
Repetición	Cepa	$\lambda$ 540	$20 \times 10^8$ células (ml)
R1	J5-1	0.152	9.5
R2	J4-1	0.169	8
R3	J1-2	0.231	5

### 8.6 Bioensayo en invernadero con bacterias endófitas en plántulas de tomate.

En el bioensayo en invernadero, se encontró que no existieron diferencias significativas frente al testigo para las variables DT, AP y LR de las plántulas de tomate al ser inoculadas con las cepas J2-1 (*Brucella intermedia*), J4-1 y J5-1 (*Bacillus atrophaeus*), sin embargo, se encontró diferencia altamente significativa entre las variables de PFR y PFT encontrando que la cepa J2-1 (*Brucella intermedia*) y la cepa J5-1 (*Bacillus atrophaeus*) incrementaron en un 46% la biomasa fresca de la raíz y la cepa J2-1 (*Brucella intermedia*) y, J4-1 (*Bacillus atrophaeus*) incrementaron en un 34% la biomasa fresca de la planta (Tabla 14).

**Tabla 14.** Variables agronómicas

Tratamiento	LR	AT	DT	PFR	PFT
-------------	----	----	----	-----	-----



Testigo	22.71±4.57 a	15.57±2.76 a	0.44±0.05 a	2.35±0.97 b	4.65±1.37 b
J2-1	28.28±6.18 a	18.57 ±4.46 a	0.50±0.05 a	4.42±1.33 a	7.15±1.92 a
J4-1	24.42±4.19 a	18.2±4.46 a	0.50±0.05 a	4.01±1.21 ab	7.13±1.47 a
J5-1	6.71±6.55 a	18.85±4.01 a	0.50±0.00 a	4.39±1.39 a	6.72±1.46 ab
pr<F	0.263	0.424	0.178	0.0138 *	0.019 *

LR= Longitud de raíz, AT= Altura de la planta, DT=diámetro de tallo, PFR= Peso fresco de raíz, PFT= peso fresco de tallo. J2-1= (*Brucella intermedia*), J4-1 y J5-1= (*Bacillus atrophaeus*)

En la figura 23 se muestran algunas fotografías de los resultados de la inoculación con cepas endófitas.



**Figura 23.** Plántulas inoculadas con cepas de bacterias endófitas, de izquierda a derecha, Testigo, J21=*Brucella intermedia*, J4-1= *Bacillus atrophaeus*, J5-1= *Bacillus atrophaeus*

Los datos coinciden con lo reportado por Cendales et al. (2017) donde inoculó plantas de tomate con la cepa *Bacillus subtilis* GIBI 200, encontró que el microorganismo promovió el crecimiento del tomate. Los principales efectos de la inoculación de la cepa que se observaron fueron el aumento de la longitud y el peso fresco del tallo y la raíz en plantas jóvenes. Esto podría estar relacionado con la producción de compuestos indólicos de tipo IAA y la solubilización de fosfato por la cepa, para ello se recomienda realizar más pruebas.

Zuleta-Rodríguez et al. (2020), evaluó la aplicación de *Bacillus subtilis* (*Bs*) y *Rhizoglossum intraradices* sobre el crecimiento, producción y calidad de frutos de jitomate híbrido 'Caporal' y 'SV8579TE' en cultivo semi-hidropónico, los resultados mostraron que la inoculación simple de *Bs* y *Ri* estimuló los indicadores de crecimiento y fructificación en ambos híbridos, pero se encontró una respuesta superior en presencia de la co-inoculación, con incrementos significativos en la producción total. Por otra parte, Shazmin et al. (2023) seleccionó la cepa *B. intermedia* Msd2 para actividades promotoras del crecimiento de las plantas, reveló su capacidad para producir amoníaco, exopolisacáridos, catalasa, amilasa y ACC-desaminasa, y solubilizar fósforo, zinc y potasio y concluyó que la cepa Msd2 de *Brucella intermedia* podría ser beneficiosa como agente biológico potencial para una biorremediación efectiva de ambientes contaminados sin embargo, no lo evaluó *in vivo*, solo confirmó la degradación de metabolitos por biología molecular.

