



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES  
BACTERIANAS ASOCIADAS A ESCLEROCIOS DE *Claviceps gigantea*  
Fuentes *et al.* EN MAÍZ (*Zea mays* L.) CON POTENCIAL  
ANTAGONISTA, EN EL ESTADO DE MÉXICO**

ANA MARÍA AYALA TORRES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

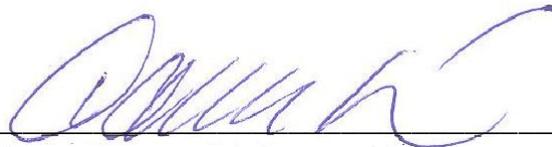
La presente tesis titulada: **Diversidad y caracterización de poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea* Fuentes et al. en maíz (*Zea mays* L.) con potencial antagonista, en el estado de México** realizada por la alumna: **Ana María Ayala Torres** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



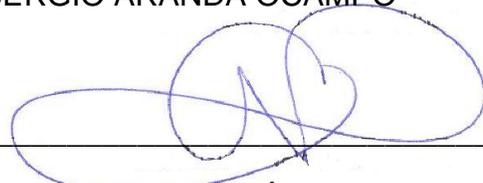
DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR



DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR



DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR



DR. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2014

**DIVERSIDAD Y CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS ASOCIADAS A ESCLEROCIOS DE *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* EN MAÍZ (*Zea mays* L.) CON POTENCIAL ANTAGONISTA, EN EL ESTADO DE MÉXICO.**

**Ana María Ayala Torres, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2014.**

**RESUMEN GENERAL**

Un total de 129 aislamientos bacterianos obtenidos de la micósfera de esclerocios de *Claviceps gigantea* se evaluaron *in vitro* para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* patógenos a maíz. Ensayos cualitativos en confrontación dual, resultaron en la selección de 22 aislamientos bacterianos con el mayor potencial antagónico hacia una, dos o las tres especies de *Fusarium*. Los aislamientos se identificaron molecularmente mediante secuenciación parcial del gen 16s ADNr. Las cepas con mayor grado de antagonismo pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La caracterización en la producción de metabolitos potencialmente involucrados en la actividad antagónica, mostró que el 100% de las cepas expresan actividad lipolítica, proteolítica, solubilización de fosfato mineral y producción de sideróforos, mientras que las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* expresaron además producción de ácido indol acético. Este representa el primer estudio sobre poblaciones bacterianas cultivables en esclerocios de *C. gigantea* con alto potencial de antagonismo contra patógenos del maíz.

Palabras clave: *Bacillus*, *Pseudomonas*, biocontrol, metabolitos secundarios, caracterización.

**DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL POPULATIONS ASSOCIATED TO SLEROTIA OF *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* IN MAIZE (*Zea mays* L.) WITH ANTAGONIST POTENTIAL, IN THE STATE OF MEXICO.**

**Ana María Ayala Torres, MC.**

**Colegio de Postgraduados, 2014.**

**GENERAL ABSTRACT**

A total of 129 bacterial isolates from the sclerotia microsfera of *Claviceps gigantea* was evaluated *in vitro* to evaluate their ability to inhibit growth of *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides*. Tests in dual confrontation, resulted in the selection of 22 bacterial isolates with the highest potential antagonistic to one, two or three species of *Fusarium*. The isolates were identified by partial sequencing of the 16S rDNA gene. Strains with greater antagonism belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. Characterization of metabolite production involved in the inhibitory activity, showed that 100% of strains expressing lipolytic and proteolytic activity, phosphate mineral solubilizing and siderophore production, while *Bacillus* and *Pseudomonas* strains also expressed production of acid indole acetic. This represents the first study of cultivable bacterial populations in sclerotia of *C. gigantea* with high potential for antagonism against pathogens in maize.

Keywords: *Bacillus*, *Pseudomonas*, biocontrol, secondary metabolites, characterization.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida tan maravillosa que me ha dado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico a través de la beca de maestría, al Colegio de Postgraduados, por ser una institución formadora de profesionales de alto nivel y al proyecto MasAgro, CIMMYT por el financiamiento al proyecto de investigación.

Al Dr. Carlos De León, con gran aprecio, por su confianza e incondicional apoyo, por sus enseñanzas y paciencia. Gracias por compartirme su conocimiento y consejos durante la realización de mi maestría.

Al Dr. Sergio Aranda, con admiración, por la dirección de este trabajo de investigación, por su amistad, consejos, apoyo, orientación y confianza en todos los aspectos, muchas gracias por impulsarme ser mejor.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su disponibilidad, amabilidad y apoyo durante el desarrollo de esta investigación y al Dr. Jesús Ricardo Sánchez Pale, por su orientación, sugerencias y entusiasmo para la realización del proyecto.

Al Dr. Daniel Ochoa, por su apoyo al inicio y durante mi maestría.

A Carlos Martínez por sus consejos y amistad, a Michelle e Hilda por su apoyo en todos los aspectos, al M.C. Juan Manuel Tovar Pedraza por su ayuda para completar esta meta y a la Dra. Dolores Briones por la donación de las cepas de *Fusarium* spp. utilizadas en esta investigación.

A mis amigos, la familia que escogí. Hanz, Balta, Jaime, Japhet, Mag, Marta, Lin, Erika, Luis, Manuel, Dei y las J's, así como a todos aquellos que aún no mencionados aquí me han apoyado y siempre han estado ahí, para mí, a pesar de la distancia y el tiempo.

## DEDICATORIAS

### **A mis papás; Anita y Cristino**

Gracias por la educación que me han dado, por quererme siempre, por ser mis papás.

Má, estoy orgullosa de ti. Dios me dio a la mejor Mamá, gracias por no rendirte.

### **A mis hermanos Cris, Lupita, Paty y Chuy**

Los mejores hermanos del mundo, gracias por apoyarme en las buenas y en las malas, especialmente a mis hermanas, por ser mis amigas y mamás durante toda mi vida. A mi hermano y a Tatan, por ser como unos padres para mí, y a mis cuñados Geo y Hugo por su gran apoyo.

**A mis sobrinos;** Odeth, Gis, Meli, Pachis, Migue y Fany. Porque a pesar de ser tan pequeños son la alegría de mis ojos. A mi madrina Silvia por su cariño y apoyo.

**A Hanzel;** Mi corazón sonrió cuando te conocí, mi vida cambio por completo. Gracias por siempre estar conmigo, por tu amor, amistad y apoyo infinito, por ser mi cómplice.

Gracias por acompañarme en esta aventura y por quererme tal cual soy.

**A Mimí, Mila y Mandira;** mis mejores amigas, mis compañeras incondicionales.

Con dedicación especial a la memoria de mi Papá y mi hermano Chuy. Hoy, un cielo nos separa, pero nunca han salido de mi corazón. Gracias por enseñarme a luchar por mis metas, hermano, este logro hoy es de los dos y tu pá, sé que estás orgulloso de mi, gracias por estar siempre en mi pensamiento y abrazarme en mis sueños.

## CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importancia y usos del maíz.....	1
1.2 Principales enfermedades del cultivo del maíz.....	3
1.3 <i>Fusarium</i> spp. en el cultivo del maíz.....	4
1.4 El “diente de caballo” <i>Claviceps gigantea</i> Fuentes <i>et al.</i> , en el cultivo del maíz, en el estado de México.....	5
1.5 Poblaciones bacterianas asociadas al cultivo del maíz y a esclerocios de <i>Claviceps gigantea</i> con potencial antagonista contra <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i> y <i>F. verticillioides</i> .....	6
1.6 Identificación de bacterias mediante la secuenciación del gen 16s ADNr.....	12
1.7 Producción de exoenzimas y metabolitos secundarios de cepas bacterianas con potencial antagónico.....	13
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>III. HIPOTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>

4.1 Colecta de granos de maíz con <i>C. gigantea</i> .....	17
4.2 Determinación del número de muestra de esclerocios a utilizar.....	17
4.3 Extracción de poblaciones bacterianas totales asociadas a esclerocios de <i>C. gigantea</i> .....	18
4.4 Extracción de poblaciones de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes asociadas a esclerocios de <i>C. gigantea</i> .....	19
4.5 Extracción de poblaciones de <i>Bacillus</i> spp. asociadas a esclerocios de <i>C. gigantea</i> .....	20
4.6 Antagonismo <i>in vitro</i> de bacterias asociadas a <i>C. gigantea</i> contra <i>F. graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i> y <i>F. verticillioides</i> .....	20
4.7 Extracción de ADN de las cepas bacterianas antagonistas.....	22
4.8 Amplificación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas.....	23
4.9 Secuenciación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas antagonistas.....	23
4.10 Producción de ácido indol acético (AIA).....	24
4.11 Actividad lipolítica.....	24
4.12 Actividad proteolítica.....	25
4.13 Producción de sideróforos.....	25
4.14 Solubilización de fosfato mineral.....	25

4.15	Preservación de bacterias y elaboración de colección.....	26
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>		<b>26</b>
5.1	Determinación del número de muestra a utilizar.....	26
5.2	Extracción de bacterias asociadas a esclerocios de <i>C. gigantea</i> .....	28
5.3	Pruebas de antagonismo in vitro de bacterias asociadas a <i>C. gigantea</i> contra <i>F. graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i> y <i>F. verticillioides</i> .....	30
5.4	Amplificación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas antagonistas.....	34
5.5	Secuenciación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas.....	34
5.6	Producción de ácido indol acético (AIA).....	40
5.7	Actividad lipolítica.....	42
5.8	Actividad proteolítica.....	43
5.9	Producción de sideróforos.....	44
5.10	Solubilización de fosfato mineral.....	47
<b>VI. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>		<b>49</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>		<b>51</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA.....</b>		<b>52</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Promedio de colonias bacterianas obtenidas y UFC por gramo de esclerocio por lote de muestreo.....	28
<b>Cuadro 2.</b> Promedio del halo de inhibición <i>in vitro</i> de las 22 cepas bacterianas con las tres especies de <i>Fusarium</i> spp.....	33
<b>Cuadro 3.</b> Identificación mediante el gen 16s ADNr de las 22 bacterias antagónicas a <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i> y <i>F. verticillioides</i> .....	35
<b>Cuadro 4.</b> Distribución taxonómica de las 22 cepas bacterianas antagonistas a <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. subglutinans</i> y <i>F. verticillioides</i> .....	36
<b>Cuadro 5.</b> Caracterización en la producción de metabolitos de 22 cepas bacterianas antagonistas vs 3 especies de <i>Fusarium</i> en maíz aisladas de esclerocios de <i>C. gigantea</i> .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Extracción de poblaciones de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes en microplaca de 96 pocillos con medio B de King líquido suplementado con cycloheximide, ampicilina y cloranfenicol.....	19
<b>Figura 2.</b> Microplaca de 96 pocillos con el inoculador multipunto y la fuente de inóculo bacteriano. ....	22
<b>Figura 3.</b> Determinación del número mínimo de esclerocios de <i>C. gigantea</i> a utilizar en base a número de colonias bacterianas obtenidas en 20 esclerocios al azar.....	27
<b>Figura 4.</b> Diversidad de poblaciones bacterianas a partir de esclerocios enteros de <i>C. gigantea</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Promedio de colonias bacterianas obtenidas por lote de muestreo.....	29
<b>Figura 6.</b> Colonias bacterianas fluorescentes bajo luz UV (380 nm).....	30
<b>Figura 7.</b> a) testigo ( <i>F. subglutinans</i> ) y b) zonas de inhibición hongo versus bacteria.....	31
<b>Figura 8.</b> a) Distribución de 25 bacterias en la placa confrontando al hongo ( <i>F. graminearum</i> ), y b) halo de inhibición.....	32
<b>Figura 9.</b> Halos de inhibición del antagonismo <i>in vitro</i> observados con <i>F. subglutinans</i> .....	32
<b>Figura 10.</b> Amplificación del gen 16s ADNr utilizando los primers 8f y 1492r. Carril 1) Marcador de peso molecular de 10000 pb; Carriles 2, 3 y 4) Amplificación del gel 16s ADNr en 1500pb; Carril 5) Control negativo.....	34

<b>Figura 11.</b> Producción de ácido indol acético (AIA) por cepas antagonistas a <i>Fusarium</i> spp a) producción de indol +, b) producción de indol –.....	40
<b>Figura 12.</b> Actividad lipolítica de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> antagonistas a <i>Fusarium</i> spp a) actividad lipolítica +, b) actividad lipolítica –.....	42
<b>Figura 13.</b> Actividad proteolítica de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> antagonistas a <i>Fusarium</i> spp. la formación de un halo hialino alrededor de la colonia bacteriana indica actividad proteolítica. a) actividad proteolítica positiva.....	43
<b>Figura 14.</b> Producción de sideróforos (halos amarillentos) a las 24 h de incubación a) actividad de producción de sideróforos.....	44
<b>Figura 15.</b> Producción de sideróforos a los 5 días. a) producción de sideróforos +.....	45
<b>Figura 16.</b> Formación de un halo o precipitado alrededor de la colonia bacteriana indica la solubilización de fosfatos. a) solubilización de fosfato +, b) solubilización de fosfato - .....	47

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia y usos del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los cereales alimenticios más antiguos que se conocen. Este cereal pertenece a la familia de las poáceas (Gramíneas), y es la única especie cultivada de éste género. Otras especies del género *Zea*, son comúnmente llamadas teocintle y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas silvestres parientes de *Zea mays* (FAO, 2010). Se sabe que el maíz fue una de las primeras plantas cultivadas por los agricultores del altiplano de México hace aproximadamente 7000 años. Algunos científicos sostienen la teoría de que México es la cuna del maíz (Iltis, 1983; Galinat, 1988; Wilkes, 1989 y Weatherwax, 1995), fundamentado en el hallazgo de un polen fósil de 80 000 años de antigüedad descubierto en una mazorca encontrada en los cimientos del palacio de Bellas Artes, en el centro de la ciudad de México, así como en las mazorcas y los coprolitos descubiertos en las cuevas de Tehuacán, Puebla, México. Gracias a su sabor, gran adaptabilidad y generoso rendimiento, el maíz comenzó su conquista y fue convirtiéndose paulatinamente en parte importante de la agricultura mundial y de las grandes transformaciones económicas y sociales (López, 2003).

Este cereal tiene diversos usos y de él se pueden obtener múltiples derivados. Después del petróleo, se considera que el maíz es el producto natural que más usos tiene; asimismo, constituye el recurso renovable más importante del mundo. Entre 1980 y 2006, a nivel mundial la producción de este cereal alcanzó un crecimiento porcentual

de 75% (de 400 a 700 millones de toneladas: Mt) y la superficie que se destina a su siembra (150 millones de hectáreas: Mha) es la mejor evidencia de ello.

