



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

POTENCIAL DE TRES CEPAS DE RIZOBACTERIAS COMO ANTAGONISTAS DE *Rhizoctonia solani* EN CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.)

DEISY YUBELI PINEDA MENDOZA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

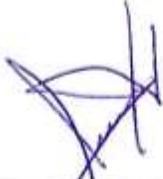
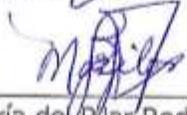
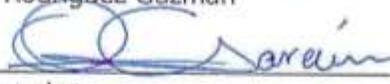
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: POTENCIAL DE TRES CEPAS DE RIZOBACTERIAS COMO ANTAGONISTAS DE *Rhizoctonia solani* EN CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.) realizada por la alumna: Deisy Yubeli Pineda Mendoza 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
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____ Dr. Juan José Almaraz Suarez
ASESORA	 _____ Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán
ASESOR	 _____ Dr. Oscar García Barradas
ASESORA	 _____ Dra. Rosalba Argumedo Dellra

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo 2015.

**“Tú sólo tendrás que descubrir qué será de ti.
Tendrás que crecer, tendrás que buscar, tendrás que
arriesgarte. La vida es una aventura peligrosa, que
comienza donde termina nuestra rutina, es un apostar. No
hay otra forma de saber lo que va a suceder.
Pero recuerda, el mundo sólo se llena de obstáculos y
excusas para aquel que no sabe a dónde va.**

Amagi.

AGRADECIMIENTOS

A Conacyt por la beca otorgada para el desarrollo de esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad y apoyo brindado durante el proceso de mi formación académica.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por el apoyo académico y sobre todo por la paciencia que mostro durante el proceso de investigación. Muchas gracias por los consejos y las charlas de motivación para continuar en este camino del universo de la ciencia. Y simplemente por confiar en mí.

A la Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán, por la disponibilidad, el apoyo académico brindado a este trabajo y con mi persona.

Al Dr. Oscar García Barradas, por él apoyó científico durante el desarrollo de esta investigación. "Gracias".

A la Dra. Rosalba Argumedo Delira, por su disponibilidad, por su sencillez y apoyo para este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Edmundo Martínez Galán, Manuel Solano Díaz, Lorenzo Viana Monsalvo, Grabiél Vazquez Gonzáles y Antonio Velasco Gonzáles por su asesoramiento.

A Ma. Del Rosario Galicia López por ser siempre tan gentil, sencilla y por las sonrisas de alegría.

A dos grandes mujeres de la ciencia Vivian Quiroz y Claudia de la Rosa Mera por las enseñanzas, consejos y la amistad brindada.

Y a cada uno de las personas que me brindaron su amistad y confianza, Salvador Ríos Perez, Itzel Dinoran Hernández Galindez, Brigsania Almazán Galindez, Azareel Angulo Castro y Faustino.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico principalmente a cada una de las personas que creyeron en mí y participaron tanto directamente como indirectamente en mi formación académica y crecimiento profesional, quiero agradecer a dios por darme la oportunidad de crecer, madurar, sufrir, sonreír y disfrutar de esta etapa tan bonita como estudiante de la vida.

A mis padres por ser dos personas humildes pero maravillosas, que siempre me han ayudado a cumplir cada uno de mis sueños, siempre pacientes y con mucho cariño.

A mis hermanos Orlando, Orfedalia, Otoniel e Ibeth, por su amor y paciencia.

A mis segundas hermanas Nancy y Claudia por su confianza y cariño.

A mis amigas Itzel, Vivian, Jasel, Perla y Brigsania, los mejores años demi vida, porque siempre me han hecho sonreír, y cada uno de los buenos momentos que me hicieron sentir. Gracias por su amistad.

**POTENCIAL DE TRES CEPAS DE RIZOBACTERIAS COMO ANTAGONISTAS DE
Rhizoctonia solani EN CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.)**