La familia Brucellaceae comúnmente identificada en el suelo dentro de las raíces de una planta junto con los géneros estrechamente relacionados *Brucella*, *Agrobacterium* y *Rhizobium*, pertenecen a la clase Alphaproteobacteria, que también son de interés como bacterias beneficiosas para las plantas, ya que algunas de las cepas son capaces de nodular las raíces para fijar nitrógeno, lo que subraya su estrecha asociación con las plantas hospedantes. También pueden mejorar el porcentaje de germinación, así como aumentar las actividades de proteasa, amilasa y el alargamiento relativo de la raíz, y pueden considerarse importantes en la biorremediación, así como una alternativa importante para la promoción del crecimiento de las plantas (Sun et al. 2024)

## IX. CONCLUSIÓN

Se puede concluir que el aislamiento, identificación y evaluación de microorganismos antagonicos, en este caso bacterias endófitas extraídas a partir de raíces de pino, resultaron ser prometedoras para el control biológico de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos y además son promotoras del crecimiento vegetal. De acuerdo con las evaluaciones que se realizaron, se encontró que la cepa *Brucella intermedia* (J2-1) demostró ser la más beneficiosa, inhibiendo significativamente el crecimiento de los distintos tipos de hongos fitopatógenos evaluados *in vitro* y además promoviendo un crecimiento considerable en la biomasa de las raíces y tallos de las plántulas de tomate establecidas en condiciones experimentales de invernadero. Estos resultados respaldan la hipótesis de que las cepas antagonicas aisladas e identificadas mostrarán inhibición de hongos fitopatógenos *in vitro* y aumentarán al menos una variable morfológica de plántulas de tomate inoculadas bajo invernadero. Con base a estos resultados, las bacterias antagonicas pueden ser una alternativa viable para el manejo de enfermedades de las plantas ocasionada por hongos y así incrementar la absorción de nutrientes. En este proyecto se busca contribuir a reducir la dependencia de agroquímicos y mejorar la producción de alimentos más seguros y sostenibles.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander Pérez, C., Leonardo Chamorro, a. (2012). Bacterias endófitas: Una alternativa biologica para el control de *burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*,

- 4(1), 172-184. Cabrera, E. V. R., Bonilla, B., & Aguilar, M. (2018). Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Citecsa*, 10(15), 23.
- Álvarez-García, J.-A., Santoyo, G & del Carmen Rocha-Granados, M. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01-10.
- Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 60-63.
- Audipudi, A., Chakicherla, B., & Bhore, S. (2017). Bacterial endophytes as biofertilizers and biocontrol agents for sustainable agriculture. *Biotechnol Sustain*, 1, 223-247.
- Ayatzol Vidal-Martínez, N., Argumedo-Delira, R., Ricardo Sánchez-Pale, J., Gregorio Chiquito-Contreras, R., González-Mendoza, D., & SánchezViveros, G. (2021). Microorganismos antagonistas: Una alternativa para el control biológico de enfermedades fúngicas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.). *Informacion Tecnica Economica Agraria*, 117(3).
- Baez Castro, C. A. (2024). *Producción de Metabolitos de Hongos Endófitos de Cactus (Stenocereus sp) y evaluación de su capacidad de promoción de crecimiento en plántulas de Tomate (Solanum lycopersicum)* (Tesis de

grado). Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Departamento de Ciencias Biológicas

- Barboza-García, A., Pérez-Cordero, A., & Chamorro-Anaya, L. (2023). Bacterias endófitas aisladas de cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) con actividad promotora de crecimiento vegetal. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 21(1), 28-39.
- Beltrán-Acosta, C. R., Zapata-Narváez, Y. A., Millán-Montaña D. A., & DíazGarcía, A. (2023). Efecto de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas migulae* sobre el crecimiento de plántulas de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en semillero: Rizobacterias promotoras en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Mesoamericana*, 50669-50669.
- Buitrago, R. B., de Bashan, L. E. G., & Pedraza, R. O. (2021). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (Corpoica): Mosquera, Colombia.
- Castro-del-Ángel, E., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., & Ochoa-Fuentes, Y. M. (2021). Actividad antifúngica de bacterias endófitas para el control de *Fusarium verticillioides* en maíz. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 8(2).
- Castro-del Ángel, E., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G. & Ochoa Fuentes, Y. M. (2021). Bacterias endófitas y su efecto en la inducción de resistencia sistémica en el cultivo de frijol contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. *Biotecnia*, 23(3), 167-174.