A diferencia de otros cereales, el maíz se puede cultivar en casi todos los climas, altitudes y tipos de suelos, lo que ha permitido su difusión en todo el mundo (Salazar y Godínez, 2010). Desde el punto de vista alimenticio, el maíz es uno de los tres cereales más importantes del mundo. México produce el 27% del maíz, siendo el 4º productor a nivel mundial (SIAP, 2010). Para el periodo 2009-2010 la producción mundial de maíz fue de 794.04 Mt. En orden de importancia, los principales países productores de maíz son: Estados Unidos de Norteamérica, China, Brasil, México, India, Argentina y Sudáfrica. México es uno de los mayores consumidores de maíz, con una gran tradición en este cultivo y un gran arraigo del producto como base de la alimentación de la población (FAO, 2010).

En México, el consumo de maíz es constante durante todo el año. Se estima que en 2007 el consumo total del maíz fue de 32 763 833 t, mientras que la producción nacional llegó a solamente 18 315 683 t con un déficit de 14 448 150 t, especialmente en lo que respecta a maíz amarillo, ya que se producían 2.0 Mt de éste y la demanda de la industria ascendía aproximadamente a 10.2 Mt. En México, 92% de la producción de maíz es de endospermo blanco, lo que permite cubrir la demanda de consumo humano nacional, en tanto que 7% corresponde a amarillo y 1% a otros tipos de color de endospermo (SIAP, 2010). El maíz de grano es la principal fuente de alimentación humana en América. Se utiliza en más formas que cualquier otro cereal, como alimento humano, como forraje de ganado y para propósitos industriales. Cada parte de la planta tiene valor económico, el grano, el tallo, las hojas e incluso el raquis (Quezada, 2010).

Este cereal es una importante fuente de materia prima para producir almidón y derivados como edulcorantes, aceite, alcohol, entre otros, los cuales, ya están siendo utilizados en cierta forma como materia prima en la industria química. A diferencia del petróleo, el maíz presenta varias ventajas, ya que es un recurso renovable y los productos finales obtenidos son biodegradables y su degradación no altera el balance de CO<sub>2</sub> atmosférico, además, de que en algunos casos, el maíz sirve como sustituto de productos derivados del petróleo (Robutti, 2007). En términos generales, 45.7% de los inventarios totales de maíz se destinan a alimentos pecuarios, 13.2% a almidones y féculas, 1.7% a cereales y botanas, 13.2% a la producción de harina de maíz, 13.7% a tortillas y nixtamal y 12.5% a otras compras intermedias y a la demanda final (Robutti, 2007).

## **1.2 Principales enfermedades del cultivo del maíz**

El maíz es susceptible a varias enfermedades, que en alguna forma afectan su desarrollo normal. Éstas son favorecidas por las condiciones ambientales, el tipo de suelo, la susceptibilidad de los materiales sembrados y, en algunos casos, por las condiciones que favorezcan la migración, establecimiento y supervivencia de insectos vectores. Algunas enfermedades que afectan al cultivo del maíz son universales, ya que ocurren en casi todos los ambientes en que se cultiva, entre las que se encuentran algunos tizones, royas, manchas de las hojas y tallos y las pudriciones de mazorca. Algunas otras enfermedades son restringidas a una región y pueden causar pérdidas económicas de gran importancia. Ejemplo de lo anterior es la enfermedad fungosa causada por *Claviceps gigantea*, la cual es una enfermedad restringida a los Valles Altos de México, llegando a causar pérdidas de hasta un 90% en variedades

susceptibles (Osada, 1984). Dentro de las enfermedades causadas por hongos se encuentran tizones, mildius, pudriciones, manchas foliares, marchitez, carbones y royas (CIMMYT, 2004), siendo de gran importancia las pudriciones, tales como las de tallo causadas por *Fusarium* y *Botryodiplodia* y las de mazorca causadas por varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Acremonium*, por mencionar algunas. Las enfermedades fungosas en maíz representan pérdidas económicas importantes, además de propiciar el deterioro en el valor nutritivo de los granos por la degradación de proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas (Carvajal y De León, 2010).

### **1.3 *Fusarium* spp. en el cultivo del maíz**

En todas las regiones productoras de maíz del mundo, cada año se presentan enfermedades que afectan el rendimiento y la calidad del grano. En zonas húmedas, las pudriciones de mazorca son importantes, particularmente cuando la precipitación pluvial es mayor que la normal desde la época de la floración hasta la cosecha; en algunas regiones se han registrado daños severos causados por estas enfermedades. Entre las pudriciones de mazorca más relevantes están las inducidas por especies de hongos del género *Fusarium* que además de reducir el rendimiento son causa del deterioro y mala calidad de los granos, y debido a la capacidad de producir micotoxinas además de estar relacionadas con enfermedades en humanos y en animales que los consumen (Charmley *et al.*, 1994)

De las pudriciones de mazorca y de grano, las mejor conocidas son las llamadas pudriciones por *Fusarium* y la pudrición rosada de la mazorca inducida por *Gibberella*: *Fusarium moniliforme* J. Sheld. y *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch= *F. graminearum*

Schwabe, respectivamente. Estas especies, además de inducir pudriciones de mazorca, pueden producir diversas toxinas potencialmente riesgosas (Koehler, 1959).

Niederhauser (1949) registró a *F. moniliforme* como la causa más importante y más frecuente de las pudriciones en mazorca. Zenteno (1963) y Medina (1970) aislaron mohos de mazorcas dañadas y encontraron que *F. moniliforme* fue la de mayor incidencia. Además, existen registros de que esta especie ha sido aislada de mazorcas de maíz de los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla y de Nuevo León, así como de *F. graminearum*, que fue aislada de mazorcas de maíz procedentes del estado de México, Michoacán y Yucatán (Zenteno, 1963).

#### **1.4 El “diente de caballo” *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*, en el cultivo del maíz en el estado de México**

Dentro de los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo del maíz se encuentran las pudriciones de mazorca. En este grupo de enfermedades se encuentra el “diente de caballo del maíz”, causado por *Claviceps gigantea*, el cual, entre otras especies de hongos de este grupo, produce micotoxinas y alcaloides de gran importancia. El diente de caballo es una enfermedad endémica de ciertas regiones elevadas, frías y húmedas de la meseta central de México. La enfermedad y el hongo fueron descritos por Fuentes *et al.* (1964) como *Claviceps gigantea* quienes lo encontraron causando daños al cultivo de maíz en la región de Amecameca y Toluca, Edo. de México y en la Serranía Tarasca del Edo. de Michoacán. Estos lugares se encuentran a una altura de más de 2000 msnm con clima húmedo y frío (Fuentes *et al.*, 1964).

La enfermedad se caracteriza por la presencia de abultamientos en la mazorca que se forman en lugar de granos de maíz. Los granos infectados se convierten en estructuras fúngicas conocidas como esclerocios que se desarrollan entre los granos sanos. En las primeras etapas de la infección, los esclerocios son de color claro, suaves y viscosos y se van endureciendo a medida que se acerca la cosecha. Cuando caen al suelo, germinan y desarrollan varias estructuras parecidas a cabezuelas (estromas), las cuales liberan esporas nuevas durante la emisión de estigmas de las plantas de maíz en el siguiente ciclo de cultivo (Osada, 1984).

De acuerdo a la posición del esclerocio en la mazorca, éste puede dañar en menor o mayor grado el desarrollo de los granos cercanos y su germinación. Fucikovsky (1970) y Moreno (1968), encontraron que los granos circundantes a los esclerocios de *C. gigantea* llegan a tener el 46% de germinación y pierden su apariencia normal, tornándose arrugados y de color café. También reportaron que la infección del hongo es favorecida en un rango de temperatura de 13 °C a 15 °C y una precipitación pluvial anual de 1000 mm.

### **1.5 Poblaciones bacterianas cultivables asociadas al cultivo del maíz y a esclerocios de *Claviceps gigantea* con potencial antagonista contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*.**

Existen millones de microorganismos coexistiendo de manera natural entre sí, entre los cuales, hay también millones de interacciones que han existido a lo largo del tiempo. Las relaciones entre los seres vivos son un proceso dinámico, implícito y es la base de la misma vida. Los microorganismos se encuentran asociados con todas las

especies de plantas y animales estableciendo diversos tipos de interacciones, sin embargo, las condiciones particulares de cada ambiente, son las que condicionan y determinan esa diversidad, ya que cada ecosistema presenta características únicas que son las que permiten seleccionar poblaciones de microorganismos diferentes con actividades metabólicas específicas, y que a su vez impactan en la distribución espacial e interacción entre ellos dentro de ese ecosistema concreto (Konopka, 2006; Prosser *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008).

Dentro de la amplia diversidad genética que presentan los microorganismos en diferentes ambientes, las bacterias conforman una gran fracción de esta diversidad constituyendo uno de los tres dominios en el árbol filogenético de la vida (Archaea, Bacteria y Eucaria) (Woese, 1994; Torsvik y Orveas, 2007). Las bacterias, como grupo, tienen una larga historia evolutiva, la cual les ha conferido la capacidad de habitar la mayor parte de los nichos ecológicos existentes, representando la mayor porción de biomasa sobre la tierra y consecuentemente convirtiéndose en componentes importantes en muchos procesos esenciales para la vida, como es el caso de los ciclos del azufre, carbono y nitrógeno.

Diversas investigaciones llevadas a cabo en el sistema radical de las plantas han demostrado que estas albergan poblaciones bacterianas con una diversidad funcional enorme y que pueden actuar como saprófitas, benéficas, así como patógenas (Sorensen y Sessich, 2007; Hartmann *et al.*, 2008; Salvaudon y Shikoff, 2008; Buée *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha observado la presencia de bacterias antagonicas asociadas a esclerocios. Se ha reportado actividad biótica alrededor de esclerocios de *S. rolfsii* durante el proceso germinativo de estos cuerpos. El fenómeno

es conocido como "efecto de micosfera", habiéndose observado que las poblaciones de bacterias aisladas de la micosfera contienen mayor número de especies inhibitorias de *S. rolfsii* que las obtenidas en muestreos de otros nichos ecológicos, es decir que los organismos nativos tienen mayor actividad antagonista (Gilbert y Linderman, 1971). Colotelo *et al.* (1971) mencionan que esclerocios de *S. rolfsii* producen exudados contenidos en sacos membranosos que contienen carbohidratos solubles, proteínas, lípidos, aminoácidos, amoniacó, ácidos orgánicos así como diversas enzimas activas que podrían propiciar el desarrollo de organismos en su superficie. Algunos autores mencionan que bacterias pueden crecer sobre los exudados de esclerocios y que debido a la rugosidad de la superficie de los mismos causada por una gran cantidad de células colapsadas, se pueden localizar nichos inexplorados en los cuáles se pueden encontrar bacterias que han quedado atrapadas en los esclerocios (Leggett y Rahe, 1985), así Hou *et al.* (2006), aislaron bacterias de la micosfera de *Sclerotinia sclerotiorum* que poseen actividad anti-fúngica contra *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicae* y *Leptosphaeria maculans*.

Algunas investigaciones sugieren que la presencia de organismos antagónicos asociados a esclerocios de algunas enfermedades puede ser de gran utilidad para el control de las mismas, tal es el caso de estudios realizados con la enfermedad *Phymatotrichum omnivorum*, en este caso particular las primeras investigaciones sobre el control de la pudrición de la raíz (*P. omnivorum*) indicaron que los tratamientos de suelos infectados con abono verde o estiércol de corral fueron eficaces en la reducción de las pérdidas de plantas debido a la infección con *P. omnivorum* y se concluyó que la reducción de la infección se debió a los aumentos en el número de bacterias,

actinomicetos y otros microorganismos que utilizan los residuos. Se pensó que el aumento de la actividad microbiana pudo haber dado lugar a la destrucción de esclerocios de *P. omnivorum*, así como un aumento de la competencia y la producción de productos metabólicos que inhiben el desarrollo del hongo presente en mayor cantidad en poblaciones bacterianas autóctonas de esclerocios de *P. omnivorum* (Clark y Mitchell, 1942).

Hameeda *et al.* (2011), Mencionan varios mecanismos por los cuales las bacterias asociadas a esclerocios de *S. rolfsii* pueden promover el crecimiento de la planta incluyendo la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, la estimulación de la absorción de nutrientes y el control biológico de hongos patógenos así como también mencionan que microorganismos benéficos, incluyendo bacterias y hongos antagonicos, se pueden aplicar como tratamiento contra *S. rolfsii*.

Así, se argumenta que algunos grupos de bacterias específicos de la planta producen y secretan fitohormonas como auxinas y ácido-3-indolacético (AIA) (fitoestimuladores) que estimulan y modulan el crecimiento de las plantas y que además tienen una participación activa en la degradación de compuestos tóxicos y contaminantes en el suelo y raíz de las plantas (Hallmann *et al.*, 1997; Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008; Kamilova *et al.*, 2008; Francis *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado como estas poblaciones bacterianas forman parte y llevan a cabo procesos esenciales relacionados con la patogénesis y defensa de la planta, mediante señalizaciones moleculares que inducen la producción de antibióticos y otros metabolitos esenciales para desencadenar mecanismos de defensa en el tejido de la planta y supresión de patógenos del suelo (Kent y Triplett, 2002).

Existe un grupo importante de bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de fitopatógenos. Entre las más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. El uso excesivo de plaguicidas químicos provoca resistencia en los fitopatógenos, influencia negativa sobre el ambiente y la salud humana, por lo que se impone la implantación de estrategias de control con microorganismos benéficos. El uso de microorganismos para el control biológico de plagas y enfermedades y para la fertilización de cultivos de interés comercial, se presenta como uno de los métodos más prometedores para reducir los efectos nocivos del uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura (Orrieta y Larrea, 2001). Bacterias pertenecientes al género *Bacillus* spp. se encuentran entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su presencia en la naturaleza (Chatterjee *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2008). Además, éste género ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos (Sosa *et al.*, 2006; Reinoso, 2007).

Trabajar con biopreparados formados por metabolitos activos de origen bacteriano brinda magníficas posibilidades para su utilización como estimulador del crecimiento vegetal y/o agente de biocontrol de diversos patógenos. Tomando en cuenta que las pudriciones de mazorca en maíz, causadas por algunas especies del género *Fusarium* (que en algunos casos se presentan en combinación con *Claviceps gigantea*, causante del diente de caballo del maíz) son de gran importancia y además representan pérdidas en el cultivo, y que en el contexto de control biológico es un tema que ha sido poco

explorado, se consideró la base fundamental para la realización del presente estudio. De Oliveira *et al.* (1984), consideran que la introducción de antagonistas en el suelo es una alternativa no química de control para hongos que forman esclerocios; pero mencionan que una de las limitantes de esta técnica es la adaptación inadecuada de los microorganismos a las condiciones ecológicas propias de una determinada región, lo que puede disminuir la eficiencia del agente antagónico. Al respecto Rai y Saxena (1975), mencionan que la microflora nativa existente sobre éstos y en el suelo representa un control biológico natural para estos y otros patógenos, los cuales pueden ser afectados por antibiosis, competencia o hiperparasitismo, reduciendo el inóculo potencial presente en el suelo. La ventaja de esta opción de control es que representa una alternativa ecológica, respetuosa con el ambiente, no contaminante, y que reduce notablemente los riesgos de desarrollo de resistencia de los patógenos. Además, al ser selectivos en su modo de acción, es poco probable que dañen a otros organismos benéficos y, en muchos casos, favorecen al ecosistema y estimulan el crecimiento vegetal (Tejeda *et al.*, 2006), a la vez que los efectos dañinos sobre la salud humana son mínimos o nulos. Todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas.

De ésta manera, y con base en la información anterior, se puede suponer que en la interacción maíz-*C.gigantea*-*Fusarium* se pueden encontrar poblaciones bacterianas nativas asociadas a esclerocios de este patógeno con alto potencial antagónico, y con alto potencial en la producción de metabolitos que están directamente relacionados con el antagonismo e inducción de mecanismos de defensa en la planta contra otros patógenos. Lo anterior resalta la importancia de la realización de esta investigación,

cuyo objetivo principal es conocer la estructura y diversidad de poblaciones bacterianas asociadas al diente de caballo con potencial antagonista; enfermedad que, además de ser poco estudiada, se consideró importante ya que no existen estudios previos referentes a las poblaciones bacterianas nativas, como constituyentes naturales asociadas a los esclerocios de este patógeno, lo cual permitirá generar información sobre alternativas de métodos de control de enfermedades asociadas al cultivo de maíz que sean más amigables con el medio ambiente, particularmente el uso de bacterias con potencial antagónico a algunas enfermedades de cultivo del maíz inducidas por algunas especies del género *Fusarium*.

#### **1.6 Identificación de bacterias mediante la secuenciación del gen 16s ADNr**

Uno de los principales retos de la ecología microbiana moderna es profundizar en el conocimiento sobre la estructura y la diversidad de poblaciones de microorganismos, la cual comprende dos importantes componentes como son la riqueza de taxones y la abundancia relativa de éstos dentro de una comunidad, y mediante este conocimiento entender los mecanismos a través de los cuales las comunidades de microorganismos interactúan y determinan el funcionamiento de un ecosistema en particular (Aranda, 2010).

Un gran impulso al desarrollo de la Ecología Microbiana moderna fue el análisis de la secuencia de genes de la región 16S del ADN ribosómico (ADNr) a partir de ADN obtenido directamente de muestras de diversos nichos ecológicos, lo cual ha proporcionado un mayor entendimiento de la diversidad microbiana global y propiciado que en los últimos años cada vez sean más frecuentes las investigaciones que incorporan estas nuevas técnicas que permiten detectar y estudiar con mayor precisión

la diversidad de taxones en un medio ambiente determinado (Sogin *et al.*, 2006; Tringle y Hugenholtz, 2008). En los últimos 20 años se ha producido un salto metodológico importante y, del uso del microscopio y aislamiento tradicional de los cultivos de microorganismos en placas de Petri, se ha pasado al análisis comparativo de las secuencias de ADN ribosómico (ADNr) amplificadas por PCR y a métodos independientes de cultivo basados en éstas secuencias (Pace, 1997; Tringe y Hugenholtz, 2008 y Porazinska *et al.*, 2009). El uso de marcadores genéticos para estudiar la diversidad y estructura de comunidades de microorganismos complejas ha resultado ser una excelente herramienta en ecología microbiana, es por ello que en esta investigación se abarca el estudio a nivel molecular de las cepas bacterianas antagonicas contra *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*.

### **1.7 Producción de exoenzimas y metabolitos secundarios de cepas bacterianas con potencial antagónico**

Actualmente, la estrategia de control más utilizada contra *Fusarium* en mazorcas de maíz es de manera preventiva y/o química, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias para el control de estas. Una de estas estrategias puede ser el uso de antagonistas como agentes de biocontrol, la cual es considerada una alternativa complementaria para reducir el uso de productos químicos en la agricultura. Dentro del grupo de bacterias antagonicas se encuentran las que producen metabolitos específicos capaces de actuar contra patógenos. Las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia para estimular y promover el desarrollo de grupos

específicos de microorganismos antagonistas autóctonos como primera línea de defensa contra patógenos (Cook *et al.*, 1995; Landa *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2007).

En particular, las bacterias asociadas a las plantas que muestran diferentes propiedades antagonistas pueden ser encontradas en la rizosfera, en la biosfera, dentro de los tejidos de las plantas sanas como endófitos y en la micosfera de algunos hongos formadores de esclerocios. Además, diversas investigaciones sobre comunidades bacterianas en el suelo rizosférico y raíces de muchas especies de plantas han demostrado que producen efectos beneficiosos en el crecimiento y sanidad de las mismas tanto directa como indirectamente, y que estas comunidades bacterianas están fuertemente influenciadas por la especie de la planta y viceversa (Germida *et al.*, 1998; Marilley y Arango, 1999; Berg *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2007 y Jung *et al.*, 2008).

Por lo tanto, las comunidades bacterianas autóctonas podrían ser consideradas una importante fuente de nuevos aislados microbianos tales como los involucrados en la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y componentes antimicrobianos, promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica en la planta que podrían ser utilizados para futuras aplicaciones biotecnológicas como el desarrollo de agentes de control biológico de organismos fitopatógenos o para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos (Berg *et al.*, 2005, Germida *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2004).

Dentro del grupo de bacterias antagónicas se encuentran las que producen metabolitos específicos capaces de actuar contra insectos, hongos y nemátodos

(Knaak et al., 2007; Snook et al., 2009). Bacterias que pertenecen a éste grupo son frecuentemente representados por los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.

*Pseudomona syringae* produce metabolitos conocidos como pseudomicinas que se han probado contra patógenos fúngicos responsables de los daños en humanos y plantas. Se ha investigado que las pseudomicinas tienen efecto contra diversos microorganismos patógenos (Strobel y Rodríguez, 2005). La investigación de cepas bacterianas del género *Pseudomonas* hizo posible la obtención, mediante procesos biotecnológicos patentados, del primer biofungicida para el control de fitopatógenos foliares, cuya eficacia contra *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* fue comprobada en un cultivo protegido de tomate (Stefanova, 2006).

La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (P<sub>g</sub>P<sub>b</sub>) para el control biológico de *P. grisea* fue estudiada por Hernández *et al.* (2010), los resultados mostraron que en la rizosfera del cultivo del arroz existen altos porcentajes de P<sub>g</sub>P<sub>b</sub> con actividad de control biológico ante *P. grisea*, las que fueron identificadas como *Burkholderia* sp., *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*. La mayoría de los *Bacillus* spp. producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Leelasuphakul et al., 2008). De hecho, *Bacillus* sp. actúa vía antibiosis, competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Kloepper et al ., 2004).

Múltiples mecanismos de biocontrol han sido implicados en la supresión de enfermedades de raíz causadas por hongos mediante *Pseudomonas* y *Bacillus* incluyendo: i) la producción de antibióticos, toxinas, bio-surfactantes y enzimas líticas,

ii) competencia por los nichos de la raíz, nutrientes y minerales y, iv) inducción de resistencia sistémica. Esto ha llevado a sugerir que el principal éxito de un agente de biocontrol es atribuible en gran parte a las presencia de múltiples mecanismos de biocontrol (Vassilev *et al.*, 2006).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Aislamiento e identificación de bacterias antagonicas asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*, (1964), causante del diente de caballo del maíz.

### 2.2 Objetivos específicos

- Examinar la estructura y densidad poblacional de las comunidades bacterianas cultivables asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea*.
- Evaluar el potencial antagonista *in vitro* de las poblaciones bacterianas contra 3 especies de *Fusarium* patógenas en el cultivo de maíz.
- Identificar mediante la amplificación del gen 16s ADNr las cepas más sobresalientes en actividad antagonista.
- Caracterizar las poblaciones bacterianas antagonistas en la producción de exoenzimas y metabolitos secundarios
- Conformar una colección de aislados bacterianos con alto potencial antagonista contra enfermedades fungosas causadas por *Fusarium* en el cultivo de maíz.

### III. HIPÓTESIS

Las poblaciones bacterianas cultivables asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea*, son una fuente de bacterias con alto potencial antagónico contra enfermedades fungosas causadas por *Fusarium* en el cultivo del maíz.

### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Colecta de granos de maíz con *C. gigantea*

*Claviceps gigantea*, es una enfermedad endémica de los valles altos de México por lo que la mayor parte del experimento se realizó con material obtenido de dicha zona. Se realizaron colectas de esclerocios de *C. gigantea* en los sitios de Almoloya de Juárez (19°22'00" N, 99°46'00" W), Atlacomulco (2 lotes)(19°43'00" N, 99°52'00" W), Calimaya (2 lotes) (19°10'25" N, 99°37'02" W), Mina México (19°33'01" N, 99°56'13" W), Toluca (19°17'32" N, 99°39'14" W) y Villa Victoria (19°26'00" N, 100°00'00" W), en el estado de México. El material fue colectado, etiquetado y posteriormente trasladado al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, donde se conservó a 4 °C en un cuarto frío del Instituto de Fitosanidad, para su posterior utilización.

#### 4.2 Determinación del número de muestra de esclerocios a utilizar

Para calcular un número representativo de muestra de esclerocios a procesar, se seleccionaron 20 esclerocios al azar de la comunidad de Atlacomulco, México, y se siguió el proceso de diluciones seriadas (1:4). 100 ul de cada dilución se sembraron en placas Petri con medio de cultivo R2A-agar con tres repeticiones y se incubaron a 28 °C durante 24 h.

Para determinar el número de muestra, se utilizaron los promedios de las ufc g<sup>-1</sup> de los esclerocios procesados mediante la siguiente fórmula estadística, (Cochrán, 1982) que determina el número de muestra a utilizar:

$$n = \frac{NS^2Z^2\alpha / 2}{Nd^2 + S^2Z^2\alpha / 2}$$

También se utilizó un método gráfico complementario que consiste en graficar los promedios de las ufc/g conforme se incrementa la muestra y permite corroborar el tamaño de muestra obtenido con la fórmula estadística.

#### **4.3 Extracción de poblaciones bacterianas totales asociadas a esclerocios de *C. gigantea***

Una vez determinado el tamaño de muestra (10 esclerocios), se seleccionaron los esclerocios de 8 lotes de muestreo (Almoloya de Juárez, Atlacomulco (2 lotes), Calimaya (2 lotes), Mina México, Toluca y Villa Victoria), para realizar la extracción de poblaciones bacterianas a partir de estos. Se seleccionaron diez esclerocios al azar por lote de muestreo. De cada esclerocio se tomó 1 g y se realizaron diluciones seriadas (10<sup>-4</sup>) en agua destilada estéril con tres repeticiones. De cada dilución se sembraron 100 µL en placas Petri con medio de cultivo R2A-agar (Difco) y la suspensión se distribuyó en el medio con asas L-Digralsky. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Se cuantificaron las colonias bacterianas (dilución 10<sup>-4</sup>) y se calcularon las unidades formadoras de colonias por gramo de esclerocio (ufc g<sup>-1</sup>) por cada lote de muestreo mediante el criterio propuesto por Guazmán (2011). A partir del crecimiento bacteriano, se seleccionaron al azar 10 colonias por repetición que mostraron

diferencias morfológicas y se transfirieron a placas con medio R2A-agar (Difco), obteniendo un total de 30 bacterias por muestra y 300 bacterias por lote de muestreo. Se registró el número de colonias fluorescentes bajo luz UV (380 nm) pertenecientes al grupo *Pseudomonas*. Todas las bacterias seleccionadas se preservaron por congelación (-20 °C) en caldo nutritivo y glicerol (solución acuosa 40%) (1:1 v/v).

#### **4.4 Extracción de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a esclerocios de *C. gigantea***

Para la extracción dirigida de las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes se utilizó medio B de King líquido suplementado con los antibióticos cycloheximide, ampicilina y cloranfenicol (Landa, *et al.*, 2006). Se realizaron diluciones en serie a partir de 1 g de esclerocio mediante la técnica de dilución en microplaca (Fig. 1) (Shiva, 2007). Las microplacas se incubaron a 28 °C durante 72 h para posteriormente observar bajo luz UV la producción de pigmento fluorescente. Las bacterias fluorescentes se transfirieron a placas Petri con medio de cultivo B de King para su purificación y preservación.



Figura 1. Extracción de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes en microplaca de 96 pocillos con medio B de King líquido suplementado con cycloheximide, ampicilina y cloranfenicol.

#### **4.5 Extracción de poblaciones de *Bacillus* spp. asociadas a esclerocios de *C. gigantea***

La extracción dirigida de poblaciones de *Bacillus* spp se realizó utilizando un buffer (solución amortiguadora) de extracción a base de sulfatos que contiene ( $\text{g}^{-1}$ ): NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44 g y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24 g ajustando a un pH de 7.5. Se tomó un gramo de cada esclerocio utilizado con anterioridad, estos se colocaron en tubos para microcentrífuga (1.5 ml) con 1 ml de buffer y se agitaron en vórtex durante 30 s. Posteriormente los tubos se sometieron a un tratamiento de calor en baño María a 60 °C durante 10 min, para estimular la liberación de endoesporas de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. De cada tubo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión, se sembraron por triplicado en placas Petri con medio de cultivo R2A-agar y se incubaron a 28 °C durante 24 h. A partir del crecimiento bacteriano, se separaron las colonias morfológicamente distintas para su purificación y preservación. Las cepas bacterianas se preservaron en tubos criogénicos (1.5 ml) con caldo nutritivo y glicerol (solución acuosa 40%) (1:1 v/v) en congelación a -20 °C.

#### **4.6 Antagonismo *in vitro* de bacterias asociadas a *C. gigantea* contra *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides***

Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante el cultivo dual *in vitro* en el medio de cultivo Waksman agar que contiene ( $\text{g}^{-1}$ ): agar 20 g, glucosa 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g, peptona 5.0 g y un pH final ajustado a 6.8, utilizando todas las colonias bacterianas seleccionadas (129 en total) versus tres especies patógenas de

*Fusarium* aisladas de mazorcas de maíz (*F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) e identificadas en el instituto de genética del Colegio de Postgraduados.

La preparación del inóculo de las bacterias seleccionadas se realizó en microplacas de 96 pocillos con 300 µL de caldo nutritivo, las cuales se incubaron durante 48 h a 28 °C. Para el caso de *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se realizaron suspensiones de conidios de las tres cepas ajustadas a una concentración aproximada de 18,000 conidios ml<sup>-1</sup> utilizando la cámara de Neubauer.