- Cendales, T. C., González, C. A. R., Cuásquer, C. P. V., Alzate, O. A. T., & Rodríguez, A. H. (2017). Efecto de *Bacillus* sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 37.
- Cotes, A. M., Mosher, S., Barrera, G. P., Kobayashi, S., & Elad, Y. (2018). Nuevas estrategias para el control biológico de fitopatógenos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. [https://repository.agrosavia.co/handle/20.500, 12324, 34158](https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324.34158).
- Dávila Medina, M. D., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Ochoa Fuente, Y. M., & Flores Olivas, A. (2013). Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1187-1196.
- Dector Arriaga, L. A. (2023). *Aislamiento, identificación y caracterización de hongos endófitos de la planta de resurrección Selaginella lepidophylla* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas, Cuernavaca, México.
- Díaz-Valenzuela, C., Deramond-Gálvez, C., Machuca, Á., & Chávez, D. (2024). Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra*, 11(2), e6802-e6802.
- Doncel, A., Chamorro, L., & Pérez, A. (2016). Actividad in vitro de bacterias endófitas promotoras de crecimiento asociadas con pasto colosoana en el municipio de Corozal, Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 8, 351-360.

- Gamez, M. A. (2024). *Beneficios del uso de biofertilizantes a base de bacterias endémicas en el crecimiento del cultivo de maíz* (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana).
- García López, K. E. (2020). *Evaluación in vitro de especies bacterianas nativas del género Bacillus aisladas a partir de cultivares de cebolla (Allium cepa) como biocontroladores de Fusarium sp. en la Irrigación de Santa Rita de Sigwas-Arequipa* (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Riotecnológicas, Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Arequipa, Perú.
- Govin Sanjudo, A., Leal Sanabria, G., & López Hernández, D. (2019). Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2).
- Knapp, D.G., Németh, J.B., & Barry, K. *et al.* (2018). Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Sci Rep* 8, 6321 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24686-4>
- Lopez Perez, M. C. (2014). Efecto antagónico de *Bacillus* spp. de la rizosfera de plantas del semidesierto chihuahuense sobre hongos fitopatógenos de suelo y su efecto en el desarrollo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Presentada como requisito para Ingeniería en Agrobiología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Mamani Huanca, L. (2019). *Bacterias endófitas productoras de metabolitos con efecto antagónico contra Fusarium verticillioides, principal fitopatógeno de cereales* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, Ambato, Ecuador.
- Martínez-Ruiz, F. E., Andrade-Bustamante, G., Aispuro Hernández, E., Hernández-Montiel, L. G., Holguín Peña, R. J., & Rueda-Puente, E. O. (2019). Antisuero vs hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate en Sonora, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 873-884.
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Ail-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: La importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18).
- Medina, E. Y. G. (2019). Evaluación de un biofertilizante (*Azotobacter* y *Rhizobium*) para tarwi y frijol caupí como alternativa ambiental a la fertilización nitrogenada (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Programa de Posgrado, Lima, Perú.



- Meléndez, V. E. P., Mora, F. J. C., Guerrero, G. T., & Villón, H. R. (2024). Avances en la evaluación de microorganismos como agentes biocontroladores de patógenos causantes de enfermedades en el cultivo de arroz. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(1), 27-35.
- Méndez-Úbeda, J. M., Hernández, M. F., & Páramo-Aguilera, L. A. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96-110.
- Ngalimat, M. S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Mohd Zainudin, N. A. I., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant growthpromoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 682.
- Orjuela Corchuelo, D. M. (2018). Microorganismos endófitos como alternativa para el control de hongos patógenos asociados al cultivo de aguacate en Colombia (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia.
- Pérez, A., Chamorro, L. (2013). Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 5(2), 439-462.
- Polanco-Florián, L. G., Alvarado-Gómez, O. G., Olivares-Sáenz, E., GonzálezGarza, R., & Pérez-González, O. (2020). Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(5), 1069-1081.