En la primera etapa, la valoración del antagonismo *in vitro* se realizó utilizando placas Petri cuadradas con dimensiones de 120 X 120 mm con medio de cultivo Waksman agar. Se inocularon 300 µL de la suspensión de conidios de cada cepa del hongo, distribuyendo la suspensión con ayuda de una asa L-Drigralsky. Las placas inoculadas se mantuvieron por 1 h a temperatura de laboratorio para permitir la completa absorción de la suspensión en el medio de cultivo. Posteriormente, las bacterias seleccionadas se inocularon mediante un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator) realizando un sello en la superficie del medio permitiendo la inoculación simultánea de 96 bacterias. El testigo fue una placa en la que se sembró únicamente el hongo. Las placas se incubaron a 28 °C realizando observaciones cada 24 h. El ensayo se realizó con 3 repeticiones. Durante esta primera fase se seleccionaron todas aquellas cepas bacterianas que mostraron antagonismo hacia una o más especies de *Fusarium* evaluadas.



Figura 2. Microplaca de 96 pocillos con el inoculador multipunto y la fuente de inoculo bacteriano.

En la segunda fase, se realizó el mismo ensayo, con las bacterias que mostraron antagonismo en la primera fase. Se utilizaron nuevamente placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) en medio de cultivo Waksman agar con las 3 especies de *Fusarium*. 300  $\mu$ L de la suspensión del hongo en cada placa se distribuyeron con ayuda de un asa L-Digralsky estéril. Las placas fueron divididas en 25 cuadrantes (2.4 x 2.4 cm) y las bacterias antagonistas seleccionadas se inocularon por punción en el centro de cada cuadrante. Las placas se incubaron a 28 °C realizando observaciones cada 24 h. El ensayo se realizó con 3 repeticiones. En esta segunda fase el antagonismo se valoró mediante la medición del halo de inhibición alrededor de la colonia bacteriana inoculada, el halo de inhibición se midió en mm y se establecieron rangos de acuerdo al grado de inhibición ( $\geq 5$ mm=+++, 4-3mm=++, 2-1mm=+, sin halo de inhibición= -).

#### **4.7 Extracción de ADN de las cepas bacterianas antagonistas**

A partir de un cultivo puro de los antagonistas bacterianos en medio agar nutritivo (AN), se preparó una suspensión celular acuosa en 20  $\mu$ L de agua ultrapura (Gibco®, California, E.U.) en tubos para PCR de 0.2 ml, estériles y libres de DNAsas; la suspensión se agitó con vórtex. El ADN de las muestras se obtuvo por lisis térmica,

llevando las suspensiones de -20 °C a 95 °C y manteniendo en esa temperatura durante 10 minutos (Aranda, 2010).

#### **4.8 Amplificación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas**

La amplificación del gen 16s ADNr se llevó a cabo utilizando los iniciadores universales 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Baker *et al.*, 2003). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 µL, usando 1 µL de los iniciadores a una concentración de 50 µM; amortiguador para PCR a concentración final de 1 X; MgCl<sub>2</sub>, a 1.8 mM; dTP's a 200 µM (Thermo Scientific, Lituania); 1.5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 1 µL de ADN. Las condiciones de PCR consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 54 °C durante 45 segundos y extensión a 70 °C por 1 minuto; y 8 minutos a 70 °C para la extensión final.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler modelo Nexus gradient (Eppendorf, Alemania). Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % y visualizando en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, E. U. A.)

#### **4.9 Secuenciación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas antagonistas**

Los productos de PCR amplificados con los iniciadores 8F y 1492R fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Corea) para la secuenciación, junto con los respectivos iniciadores que se emplearon para obtenerlos. Una vez que se obtuvieron las secuencias, se compararon con la base de datos del GenBank del NCBI (National

Center for Biotechnology Information) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1997).

#### **4.10 Producción de ácido indol acético (AIA)**

La capacidad de los aislados bacterianos antagonistas de producir ácido indol-3-acético (AIA) se determinó siguiendo el método de Sawar y Kremer (1995). Los aislados bacterianos crecieron en el medio de acuerdo al protocolo descrito (g l<sup>-1</sup>) Caldo Soja Triptona 3.0 g agar 15.0 g) incubado a 28°C por 24 h en microplacas de 96 pocillos. Las bacterias fueron inoculadas en punto con palillo estéril. Después de la incubación se agregaron 3 µL de reactivo de Kovac en cada pocillo con ayuda de una multipipeta (Transferpette®, -8/-12). Las cepas bacterianas positivas (+) para la producción de AIA fueron identificadas por la formación de un halo rojo rodeando la zona inmediata donde se ubica el punto de crecimiento bacteriano. Todas las cepas fueron evaluadas por triplicado.

#### **4.11 Actividad lipolítica**

Para determinar la actividad lipolítica se utilizó el medio Tween 80 agar (Sigma, St. Louis, Mo.). (Chernin *et al.*, 1995). Con el medio ajustado a un pH de 6.8 vertido en placas Petri (120mm x 120mm), las cepas en estudio se sembraron en punto con ayuda de palillos estériles. Las placas inoculadas se incubaron a 30 °C y se examinaron diariamente por 10 días. Las cepas positivas (+) para la actividad lipolítica se identificaron por la formación de un halo turbio alrededor de la colonia bacteriana. Todas las cepas se evaluaron por triplicado.

#### **4.12 Actividad proteolítica**

Para determinar la actividad proteolítica se utilizó un sustrato con 50 ml de leche descremada estéril mezclada a 55 °C con 50 ml de 1/5 de caldo soja triptona (TSB) y 4 g de agar en placas Petri cuadradas (120mm x 120mm), de acuerdo al criterio descrito por Chernin *et al.*, (1995). La inoculación de las bacterias se realizó en punto con ayuda de palillos estériles. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 48-72 h para hacer observaciones diarias durante 10 días.

La detección de un halo hialino alrededor de la colonia indica actividad proteolítica de las cepas. Todas las cepas se evaluaron por triplicado.

#### **4.13 Producción de sideróforos**

La producción total de sideróforos se evaluó bajo condiciones limitantes de hierro mediante el ensayo universal de producción de sideróforos desarrollado por Schwyn y Neilands (1987). Se utilizó el medio de cultivo CAS agar. Las bacterias evaluadas se inocularon en punto con ayuda de palillos estériles y posteriormente las placas se incubaron a 28 °C durante 5 días para hacer observaciones diarias. La formación de un halo amarillo-naranja alrededor de la colonia inoculada fue indicativo de la producción de sideróforos por la cepa en estudio. Todas las cepas se evaluaron por triplicado.

#### **4.14 Solubilización de fosfato mineral**

La capacidad de los aislados bacterianos para solubilizar fosfatos fue evaluada en el medio de cultivo TCP conteniendo ( $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  4 g, glucosa 10 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g,  $\text{NaCl}$  1 g,  $\text{MgSO}_4$  1, agar 20 g, con un pH ajustado a 7.2 (Abou *et al.*, 2007). Dicha

habilidad se midió utilizando placas Petri cuadradas (120mm x 120mm). Las bacterias fueron inoculadas en punto sobre el medio con ayuda de palillos estériles, y posteriormente incubadas a 28 °C donde se realizaban observaciones diarias. La detección de zonas claras (halos) alrededor del crecimiento bacteriano después de 5 días de incubación indicó solubilización de fosfato mineral.

#### **4.15 Preservación de bacterias y elaboración de colección**

Las cepas seleccionadas con el mejor perfil antagonista se mantuvieron en preservación en caldo nutritivo y glicerol al 40% (solución acuosa) (1:1 v/v), a -20 °C. Todas las cepas se identificaron y conservaron por duplicado para estudios posteriores.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **5.1 Determinación del número de muestra a utilizar**

Sustituyendo los datos en la fórmula estadística para determinar el número de muestra a utilizar (Cochran, 1982), con un nivel de confiabilidad del 95 %, se obtuvieron los siguientes cálculos:

$$n = \frac{(20)(227.957)(3.8416)}{(20)(49.6) + (227.957)(3.8416)} = 9.37$$

Los resultados obtenidos con un nivel de confianza del 95%, indican que el número de esclerocios a utilizar es de 9.37. Diez esclerocios conforman un tamaño de muestra adecuado para estimar la media poblacional. Cochran (1982), menciona que se considera 95% un nivel alto de confianza además de que se selecciona éste para evitar un costo muy alto para el estudio o debido a que en ocasiones llega a ser

prácticamente imposible el manejo de todos los casos, así se busca un porcentaje de confianza menor. Comúnmente en las investigaciones científicas el porcentaje deseado es de 95%. En el método gráfico complementario (Fig. 3) se observa que la curva de medias se estabiliza a partir del esclerocio número 6, y tal como en el método de ecuación, se tiene que con un nivel de confiabilidad del 95% el número de muestra es de 10 esclerocios.

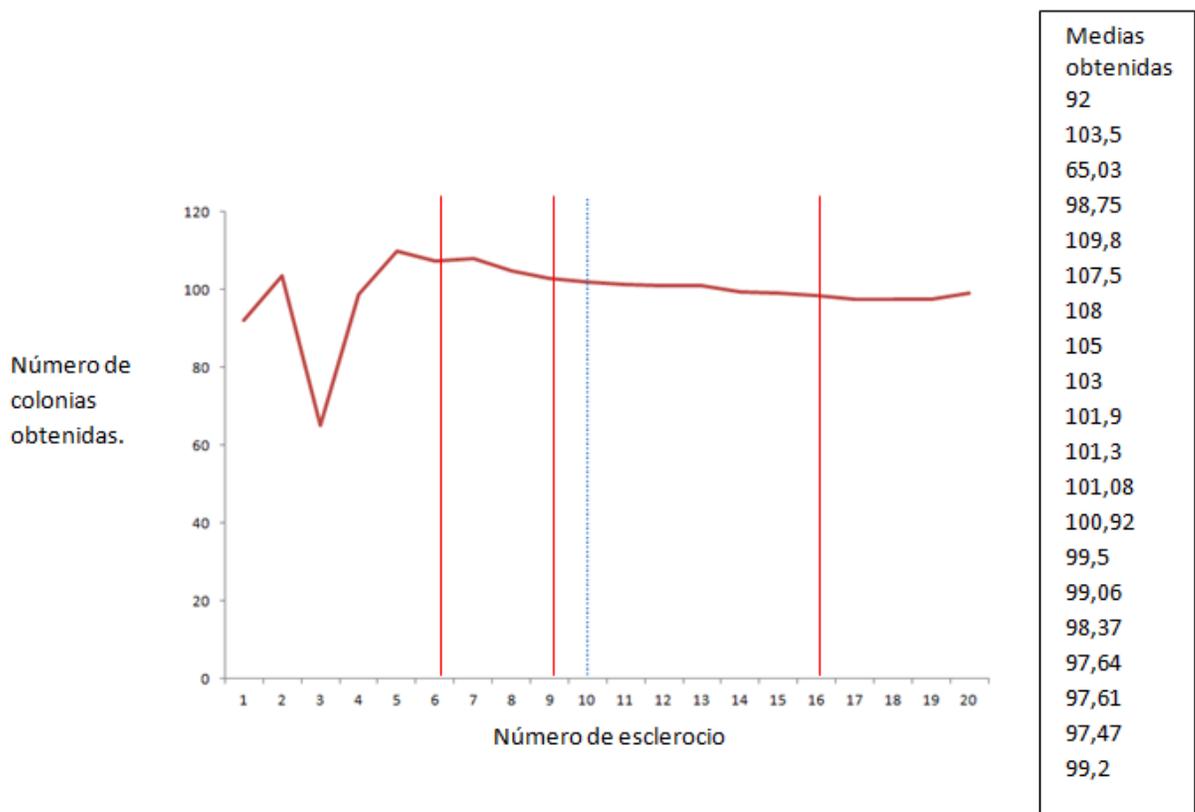


Figura. 3. Determinación del número mínimo de esclerocios de *C. gigantea* a utilizar en base a número de colonias bacterianas obtenidas en 20 esclerocios al azar

## 5.2 Extracción de bacterias asociadas a esclerocios de *C. gigantea*



Figura. 4. Diversidad de poblaciones bacterianas a partir de esclerocios enteros de *C. gigantea*.

A continuación se presentan los datos obtenidos a partir de la dilución  $10^{-4}$  (Fig. 4) de los ocho lotes de muestreo. Se muestra una media por lote, en la que se consideran los datos de las tres repeticiones de las diez muestras procesadas. Con estos datos, se calculó el número de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de esclerocio, por lote de muestreo.

Cuadro 1. Promedio de colonias bacterianas obtenidas y UFC por gramo de esclerocio por lote de muestreo.

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>Media</b>	<b>UFC/g/ml</b>
Almoleya de Juárez	204.1	8.16+01
Atlacomulco	249.9	1.00+02
Atlacomulco (2)	236.2	9.45+01
Calimaya	141.6	5.66+01
Calimaya (2)	188.8	7.55+01
Mina México	200.4	8.02+01
Toluca	133.6	5.34+01
Villa Victoria	105.6	4.22E+01

En el Cuadro 1 se observa que en los dos lotes de Atlacomulco se observó una mayor densidad poblacional bacteriana, mientras que en el lote de Villa Victoria se

encontró la menor densidad. Estos datos son de utilidad puesto que dan una idea de la distribución de organismos asociados a esclerocios de *C. gigantea* por zona o lote de muestreo. Estas diferencias se pueden comparar de manera gráfica, mostrando el promedio de colonias bacterianas obtenidas por lote de muestreo (Fig. 5):

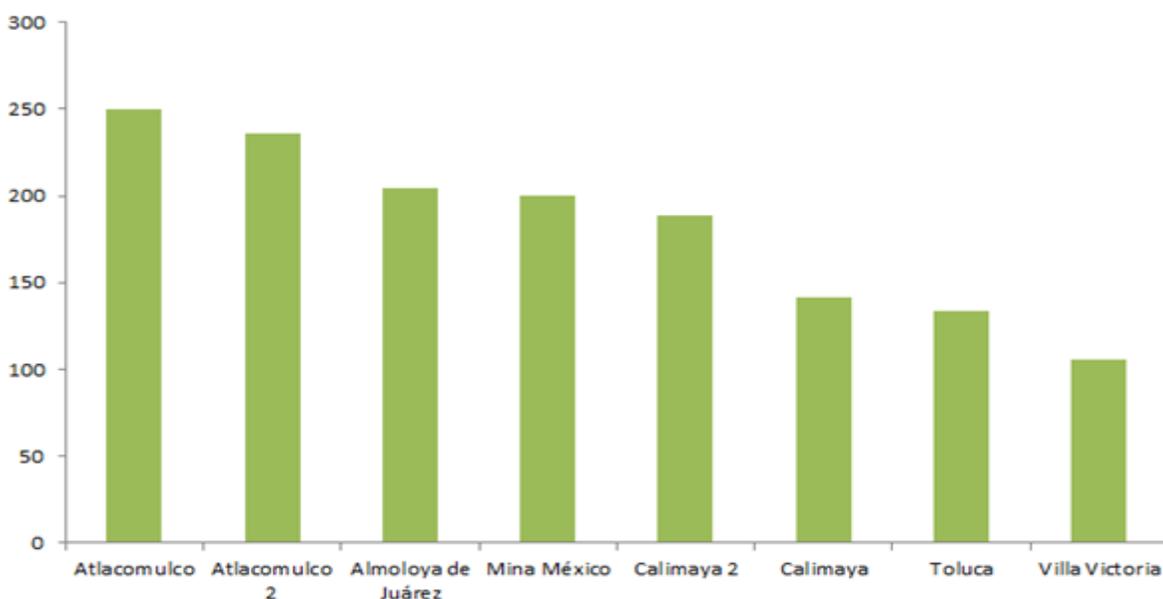


Figura 5. Promedio de colonias bacterianas obtenidas por lote de muestreo

Nuevamente, se observa que en los lotes de Atlacomulco existe mayor diversidad y densidad de colonias bacterianas, mientras que en el lote de Villa Victoria es en dónde se encontró la menor cantidad. Pueden existir factores que expliquen la diversidad poblacional de colonias bacterianas asociadas a esclerocios de *C. gigantea* tales como la cantidad de productos químicos utilizados en el manejo del cultivo en cada lote de muestreo, desechos y residuos químicos que pudieran minimizar y afectar la diversidad biológica y genética de microorganismos, específicamente organismos benéficos. Se sabe que al utilizar productos químicos para disminuir el efecto de algunos patógenos en las plantas puede tener efectos contraproducentes al aminorar también organismos benéficos (FAO, 2010).

En este caso, resalta la importancia de realizar análisis de residuos químicos en los lotes de muestreo para contar con información que permitiera agrupar y analizar posibles razones de la diferencia en cuanto a poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios del diente de caballo por lote de muestreo. Para agrupar representantes del género *Pseudomonas*, de las poblaciones bacterianas extraídas a partir de los esclerocios se agruparon y registraron todas aquellas que produjeron pigmento fluorescente bajo luz UV (380 nm) (Fig. 6).

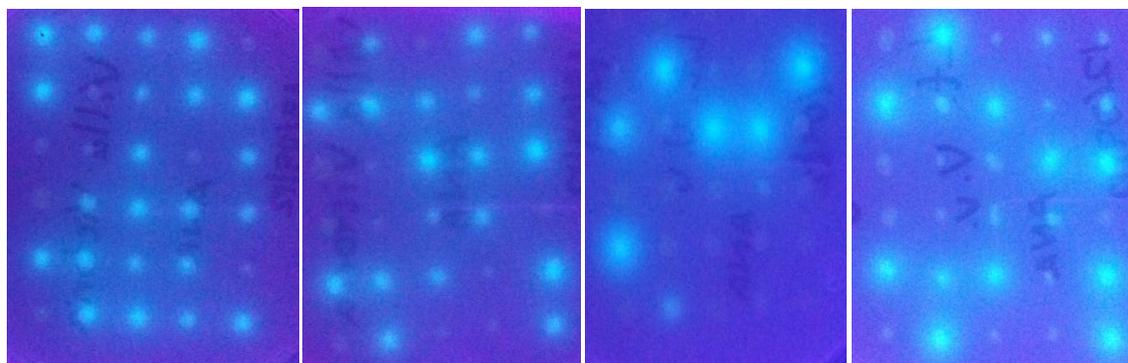


Figura 6. Colonias bacterianas fluorescentes bajo luz UV (380 nm)

También se registró el número de colonias bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales se determinaron por características morfológicas distintivas de dicho género (tinción de Gram, forma de crecimiento y color, entre otros).

### **5.3 Pruebas de antagonismo in vitro de bacterias asociadas a *C. gigantea* contra *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides***

#### Primera fase de las pruebas de antagonismo

Esta primera fase se realizó con la finalidad de descartar la mayor cantidad de bacterias sin potencial antagónico contra las especies de *Fusarium*, se realizó la primera fase con ayuda del multipunto de 96 entradas (aproximadamente 1 cm de

separación entre cada colonia bacteriana). Se reislaron todas aquellas bacterias que mostraron halos de inhibición y las más cercanas a ellas para una segunda fase con estos aislamientos bacterianos seleccionados. Algunos resultados de inhibición se observan en la fig. 7.

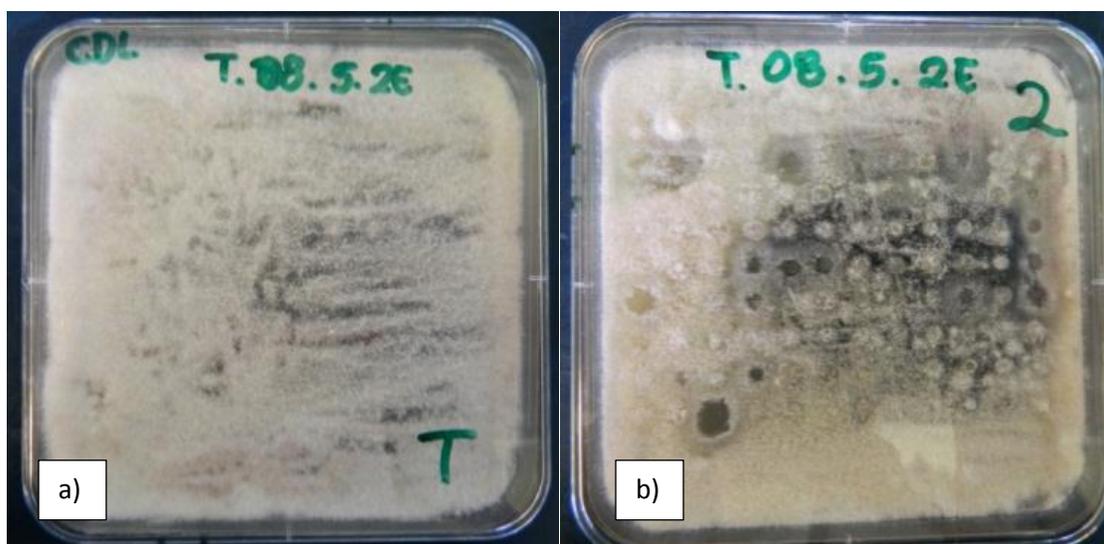


Figura 7. a) testigo (*F. subglutinans*) y b) zonas de inhibición hongo versus bacteria.

De 129 colonias bacterianas, 85 contra *F. graminearum*, 73 para *F. subglutinans* y 89 para *F. verticillioides* fueron consideradas para la segunda fase de pruebas de antagonismo in vitro. Para esta primera fase el 69% de las colonias bacterianas mostró antagonismo en diferentes grados de inhibición.

#### Segunda fase de las pruebas de antagonismo.

La segunda fase del antagonismo se realizó bajo la misma metodología previamente descrita, pero utilizando un distribución y separación mayor entre cada bacteria (25 bacterias por placa Petri de 120mm x 120mm) (Fig. 8).

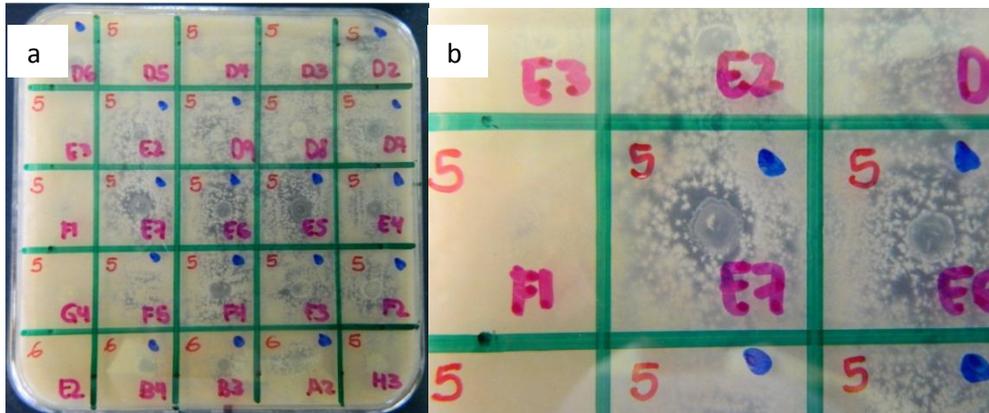


Figura 8. a) Distribución de 25 bacterias en la placa confrontando al hongo (*F. graminearum*), y b) halo de inhibición.

Los resultados indican que de 85 bacterias evaluadas, mostraron antagonismo: 53 para *F. graminearum*, 41 para *F. subglutinans* y 48 para *F. verticillioides*. Los aislamientos seleccionados en esta fase se caracterizaron por su antagonismo *in vitro* mediante la medición del halo de inhibición contra los tres patógenos fúngicos evaluados (Fig. 9). La medición de los halos de inhibición *in vitro* se realizó con tres repeticiones.

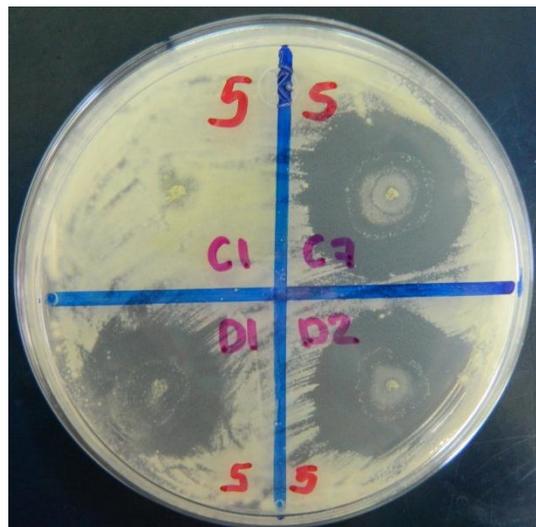


Figura 9. Halos de inhibición del antagonismo *in vitro* observados con *F. subglutinans*

Posteriormente se redujo el número de colonias bacterianas antagonistas contra cada hongo, y se seleccionaron únicamente aquellas cepas cuya actividad antagonista estuviera en un rango  $\geq 5$  mm en el halo de inhibición ( $\geq 5$ mm=+++). 16 bacterias para *F. graminearum*, 14 para *F. subglutinans* y 11 para *F. verticillioides*.

Finalmente se seleccionaron 22 cepas bacterianas con el mayor potencial de inhibición *in vitro* ( $\geq 5$  mm) contra los tres patógenos fungosos evaluados, Dentro de estas 22 cepas bacterianas, algunas de ellas mostraban antagonismo contra una, dos o las tres especies de hongos evaluados (cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio del halo de inhibición *in vitro* de las 22 cepas bacterianas contra las 3 especies *Fusarium* spp.

CEPA	Halo de inhibición (mm)		
	<i>F. graminearum</i>	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. verticillioides</i>
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
BA1	5	6.3	6
BA2	6	7	6
BA3	0.0	5	5
BA4	5.3	0.0	5.6
BA5	6	0.0	5
BA6	5	0.0	0.0
BA7	6.3	0.0	0.0
BA8	0.0	5	0.0
BA9	0.0	0.0	5
BA10	5.6	5	0.0
BA11	6.3	5	0.0
BA12	5	5	0.0
BA13	5.3	5	0.0
BA14	5.3	5.3	0.0
BA15	6	5.6	0.0
BA16	5.6	5	0.0
BA17	0.0	5	0.0
BA18	6.3	5	6.3
BA19	0.0	5.6	5.3
BA20	5	0.0	5
BA21	5.3	0.0	7
BA22	0.0	0.0	5

#### 5.4 Amplificación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas antagonistas

Todas las amplificaciones realizadas a partir de las 22 cepas bacterianas generaron amplicones de aproximadamente 1500 pb (Fig. 10) como resultado de la PCR con los iniciadores 8F y 1492R, lo que corresponde con el tamaño del amplicón que se esperaba para el gen 16s ribosomal. Tanto la posición del fragmento (tamaño) como el área de éste se consideraron parámetros para la comparación de los perfiles bacterianos después de ser estandarizados, Hackl *et al.* (2004)

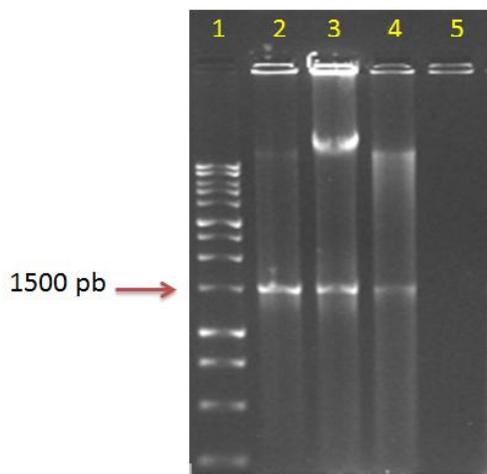


Figura 10. Amplificación del gen 16s ADNr utilizando los primers 8f y 1492r. Carril 1) Marcador de peso molecular de 10000 pb; Carriles 2, 3 y 4) Amplificación del gel 16s ADNr en 1500pb; Carril 5) Control negativo.

#### 5.5 Secuenciación del gen 16s ADNr de las cepas bacterianas

Para el gen 16s ribosomal las secuencias de la cepas coincidieron en términos porcentuales y fueron identificadas con una identidad de 99% de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI.

Cuadro 3. Identificación mediante el gen 16s ADNr de las 22 bacterias antagonicas a *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*.

Antagonista	Identificación	Antagonismo <i>in vitro</i> vs <i>Fusarium</i> spp.	Origen de la cepa (Lote)
BA1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fg, Fs, Fv</i>	Atlacomulco
BA2	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Fg, Fs, Fv</i>	Atlacomulco
BA3	<i>Delftia lacustris</i>	<i>Fs, Fv</i>	Atacomulco (2)
BA4	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Fg, Fv</i>	Mina México
BA5	<i>Delftia acidovorans</i> sp.	<i>Fg, Fv</i>	Calimaya
BA6	<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Fg</i>	Calimaya
BA7	<i>Pseudomonas geniculata</i>	<i>Fg</i>	Atlacomulco
BA8	<i>Micromonospora</i> sp.	<i>Fs</i>	Mina México
BA9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Fv</i>	Mina México
BA10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Fg, Fs</i>	Calimaya
BA11	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fg, Fs</i>	Atlacomulco
BA12	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Fg, Fs</i>	Toluca
BA13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fg, Fs</i>	Atlacomulco
BA14	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fg, Fs</i>	Atlacomulco
BA15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fg, Fs</i>	Atlacomulco
BA16	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fg, Fs</i>	Atlacomulco (2)
BA17	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fs</i>	Atlacomulco
BA18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fg, Fs, Fv</i>	Atlacomulco
BA19	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Fs, Fv</i>	Atlacomulco
BA20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fg, Fv</i>	Toluca
BA21	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Fg, Fv</i>	Atlacomulco
BA22	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Fv</i>	Toluca

\**Fg*=*Fusarium graminearum*

*Fs*=*Fusarium subglutinans*

*Fv*=*Fusarium verticillioides*

En relación a las 22 cepas bacterianas antagonistas bajo este estudio, la mayoría fueron identificadas dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. El 36.3% de las cepas bacterianas identificadas son pertenecientes al género *Pseudomonas* (8 cepas), entre las cuáles se encontraron *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%) así como *Pseudomonas* sp., *P. geniculata* y *P. syringae* (12.5% c/u).