- Punschke, K., & Mayans, M. (2011). Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz [Selection of *Herbaspirillum* spp. strains that promote rice growth]. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 19-26.
- Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo, Robles-Cabrera, Alejandra, Lomelí-González, Leopoldo, Luna-Solano, Guadalupe, Calderón-Santoyo, & Montserrat. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(spe1), 5-11. Recuperado en 10 de diciembre de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027152X2011000400002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027152X2011000400002&lng=es&tlng=es). Promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia (Uruguay)*, 15(1), 19-26.
- Rentería Martínez, M. E., Ochoa Meza, A., Guzmán Ortiz, J. M., Barrera Silva, M. Á., Fernández Herrera, E., & Moreno Salazar, S. F. (2019). Actividad in vitro de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de rizobacterias aisladas de zacate bermuda ruderal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(2), 311-324.
- Rojas Badía, M. M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., & Lugo Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 00-00.
- Rosmine, E., Sainjan, N. C., Silvester, R., Alikkunju, A., & Varghese, S. A. (2017). Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. And its application in clarification of fruit juice. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 393-401.

- Sánchez León, A. A. (2021). Uso de las bacterias endófitas para el mejoramiento productivo en cultivos de ciclo corto en el Cantón Babahoyo (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2021).
- Sanz López, L. (2020). *Aislamiento y estudio de microorganismos endófitos en cultivos de maíz* (Tesis de grado). Universidad de Alcalá.
- Saucedo Burga, F. (2024). Evaluación de la efectividad de las nanopartículas de plata sobre enterobacterias de origen clínico resistentes a antimicrobianos. Cajamarca-2022.
- Shazmin, Ahmad, S.A., & Naqvi, T.A. *et al.* Biodegradation of monocrotophos by *Brucella intermedia* Msd2 isolated from cotton plant. *World J Microbiol Biotechnol* **39**, 141 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03575-7>
- Silva, H. S., Tozzi, J. P., Terrasan, C. R., & Bettioli, W. (2012). Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control*, *63*(1), 62-67.
- Sotelo-Cerón, N. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Leyva-Madrigal, K. Y., & Martínez-Álvarez, J. C. (2023). Isolation, selection, and identification of phytopathogenic fungi with bioherbicide potential for the control of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.). *Weed Biology and Management*, *23*(3-4), 1-11. <https://doi.org/10.1111/wbm.12275>
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Soleymani, A. (2024). *The Roles of PlantGrowth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Based Biostimulants for Agricultural Production Systems*. *Plants* *2024*, *13*, 613.
- Tangarife García, N. S. (2021). *Control biológico, la nueva era de la agricultura*

(Monografía de grado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA, Bogotá, Colombia.

Vasquez Espejo, C., Alvarez Aliaga, M. T. A., & Crespo Melgar, C. F. A. (2018).

Aislamiento, selección y caracterización de bacterias endófitas promotoras del crecimiento de plantas (Tesis de licenciatura).

Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas, La Paz, Bolivia.

Velasco-Belalcázar, M. L., Hernández-Medina, C. A., Gómez-López, E. D.,

Torres-González, C., & Caro-Hernández, P. A. (2019). Bacterias endófitas de *Capsicum frutescens* antagónicas a *Fusarium* spp. *Agronomía Mesoamericana*, 367-380.

Vera Loor, M. A., Bernal Cabrera, A., Leiva Mora, M., Vera Loor, A. E. A., Vera

Coello, D., Peñaherrera Villafuerte, S., Solís Hidalgo, K., Terrero Yépez, P., & Jiménez Guerrero, V. E. (2018). Microorganismos endófitos asociados a *Theobroma cacao* como agentes de control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Centro Agrícola*, 45(3), 81-87.

White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing

of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J and White T (eds.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego, Academic Press Inc. 482 p.

Zambrano Basurto, A. E. (2022). *Validación de bacterias endófitas*

*solubilizadoras de fosfato como promotoras de crecimiento vegetal en*

*plantas de tomate (Solanum lycopersicum)* (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).

Zulueta-Rodríguez, R., Hernández-Montiel, L. G., Reyes-Pérez, J. J., GonzálezMorales, G. Y., & Lara-Capistrán, L.. (2020). Effects of co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Rhizoglopus intraradices* in tomato production (*Solanum lycopersicum* L.) in a semi-hydroponic system. *Revista bio ciencias*, 7, e671. Epub 18 de noviembre de 2020.<https://doi.org/10.15741/revbio.07.e671>