El 31.8% de las cepas bacterianas pertenecen al género *Bacillus* (7 cepas), entre las que se encuentran *B. amyloliquefaciens* (57.1%), *B. subtilis* (28.5%) y *Bacillus* sp (14.2%). También se identificaron cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Delftia* y *Stenotrophomonas* en un 9.09% cada una (2 cepas), así como también una cepa bacteriana de *Sphingobacterium*, *Micromonospora* y *Staphylococcus*, representando cada una el 4.5% del total de las 22 cepas identificadas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución taxonómica de las 22 bacterias antagonistas contra *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*.

<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>(%)</b>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<b>33.6</b>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<b>31.8</b>
Proteobacteria	Beta Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Delftia</i>	<b>9.09</b>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	<b>9.09</b>
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	<b>4.5</b>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	<b>4.5</b>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<b>4.5</b>

De acuerdo a los resultados de la secuenciación del gen 16s ADNr, las cepas más sobresalientes que mostraron antagonismo para *F. graminearum* fueron *Pseudomonas geniculata* (BA7), *P. putida* (BA11) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), para *F. subglutinans* fueron *P. syringae* (BA2) y *Bacillus subtilis* (BA1) y para *F. verticillioides* fueron *Pseudomonas putida* (BA21) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18)

La distribución de las 22 bacterias antagonistas contra las 3 especies de *Fusarium* aisladas a partir de esclerocios de *C. gigantea* fueron en su mayoría de Atlacomulco (50%), Atlacomulco 2 (9.09%); Mina México, Calimaya, Toluca (con

13.63%) por cada lote. Dentro del lote de Atlacomulco se aislaron las cepas BA1 (*B. subtilis*), BA2 (*P. fluorescens*), BA7 (*P. geniculata*), BA11 (*P. putida*), BA13 (*P. fluorescens*), BA14 (*B. subtilis*), BA15 (*B. amyloliquefaciens*), BA17 (*P. fluorescens*), BA18 (*B. amyloliquefaciens*), BA19 (*Pseudomonas sp.*) y BA21 (*P. putida*). Todas las bacterias que mostraron mayor inhibición para *F. graminearum* (BA7, BA11 y BA18), *F. subglutinans* (BA1 y BA2) y *F. verticillioides* (BA18 y BA21), pertenecieron a este lote de muestreo.

Dentro del grupo de bacterias antagónicas se encuentran las que producen metabolitos específicos capaces de actuar contra insectos, hongos y nemátodos (Knaak et al., 2007; Snook et al., 2009). Bacterias que pertenecen a éste grupo son frecuentemente representados por los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. La investigación de cepas bacterianas del género *Pseudomonas* hizo posible la obtención, mediante procesos biotecnológicos patentados, del primer biofungicida para el control de fitopatógenos foliares, cuya eficacia contra *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* fue comprobada en un cultivo protegido de tomate (Stefanova, 2006). El género *Pseudomona* produce metabolitos conocidos como pseudomicinas que se han probado contra patógenos fúngicos responsables de los daños en humanos y plantas. Se ha investigado que las pseudomicinas tienen efecto contra diversos microorganismos patógenos (Strobel y Rodríguez, 2005).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como las *P. fluorescens*, se destacan por sus efectos positivos, tanto para las plantas como para los ecosistemas; este efecto se manifiesta a través de diferentes mecanismos de acción. Existe una cierta proporción que se debe a efectos antimicrobiales directos o indirectos, ya que

muchos estudios muestran que algunas especies de *Pseudomonas* inhiben el crecimiento y deterioran algunos microorganismos patógenos, entre ellos *Fusarium* spp. (Cook, 1993).

Hernández *et al.* (2010) demostraron que *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* inducen a la producción de altos porcentajes de promotores de crecimiento vegetal. Mientras que el género *Bacillus* se encuentra entre los agentes más adecuados para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su presencia en la naturaleza (Chatterjee *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2008). Este género, además ha tenido mucho éxito en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos (Sosa *et al.*, 2006; Reinoso, 2007). La mayoría de los *Bacillus* spp. producen muchas clases de antibióticos como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008). De hecho, *Bacillus* sp. actúa vía antibiosis, competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Kloepper *et al.*, 2004).

Entre los microorganismos más utilizados para el control de fitopatógenos fúngicos se encuentra el género *Bacillus* spp. (Travers, 1989; Meadows, 1992), debido a que tienen la facilidad de digerir la quitina, de algunos hongos además de la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina (Bernal, 2002), bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, que son efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* y/o *in situ* (Pal y Gardener, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008). Además, *Bacillus* sp. actúa vía antibiosis,

competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Kloepper *et al.*, 2004). Dentro del género *Bacillus* la especie con mayores antecedentes como antagonista es *Bacillus subtilis*. Varios autores han analizado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas (Cazorla y Romero, 2007). Numerosos estudios sugieren la utilización de *B. subtilis* para controlar biológicamente diversos hongos fitopatógenos (Soldano *et al.*, 2010).

Corrales, *et al.* (2011), realizaron estudios de antagonismo *in vitro* de en cultivo dual de aislados de *Bacillus* contra *Fusarium* spp., y encontraron porcentajes de inhibición muy satisfactorio. Mencionan además que sus resultados fueron los esperados, debido a que especies de *Bacillus* han sido reportadas como efectivos biocontroladores de múltiples fitopatógenos por su capacidad de producir varios antibióticos de amplio espectro, característica que ha permitido utilizarlos como fungicidas comerciales (Travers, 1989; Lee, *et al.*, 2006).

Se reporta que *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* han presentado desempeño positivo en pruebas *in vitro* contra *Fusarium*, probablemente por la capacidad de secretar lipopéptidos antibióticos del grupo Iturin cuyo mecanismo de acción va dirigido sobre la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula fúngica, de tal forma que inhibe el crecimiento micelial y la esporulación del hongo (Wang, *et al.*, 2006; Romero, *et al.*, 2007), y Kong *et al.* (1999), reportan que componentes de *B. subtilis* inducen deformación de esporas e hifas y desintegración de la pared celular de *Fusarium oxysporum*.

## 5.6 Producción de ácido indol acético (AIA)

Las 22 cepas antagonistas evaluadas para la producción de AIA, fueron determinadas por la presencia de un halo color naranja-rojizo, lo cual es indicativo de la producción de AIA. De las 22 cepas bacterianas antagonistas, 12 mostraron actividad metabólica para la producción de AIA (54.54%) (Cuadro 5). *Pseudomonas syringae* (1 cepa), *Pseudomonas putida* (3 cepas), *Pseudomonas fluorescens* (2 cepas), *Bacillus subtilis* (1 cepa), *Bacillus* sp. (1 cepa) y *Bacillus amyloliquefaciens* (4 cepas). (Fig. 11). Resaltando que del total de las cepas antagonistas, solamente las identificadas dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* mostraron actividad para la producción de AIA.



Figura 11. Producción de ácido indol acético (AIA) por cepas antagonistas a *Fusarium* spp a) producción de indol +, b) producción de indol -

El ácido indol acético (AIA) es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas. Las auxinas son hormonas vegetales que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, por lo tanto, su aplicación en la agricultura es muy frecuente. En algunos casos el AIA es sintetizado por algunos microorganismos tales como bacterias pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Patten y Glick, 1996). Algunas bacterias son capaces de metabolizar triptófano y producir diversos metabolitos, entre ellos, el ácido indol acético, el cual es un compuesto involucrado en

la capacidad promotora del crecimiento vegetal y se ha demostrado que incrementa los rendimientos en algunos granos hasta en un 36% (Díaz *et al.*, 2005, García *et al.*, 2007).

La producción de AIA, estimulante de crecimiento vegetal, en el caso de plantas superiores y microorganismos, se realiza por la vía del ácido antranílico (AA) a partir de triptófano (TRP), lo cual es regulado por el gen de la antranilato sintasa (Anderson *et al.*, 1999). La ruta de síntesis del AIA a partir de TRP se ha demostrado en diversos seres vivos tales como bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia cepacia*) (Lestes y Yanofsky, 1961), en dichos organismos, el AIA tiene un papel de auxina o de promotor del crecimiento vegetal, participa en las rutas de síntesis de fitohormonas e incluso, en algunos casos, tiene funciones fungistáticas (Aoki *et al.*, 2005). El TRP, el AIA o sus análogos, son capaces de inhibir el crecimiento de cultivos celulares tanto de organismos procarióticos, como de eucarióticos, lo que en algunos casos de organismos productores de AIA de ser antagonistas (Anderson *et al.*, 1999).

En este ensayo se identificaron las bacterias que producen AIA. La capacidad para la producción de metabolitos que juegan un papel directo en la promoción del crecimiento vegetal confiere a dichas bacterias un amplio uso potencial en la producción agrícola, tanto en la promoción del crecimiento vegetal como biofertilizante; inclusive, se ha observado capacidad para participar en el control biológico de enfermedades (Carreño *et al.*, 2000).

## 5.7 Actividad lipolítica

Los resultados en la caracterización para la actividad lipolítica, indicaron que algunos de los microorganismos bacterianos antagonistas aislados hidrolizaron el ácido graso presente en el medio (Fig. 12, a). La expresión metabólica de esta actividad en el sustrato de cultivo utilizado, se determinó por el desarrollo de una zona de hidrólisis alrededor de las colonias que se evidenció después del tiempo de incubación. Se utilizó como criterio la selección de las cepas más sobresalientes, aquellas cepas que produjeron halos  $\geq 1$ mm de diámetro en la actividad de hidrólisis (Jaeger *et al.*, 1999)



Figura 12. Actividad lipolítica de *Bacillus* y *Pseudomonas* antagonistas a *Fusarium* spp  
a) actividad lipolítica +, b) actividad lipolítica –

La formación de un halo turbio alrededor de la colonia bacteriana indicó actividad lipolítica. De las 22 cepas bacterianas de interés, el 100% mostró actividad lipolítica (Cuadro 5). La expresión de esta actividad metabólica nos ayuda a entender un posible mecanismo de acción por el cuál las cepas bacterianas analizadas son antagonistas eficientes ya que la fuente de lípidos presentes en el medio de cultivo, son

componentes importantes que se encuentran en la estructura de todas las membranas celulares, y estos son una importante fuente de fosfolípidos, la cual es necesaria para todas las células vivas. Las membranas de las células están compuestas en gran medida de lecitina y lípidos (Rivera y García, 2007), lo que nos indica que al tener actividad lipolítica, las bacterias pueden tener capacidad antagónica al atacar a algunos otros organismos ya sea degradando membranas celulares o por competencia ya que las lipasas incluso en bajas concentraciones tienen la capacidad de degradar grasas y proteínas (Coca, *et al.*, 2001)

### 5.8 Actividad proteolítica

Para la determinación de la actividad proteolítica, se tomó como criterio de selección de cepas a aquellas que presentaran más de  $\geq 1$  mm de diámetro en los halos de hidrólisis alrededor de las colonias bacterianas. La formación de un halo hialino alrededor de la colonia bacteriana, es indicativo de la actividad proteolítica (Fig. 13).

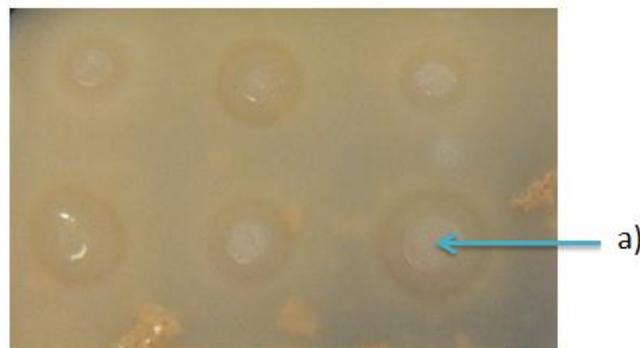


Figura 13. Actividad proteolítica de *Bacillus* y *Pseudomonas* antagonistas a *Fusarium* spp. la formación de un halo hialino alrededor de la colonia bacteriana indica actividad proteolítica. a) actividad proteolítica positiva.

De las 22 cepas bacterianas antagonicas, el 100% expresó actividad proteolítica (Cuadro 5). De acuerdo a estudios de Rodas *et al.* (2009) la actividad proteolítica confiere capacidad de antagonismo a cepas bacterianas. Bonants *et al.*, (1995) reportaron la purificación y caracterización de proteasas de algunas especies de *Bacillus*, demostraron además que estas están involucradas en el ataque a algunos hongos, degradando la pared celular, y que por tanto, tienen actividad fungicida.

### 5.9 Producción de sideróforos

La presencia de un halo amarillento alrededor de la colonia bacteriana indicó producción de sideróforos (Fig. 14 a), y Fig. 15, todos los casos). Se tomó como criterio de selección de cepas con actividad de producción de sideróforos, aquellas que presentaran más de  $\geq 1$  mm de diámetro en los halos con coloración amarillo-naranja en el medio CAS (cita) alrededor de las colonias bacterianas. El halo de todas las cepas bacterianas fue mayor a 10 mm tras 5 días de haberla incubado.



Figura 14. Producción de sideróforos (halos amarillentos) a las 24 h de incubación a) actividad de producción de sideróforos.

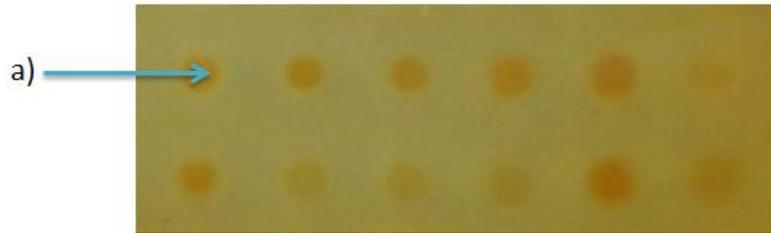


Figura 15 Producción de sideróforos a los 5 días. a) producción de sideróforos +.

De las 22 cepas antagonistas evaluadas, el 100% mostraron actividad de producción de sideróforos. Las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción prometedora en el control biológico de fitopatógenos (Johri *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 2005). Este grupo bacteriano es un importante colonizador de la rizósfera de plantas, además de presentar actividad antagónica hacia diversos fitopatógenos y ser promotoras del crecimiento (Burkhead *et al.*, 1994; Banger y Tomashow, 1996; Sutra *et al.*, 2000).

Actualmente existen diversas cepas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido registradas (y algunas de ellas patentadas) para ser usadas en los cultivos agrícolas (Powell *et al.*, 1990). Los mecanismos de acción de estas bacterias en contra de fitopatógenos son diversos. Investigaciones han mostrado que varias especies de *Pseudomonas* producen antibióticos como pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, piocianina y el ácido fenacín-1-carboxílico, además de los sideróforos y bacteriocinas (Weller *et al.*, 2002; Haas y Keel, 2003; Valencia *et al.*, 2005; Validov *et al.*, 2005). La síntesis de estos metabolitos secundarios está involucrada en el biocontrol de diversos fitopatógenos. Particularmente, a la síntesis de sideróforos por *Pseudomonas* fluorescentes se les ha atribuido un enorme interés por participar en la promoción del

crecimiento vegetal y suprimir el crecimiento de patógenos de raíz (Kloepper *et al.*, 1980; Loper y Schroth, 1986).

Se ha propuesto que tales compuestos pueden secuestrar el hierro del ambiente rizosférico, impidiendo que sea disponible para los patógenos. Así, las *Pseudomonas* que sintetizan sideróforos, tienen ventajas de ocupar nuevos espacios, desplazando la demás microbiota del suelo (Farías *et al.*, 1990, 1997; Kloepper *et al.*, 1980). Anteriormente, se ha reportado el papel inhibitorio de la cepa *Pseudomonas fluorescens* en el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* (Valencia *et al.*, 2005). Dicha cepa inhibe el crecimiento del fitopatógeno en condiciones limitantes de hierro. Una mutante de una cepa de *P. fluorescens*, carente de la síntesis de sideróforos, no logró restringir el crecimiento de los tres patógenos, mientras que el uso de un concentrado de sideróforos mostró gran actividad antifúngica restringiendo crecimiento de manera significativa en condiciones limitantes de hierro. Por el contrario, al adicionar hierro al medio, el efecto inhibitorio se perdió totalmente. Lo anterior sugiere que la actividad antifúngica por parte de los sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* regulada por hierro (Valencia *et al.*, 2005).

Se ha demostrado la capacidad de algunas especies del género *Bacillus* como agentes de control biológico, en este sentido se conoce que entre los mecanismos a través de los cuales las bacterias son antagónicas se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estas bacterias ejercer su capacidad biocontroladora (Bais, *et al.*, 2006).

## 5.10 Solubilización de fosfato mineral

De las 22 cepas antagonistas evaluadas, el 100% mostraron actividad de solubilización de fosfatos (Cuadro 5). La formación de un halo alrededor de la colonia bacteriana indica la solubilización de fosfatos.

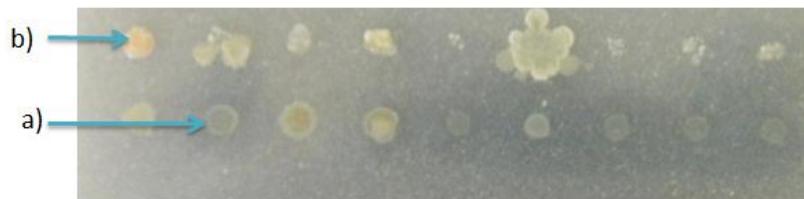


Figura 16. Formación de un halo o precipitado alrededor de la colonia bacteriana indica la solubilización de fosfatos. a) solubilización de fosfato +, b) solubilización de fosfato –

Algunos géneros bacterianos con capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfato son: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia*. Los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los agentes más frecuentemente reportados como solubilizadores de fosfato. La capacidad de los ácidos orgánicos para aumentar la disponibilidad de P, no sólo se debe a la acidificación en la rizósfera de la planta, sino también a su capacidad de formar complejos estables con el Al y Fe. Los ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH en la rizósfera, o por la quelación de estos micronutrientes. De igual manera, los ácidos orgánicos participan en el suelo en fenómenos como la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales (Paredes y Espinosa, 2010).

Se han demostrado potencialidades de algunas bacterias pertenecientes al género *Bacillus* como solubilizadores de fostatos y fijadores de nitrógeno atmosférico, así como se han realizado diversos estudios para utilizar éste género bacteriano como promotor de crecimiento vegetal (Tejera, 2012), lo que nos ayuda a comprender de una manera más acertada como es que actúan las bacterias antagónicas contra los patógenos de nuestro interés, en este caso *F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*.

Cuadro 5. Caracterización en la producción de metabolitos de 22 cepas bacterianas antagonistas vs 3 especies de *Fusarium* en maíz aisladas de esclerocios de *C. gigantea*.

Cepa	Producción de AIA	Actividad lipolítica	Actividad proteolítica	Producción de sideróforos	Solubilización de fosfato mineral
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+	+	+	+
<i>Delftia lacustris</i>	-	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	+	+	+	+
<i>Delftia acidovorans</i> sp.	-	+	+	+	+
<i>Sphingobacterium</i> sp	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas geniculata</i>	-	+	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp.	-	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	+	+	+	+

\*(+) Actividad positiva

(-) Actividad negativa

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio, se obtuvieron poblaciones bacterianas cultivables asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea*, con alto potencial antagónico contra enfermedades fungosas causadas por *Fusarium* en el cultivo del maíz.

De acuerdo a los resultados de la secuenciación del gen 16s ADN<sub>r</sub>, la identificación de las cepas antagonistas más sobresalientes para *F. graminearum* fueron *Pseudomonas geniculata* (BA7), *P. putida* (BA11) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) con un promedio de 6.3 mm de inhibición del hongo cada una, para *F. subglutinans* fueron *P. syringae* (BA2) y *Bacillus subtilis* (BA1) con 7.0 y 6.3 mm de inhibición del crecimiento del hongo cada una y para *F. verticillioides* fueron *Pseudomonas putida* (BA21) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), con 7.0 y 6.3 mm de inhibición del crecimiento del hongo respectivamente.

Las bacterias que mostraron un perfil más completo en la producción de metabolitos antimicrobianos y de antagonismo *in vitro* (BA1, BA2, BA7, BA11, BA18 y BA21) provenían del lote de Atlacomulco.

De las 22 bacterias antagónicas, la mayoría fueron cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (36.3%) y *Bacillus* (31.8%). El 9.09% pertenece a bacterias de los géneros *Delftia* y *Stenotrophomonas* y bacterias de los géneros *Sphingobacterium*, *Micromonospora* y *Staphylococcus*, representan el 4.5% del total de todas las cepas cada una. Del género *Pseudomonas* spp. la mayoría fueron *Pseudomonas putida*, y *P. fluorescens* mientras de *Bacillus* spp. fueron *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

Las bacterias con mejores características de antagonismo *in vitro* (BA1, BA2, BA7, BA11, BA18 y BA21), mostraron producción de ácido indol acético (AIA); actividad

lipolítica, actividad proteolítica, producción de sideróforos y solubilización de fosfato mineral. Las seis cepas pertenecieron a *Pseudomonas* o a *Bacillus*. Múltiples mecanismos de biocontrol han sido implicados en la supresión de enfermedades de las plantas causadas por hongos mediante *Pseudomonas* y *Bacillus* incluyendo la producción de antibióticos, toxinas, bio-surfactantes, enzimas líticas, competencia por los nichos de la raíz, nutrientes y minerales e inducción de resistencia sistémica. Esto ha llevado a sugerir que el principal éxito de un agente de biocontrol es atribuible en gran parte a la presencia de múltiples mecanismos de biocontrol (Vassilev *et al.*, 2006). En este sentido, algunas de las *Pseudomonas* y los *Bacillus* antagonistas con mayor actividad contra las especies de *Fusarium* probadas en este estudio fueron los aislados que albergan el mayor número de características antagonistas. De este modo, todas las cepas antagonistas mostraron al menos cuatro mecanismos (principalmente la actividad lipolítica y proteolítica, solubilización de fosfatos y producción sideróforos), y un alto porcentaje de las bacterias aisladas mostraron también producción de AIA. En este estudio, es difícil determinar qué mecanismos pueden estar involucrados principalmente en la inhibición del crecimiento *in vitro* de los hongos, ya que muchos de los aislados mostraron caracteres antagonistas diferentes. Por otra parte, podría haber otros caracteres antagonistas que pueden estar potencialmente involucrados y que no fueron detectados en este estudio, o que algunos metabolitos evaluados no pudieron ser inducidos bajo nuestras condiciones de experimentación *in vitro*. Esta investigación representa el primer estudio sobre las poblaciones bacterianas cultivables nativas asociadas a esclerocios de *C. gigantea* con potencial antagonista contra patógenos fungosos del maíz.

## VII. CONCLUSIONES

- 1.- Los esclerocios de *C. gigantea*, albergan bacterias cultivables nativas con alto potencial antagonista *in vitro* contra las especies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) patógenas al cultivo del maíz.
- 2.- La mayor cantidad de cepas con alto grado de inhibición *in vitro* contra las tres especies de *Fusarium* tienen origen en el lote de muestreo de Atlacomulco, indicando que existe una mayor abundancia de antagonistas bajo las condiciones climáticas y de cultivo del maíz de este lote.
- 3.- La secuenciación de la región 16s ADNr de las 22 cepas con el mayor grado de antagonismo *in vitro* identifican a *Pseudomonas* (36.3%) y *Bacillus* (31.8%). como los más abundantes entre las 22 cepas evaluadas con el mayor grado de inhibición *in vitro* contra las 3 especies de *Fusarium* patógenas.
- 4.- *Pseudomonas* y *Bacillus* (*Bacillus* sp., *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* sp., *P. syringae*, *P. geniculata*, *P. putida*, *P. fluorescens*) expresan el 100% en la producción de compuestos antimicrobianos caracterizados y evaluados que potencialmente están involucrados en su capacidad como antagonista (Producción de AIA, de sideróforos, actividad proteolítica y lipolítica y solubilización de fosfatos).
- 5.- *Bacillus amyloliquefaciens* es la especie de *Bacillus* con mayor abundancia entre las 22 cepas antagonistas expresando 100% actividad metabólica inhibiendo una dos tres especies de *Fusarium*.

6.- De las 22 cepas con el mayor grado de antagonismo *in vitro* el 13.63% inhibieron a las 3 especies de *Fusarium*, el 59.09% inhibieron a 2 especies y el 27.27% inhibió a sólo una especie de los patógenos evaluados.

7.- *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. subtilis* son las especies de mayor abundancia con el máximo grado de inhibición y producción de metabolitos involucrados en el antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp patógenos a maíz. Las especies de *Pseudomonas* fueron *Pseudomonas* sp., *P. putida*, *P. syringae* y *P. fluorescens*.

8.- En los esclerocios de *C. gigantea* existe una fuente inexplorada de poblaciones bacterianas cultivables con alto potencial para su uso como agentes de control biológico en el cultivo de maíz

## VIII. LITERATURA CITADA

Abou, E. A., Abou, A. H. E, Mady, M. A and Moussa, S. A. M. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plant using phosphate dissolving microorganisms (Biophos-phor®) combined with boron foliar spray. Research J. of Agric. and Biol. Sciences. 3:274-286.

Ahn, J.H., M. C. Kim, H. C. Shin, M. K. Choi, S. S. Yon, T. Kim, H. G. Song, G. H. Lee, and J. O. Ka. 2006. Improvement of PCR amplification bias for community structure analysis of soil bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Microbiol. and Biotech. 16: 1561-1569.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

- Anderson, P. C., P. S Chomet, M. C. Griffor, and A. L. Kris. 1999. Anthranilate synthase gene and method of use thereof for conferring tryptophan overproduction. Patent USA No. 6271016
- Aoki, Y; Y. Yoshida, M. Yoshida, H. Kawaide, H. Abe, and M. Natsume. 2005. Anthranilic acid, a spore germination inhibitor of phytopathogenic *Streptomyces* sp. B-9-1. Causing root tumor of melon. *Actinomycetologica* 19: 48-54.
- Aranda O., S. 2010. Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) en Andalucía. Tesis doctoral. Univ. de Córdoba, España. 350 p.
- Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in the rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Rev. Plant. Biol.* 57: 233-266.
- Baker, G. C., J. J. Smith, and D. A. Cowan. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Meth.* 55: 541–555.
- Bangera, M. G. and L. S. Tomashow. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloglucinol by the biological control agent of *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 9: 83-90.
- Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, R. A. Sikora, A. Ulrich, and J. Hallman. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 215-229.

- Bonants, P. J., P. F. Fitters, H. Thijs, E. den Belder, C. Waalwijk, and J. W. Henfling. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiol.* 141:775–784.
- Buée, M., W. de Boer, F. Martin, L. van Overbeek, and E. Jurkevitch. 2009. The rhizosphere: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321: 189-212.
- Burkhead, K. D., D. A. Schisler, and P. J. Slininger. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2031-2039.
- Carreño, L. R., R. N. Campos, C. Elmerich, and B. E. Baca. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 64: 521-530.
- Carreras B., O. Fernández-Larrea, D. Rodríguez, F. Piedra, M. Escobar, y O. López. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* berliner con potencialidades para el control de plagas. *Fitosanidad* 12:187.
- Carvajal M., y C. De León. 2010. El cultivo del maíz., Temas selectos. Toxinas importantes de los hongos *Aspergillus* (aflatoxinas), *Fusarium* (fumonisina) *Diplodia* (diplodiatoxina) y diplodiol en maíz. Ed. Mundi-Prensa pp 36-47
- Cazorla, F. and D. Romero. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1950-1959.

- Charmley, L., L., A. Rosenberg, and L. H. Trenholm. 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, food, and feedstuffs, p471–486. In D. Miller and H. L. Trenholm [eds.], *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. Ed. Eagan PR, MN.
- Chatterjee, S. N., T. Bhattacharya, T. K. Dangar, and G. Chandra. 2007. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African J. Biotech.* 6: 1587-1591.
- Chernin, L., Z. Ismailov, S. Haran, and I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- CIMMYT. 2004. *Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, El Batán, 4<sup>a</sup> Edición. 118 p.
- Clark, F. E., and R. B. Mitchell. 1942: Antibiosis in the elimination of *Phymatotrichum omnivorum* sclerotia from soil. *J. Bact.* 44: 1-141
- Coca, J., O. Hernández, R. Berrio, S. Martínez, E. Díaz, y J. C. Dustet, J. C. 2001. Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotec. Aplicada* 18: 216-220.
- Cochran, W. G. *Técnicas de muestreo*. México: Compañía Editorial Continental, 1982. 513 p.

- Cocotelo, N., Sumner, J. L. and Voegelín, W, S. 1971. Chemical studies on the exudate and developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Canadian J. Microbiol. 17: 1189-1194.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 31: 53-80.
- Corrales, L. C., L. C. Sánchez, J. Cuervo, D. Bautista, L. González, y M. Guevara. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. NOVA: Publicación científica en ciencias biomédicas 8: 63-75.
- De León C. 1974. Enfermedades del maíz. Guía para su identificación en el campo. Folleto Técnico de Información 11. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México, D.F. 77 p.
- De Oliveira, V. L., M. M. Bellei, A. C. Borges. 1984. Control of white rot of garlic by antagonists fungi under controlled environmental conditions. Can. J. Microbiol. 30: 884-889.
- Díaz F., A., M. Alvarado C., M. A. Cantú A., y I. Garza C. 2005. Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. Agric. Tec. Méx. 31: 153-163.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2010. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>. Consultado el 16 de Diciembre de 2013.
- Farías, R. R., E. Soriano y C. Cervantes. 1990. Los sideróforos microbianos y su influencia en el desarrollo vegetal. Rev. Latinoam. Microbiol. 56: 662-676.

- Farías, R. R., E. Zamora y J. J. Peña-Cabriales. 1997. *Pseudomonas* fluorescentes como agentes de control de bacterias patógenas de plantas: II. Inoculación en planta. *Terra* 15: 391-396.
- Francis, I., M. Holsters, and D. Vereeck. 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environ. Microbiol.* 12: 1-12.
- Fucikovsky, L. 1970. Ciclo de vida de *Claviceps gigantea* causante del “diente de caballo” en maíz. IX Reunión Anual Soc. Amer. Fit. Div. Caribe. Panamá, Panamá.
- Fuentes, S., I. I. De Bauer, A. J. Ullstrup, and A. Rodriguez. 1964. *Claviceps gigantea* a new pathogen in maize in Mexico. *Phytopathol.* 54: 379-381.
- Galinat, W. C. 1988. The origin of corn. *In*: G.F. Sprague & J.W. Dudley, (eds). Corn and corn improvement. American Soc. of Agron. Madison, WI, USA. pp: 1-31.
- García-Olivares J. G., V. R. Moreno-Medina, I. C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera, y N. Mayek-Perez. 2007. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 305-310.
- Germida, J. J., S. D. Siciliano, J. R. de Freitas, and A. M. Seib. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 46-50.
- Gilbert, R. G. and R. G. Linderman. 1970. Increased activity soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Can. J. Microbiol.* 17: 557-565.
- Guazmán E., E. A. 2011. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo. Tesis de licenciatura. Escuela de ingeniería agronómica. Riobamba, Ecuador. 73p.

- Haas, D., and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117-153.
- Hackl, E., S. Zechmeister-Boltenstern, L. Bodrossy, and A. Sessitsch. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5057–5065.
- Haichar, F. Z., C. Marol, O. Berge, J. I. Rangel-Castro, J. I Prosser, J. Balesden, T. Heulin, and W. Achouak. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2: 1221-1230.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canad. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hameeda, B., G. Harini, O. P. Rupela, J. V. D. K. Kumar R., and G. Reddy. 2011. Biological control of chickpea collar rot by co-inoculation of antagonistic bacteria and compatible rhizobia. *Indian J. Microbiol.* 50: 419-424.
- Hartmann, A., P. Lemanceau, and J. I. Prosser. 2008. Multitrophic interactions in the rhizosphere. *Rhizosphere at the interface of many disciplines and expertise. FEMS Microbiol. Ecol.* 65: 179.
- Hernández, A. M., Y. Acebo, N. Rives, M. Alamguer, S. Ricardo, A. Hernández, y M. Heydrich. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PgPb) para el control biológico de *Pyricularia grisea* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*). *Fitosanidad* 14: 50-51.

- Hou, X., Boyetchko, S. M., Brkic, M., Olson, D., Ross, A. and Hegedus, D. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of *Bacillus* spp. Associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 72: 664-653.
- Iltis, H. H. 1983. From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222: 886-894.
- Jaeger, K. E. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures, and biotechnology applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351
- Jae-Hyung, A., K. Min-Cheol, S. Hye-Chul, C. Ming-Kyeong, Y. Sang-Seek, K. Taesung, S. Hong-Gyu, G. Hyoung L., K. Jong-Ok. 2006. Improvement of PCR amplification bias for community structure analysis of soil bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Biotechn.* 16: 1561-1569.
- James C., R., L. S. Thomashow, D. M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Bangera, and K. Dal-Soo. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 197-201.
- Johri, B. N., C. Rao, and R. Goel. 1997. Fluorescent *Pseudomonas* in plant disease management. *In: K. R. Dadarwal (ed). Biotechnological approaches in soil microorganism for sustainable crop production.* Scientific Publishers. Jodhpur, India. pp. 193-221.
- Jung, S., S. Park, D. Kim, y S. B. Kim. 2008. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial community profiles in the rhizosphere of *cry1AC*-carrying *Brassica rapa* subsp. *pekinensis*. *J. Microbiol.* 46: 12-15.

- Kamilova, F., G. Lamers, and B. Lugtenberg. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudates as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* 10: 2455-2461.
- Kent, A. D., and E. W. Triplett. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 211-236.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu, and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathol.* 94: 1259-1266.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plantgrowth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886
- Knaak, N., A. A. Rohr, and L. M. Fiuza. 2007. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Braz. J. Microbiol.* 38: 526-530.
- Koehler, B. 1959. Corn ear rots in Illinois. Urbana III. University of Illinois, Agricultural Experiment Station. Illinois. 87 p.
- Kong, J., Whang, W. X., Zhao, B. G. and Shen, X. C. 1999. Studies on *Bacillus subtilis* B-903 strain I. Inhibitory action and control effect on plant pathogenic fungi. *Chinese J. Biol. Contrology.* 15:61-157.
- Konopka, A. 2006. Microbial ecology: searching for principles. *Microbe* 1: 175–179.
- Landa, B. B., O. V. Mavrodi, K. L. Schroeder, R. Allende-Molar, y D. M. Weller. 2006. Enrichment and genotypic diversity of *phlD*-containing fluorescent *Pseudomonas*

- spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 351-368.
- Lee, J. P., S. W. Lee, C. S. Kim, J. H. Song, K. U. Lee, H. J. Kim, S. J. Jung, and B. J. Moon. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol. Control* 37: 329-337.
- Leelasuphakul W., P. Hemmanee, and S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 113-121.
- Leggett, M. E. and Rahe, J. E. 1985. Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. *Ann. Appl. Biol.* 106: 225-263.
- Lester, G., and C. Yanofsky. 1961. Influence of 3-methylantranilic and anthranilic acid in the formation of tryptophan synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 81: 81-90.
- Loper, J. E. and M. N. Schroth. 1986. Importance of siderophores in microbial interactions in the rizosphere. pp. 77-84. *In*: T. R.
- López, A. A. 2003. Cuatro mitos mesoamericanos del maíz. En: Esteva. G., y C. Marielle (eds). Sin maíz no hay país. CONACULTA. México, D. F. p: 29-35
- Marilley, L., and M. Aragno. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Appl. Soil Ecol.* 13: 127-136.

- Martin, P. A., and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus Thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Meadows, M. P., D. J. Ellis, J. Butt, P. Jarret, and H. D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1344-1350.
- Medina C., D. 1970. Pudriciones fungosas en mazorcas de maíz (*Zea mays* L.). Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 23 p.
- Mendes, R., A. Aline, A. A. Pizzirani-Kleiner, W. I. Araújo, and J. M. Raiijmakers. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7259-7267.
- Moreno, 1968. Efecto de los esclerocios de *Claviceps gigantea* en conejos. Informe anual de labores y resultados de la sección de Fitopatología. Campo Exp. "Santa Elena", San Mateo Atenco, México.
- Neiderhauser, J. S. 1949. Enfermedades del maíz en México. Folleto de divulgación 9. Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D.F. 39 p.
- Orietta, F. y V. Larrea. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 96-100.
- Osada, S. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción hospedante-parasito (*Zea mayz* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes *et al*). Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Pal K. K., and B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. *In:* APSnet. [www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf](http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf) consulta: junio 2013.
- Paredes-Mendoza M., y D. Espinosa-Victoria. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70.
- Park, M. S., S. R. Jung, M. S. Lee, K. O. Kim, J. O. Do, K. H. Lee, S. B. Kim, and K. S. Bae. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *J. Microbiol.* 43: 219-227.
- Patten, C. L., and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Paulsen, I. T., C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinhour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. III. Pierson, L. S. Thomashow, and J. E. Loper. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23: 873-878.

- Porazinska, D. L., W. Sung, R. M. Giblin-Davis, and W. K. Thomas. 2010. Reproducibility of read numbers in high-throughput sequencing analysis of nematode community composition and structure. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 666-676.
- Powell, K. A., J. L. Faull, and A. Renwick. 1990. The commercial and regulatory challenge. pp. 445-463. *In: D. Horny (ed.). Biological Control of Soilborne Plant Pathogens.* CAB International. Wallingford, UK.
- Prosser, J. I., B. J. M. Bohannan, T. P. Curtis, R. J. Ellis, M. K. Firestone, R. P. Freckleton, J. L. Green, L. E. Green, K. Killham, J. J. Lennon, A. M. Osborn, M. Solan, C. J. van der Gast, and J. P. W. Young. 2007. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Rev. Microbiol.* 5: 384-392. doi: 10.1038/nrmicro1643
- Quezada, A. 2010. Selección de germoplasma de maíz resistente al carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), en los valles altos de México. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Rai, J. N., and V. C. Saxena. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of "white rot" disease. *Plant Soil* 43: 509-513.
- Reinoso-Pozo Y., D. Vaillant-Flores, L. Casadesús-Romero, E. García-Pérez, y V. Pazos. 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 11: 35-40.
- Rivera-Pérez C., y F. García-Carreño. 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *BioTecnología* 11: 37- 45.
- Robutti, J. L. 2007. Calidad y usos de maíz. *idiaXXI* 5: 100-105.

- Rodas J., B. A., A. Quero B., H. F. Magaña S., y A. Reyes R. 2009. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. Rev. Colomb. Biotecnol. 11: 107-113.
- Romero, D., A. de Vicente, R. H. Rakotoaly, S. E. Dufour, J. W. Veening, E. Arrebola, F. M. Cazorla, O. P. Kuipers, M. Paquot, and A. Pérez-García. 2007. The Iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Mol. Plant. Microbe Interact. 20: 430-440.
- Salazar, A. H. C., y G. M. M. Godínez. 2010. El maíz y sus usos estratégicos. In: C. De León y R. Rodríguez (eds). El cultivo del maíz, Temas Selectos. Vol. II. Edit. Mundi-Prensa. pp: 36-47.
- Salvaudon L., T. Giraud, and J. A. Shikoff. 2008. Genetic diversity in natural populations a fundamental component of plant-microbe interactions. Current Opinion in Plant Biology 11: 135-143.
- Sawar, M., and R. J. Kremer.** 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Lett. Appl. Microbiol. 20: 282-285.
- Schwyn, B., and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Annal. Biochem. 160: 47-56.
- Shiva, R. C. M. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 184 p.

- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. Fuente: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Consultado el 20 de diciembre de 2013.
- Silva A., H. S., R. Romeiro da S., D. Macagnan, B. de A. Halfeld-Vieira, M. C. Pereira B., y A. Mounteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Control* 29: 288-295.
- Snook, M. E., T. Mitchell, D. M. Hinton, and C. W. Bacon. 2009. Isolation and characterization of leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus Mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 57: 4287-4292.
- Sogin, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. Mark-Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, and G. J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 12115-12120.
- Soldano, A, V. Vera-Garate, M. C. Vaccari, G. Latorre-Rapela, M. C. Lurá, y A. M González. 2010. Inhibición del crecimiento de *Cercospora kikuchi* por especies de *Bacillus* y efecto sobre la acumulación de cercosporina. *FABICIB* 14: 97-106.
- Sorensen, J., and A. Sessitch. 2007. Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. *In: van Elsas, J.D., J. K. Janson, and J. D. Trevors (eds). Modern Soil Microbiol.* 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Ratón, FL. USA. pp: 211-236.
- Sosa, A., B. Carreras, O. Fernández-Larrea, y D. Torres. 2006. Aislados de *Bacillus* spp. promisorios para el control de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad* 10: 55.

- Stefanova, M., Y. Franco, M. F. Coronado, y P. M. Villa. 2007. Efecto antagónico *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosascepa* PSS contra islamientos de *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi*. Fitosanidad 11: 47-49.
- Strobel, G. A, y M. J. Rodríguez. 2005. Pseudomicinas utilizadas contra las enfermedades de las plantas. Patente 2243539. The research and development Institute, INC.
- Sutra, L., J. M. Risede, and L. Gardan. 2000. Isolation of fluorescent pseudomonads from rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. Lett. Appl. Microbiol. 31: 289- 293.
- Tejeda G., J. Rodríguez, R. García, V. R. Martínez, B. Dibut, J. J Castellanos, L. Gutiérrez, L. Plana, Y. Rios, M. E. Simanca, M. Ortega, C. Lamela, A. Martínez, L. Izquierdo, G. Croche, Y L. Fey. 2006. Efectividad del Biobac, obtenido a partir de *Bacillus subtilis* (cepa INI fAt -101) como biocontrolador de enfermedades y estimulador del crecimiento vegetal. Fitosanidad 10: 141-142.
- Tejera, B., M. Heydrich, y M. M. Rojas. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Protección Veg. 27: 117-122.
- Torsvik, V., and L. Ovreas. 2007. Microbial phylogeny and diversity in soil. *In*: J. D. van Elsas, J. K. Janson, and J. D. Trevors (eds). Modern Soil Microbiology –2nd edition, CRC Press, Boca Ratón, FL. USA, pp: 23-54.
- Tringle, S. G., and P. Hugenholtz. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr. Opin. Microbiol. 11: 442-446.

- Valencia-Cantero E., J. Villegas-Moreno, J. M. Sánchez-Yáñez, J. J. Peña-Cabriales, y R. Farías-Rodríguez. 2005. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23: 81-88.
- Validov, S., O Mavrodi, L. De La Fuente, A. Boronin, D. Weller, L. Thomashow, and D. Mavrodi. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 242: 249-256.
- Vassilev, N., M. Vassileva, and I. Nikolaeva. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 137-144.
- Wang, C. T., B. P. Ji, B. Li, R. Nout, P. L. Li, H. Ji, and L. F. Chen. 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 750-758.
- Weatherwax, P. 1955. History and origin of corn. I. Early history of corn and theories as to its origin. *In: Sprague, G. F. (ed). Corn and corn improvement*, New York, NY, USA, Academic Press. pp: 1-16.
- Weller, D. M., B. B. Landa, O. V. Mavrodi, K. L. Schroeder, L. De La Fuente, S. Blouin B., R. Allende M., R. F. Bonsall, D. V. Mavrodi, and L. S. Thomashow. 2007. Role of 2, 4-Diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. *Plant. Biology* 9: 4-20.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. Gardener, and L. S. Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309-48.

- Wilkes, H. G. 1989. Maize: domestication, racial evolution and spread. *In*: D. R. Harris, and G. C. Hillman (eds). Forage and farming. London, Unwin Hyman. pp: 440-454.
- Woese, C. R. 1994. There must be a prokaryote somewhere – microbiologist search for itself. *Microbiol. Rev.* 58: 1-9.
- Young, I. M., J. W. Crawford, N. Nunan, W. Otten, and A. Spiers. 2008. Microbial distribution in soils: physics and scaling. *Adv. Agron.* 100: 81–121.
- Zenteno–Zevada M. 1963. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. III. Pruebas de inoculación en plántulas de maíz con *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. *An. Inst. Biol. UNAM.* 34: 69–83.