**Pineda Mendoza Deisy Yubeli
Colegio de Postgraduados, 2015**

RESUMEN

Actualmente se están buscando nuevas alternativas sustentables que permitan disminuir el uso de sustancias químicas para controlar enfermedades en cultivos agrícolas. Entre éstas, los biopesticidas de origen microbiano tienen gran potencial para controlar fitopatógenos. En la presente investigación se evaluó la capacidad de tres cepas de rizobacterias (*Pseudomonas tolaasii*A46, *P. tolaasii* P61 y *Ewingella americana*108) para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Se encontró bajo condiciones *in vitro* que dos cepas (P61 y 108) inhibieron en 49% el crecimiento radial de *R. solani*, mientras que la tercera sólo inhibió al hongo en 37%. Los filtrados obtenidos de cada una de estas cepas mostraron actividad antifúngica; siendo más marcada en el filtrado de la cepa 108. El co-cultivo bacteria-hongo en medio líquido no incrementó la actividad antifúngica de los filtrados bacterianos. Las tres cepas no mostraron actividad quitinolítica; pero las cepas A46 y P61 resultaron positivas para la producción de sideróforos. Se seleccionó la cepa 108 para evaluar su actividad en cuatro medios (Luria Bertani, King B, medio nutritivo y papa dextrosa); el mejor medio fue papa dextrosa, donde la bacteria y el filtrado obtenido presentaron la más alta actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani*. Así mismo, bajo condiciones de invernadero, la aplicación del filtrado en plantas de chile inoculadas con *R. solani*, disminuyó el número de plantas muertas con respecto al control.

Palabras Clave: antagonismo, biofungicidas, *Pseudomonas tolaasii*, *Ewingella*, hongos fitopatógenos.

**POTENTIAL OF THREE RHIZOBACTERIA STRAINS AS ANTAGONISTS OF
Rhizoctonia solani IN SERRANO CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.)**

**Mendoza Pineda Deisy Yubeli
Colegio de Postrados, 2015**

ABSTRACT

Currently, new sustainable alternatives to reduce the use of chemicals for controlling diseases in agricultural crops are being searched. Among these, microbial biopesticides have great potential to control plant pathogens. In this research capacity of three rhizobacteria strains (*Pseudomonas tolaasii* A46, *P. tolaasii* P61 and *Ewingella americana* 108) to inhibit growth of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* was evaluated. It was found that two strains (P61, 108) inhibited the radial growth of *R. solani* by 49% under *in vitro* conditions, while the third bacterial strain inhibited the fungus only by 37%. The filtrates obtained from each of these strains showed antifungal activity; it was more marked in the filtrate of strain 108. The co-culture bacteria-fungus in liquid medium did not increase the antifungal activity of the bacterial filtrate. The three strains did not show chitinolytic activity but the A46 and P61 strains were positive for the production of siderophores. The 108 bacterial strain was selected to evaluate its antifungal activity in four media (Luria Bertani, King B, nutrient medium and potato dextrose); the best medium where the bacterial strain and its filtrate had the highest antifungal activity against *Rhizoctonia solani* was potato dextrose. Under greenhouse conditions, the application of the bacterial filtrate in pepper plants inoculated with *R. solani*, decreased the number of dead plants compared to control.

Keywords: antagonism, biofungicides, *Pseudomonas tolaasii*, *Ewingella*, phytopathogenic fungi.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 LITERATURA CITADA.....	3
CAPÍTULO II.....	4
2.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2.2 HIPÓTESIS PARTICULARES.....	4
CAPÍTULO III.....	5
3 REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 PROBLEMAS FITOSANITARIOS Y LOS BIOPESTICIDAS COMO UNA ALTERNATIVA PARA RESOLVERLOS.....	5
3.2 CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE LAS RAÍCES DE PLANTAS.....	6
3.3 PERSPECTIVAS DE LOS MICROORGANISMOS COMO FUENTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	7
3.4 ANTIBIOSIS.....	8
3.5 PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS.....	9
3.6 SÍNTESIS DE ENZIMAS.....	9
3.7 MOLÉCULAS DEL QUORUM SENSING.....	9
3.8 PRODUCCIÓN DE CIANURO DE HIDRÓGENO Y OTROS VOLÁTILES.....	10
3.9 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS BACTERIANOS.....	10
3.10 LITERATURA CITADA.....	12
CAPÍTULO IV.....	18
ACTIVIDAD ALELOQUÍMICA DE LOS FILTRADOS DE <i>Pseudomonas tolaasii</i> Y <i>Ewingella americana</i> CONTRA <i>Rhizoctonia solani</i>	18
4.1 RESUMEN.....	18
ABSTRACT.....	19
4.2 INTRODUCCIÓN.....	20
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.3.1 MATERIAL MICROBIANO.....	21
4.3.2 ACTIVIDAD ANTAGONISTA.....	22
4.3.3 DETECCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	22
4.3.4 ENSAYO DE FILTRADOS BACTERIANOS.....	22
4.3.5 PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS MEDIANTE EL CO- CULTIVO.....	23
4.3.6 DETECCIÓN DE ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA EN PLACA.....	23

4.3.7 DETECCIÓN DE PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN PLACA.....	23
4.3.8 FILTRADOS BACTERIANOS USANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	24
4.3.9 ANTAGONISMO EN CULTIVO DUAL MEDIANTE LA DIVISIÓN BI-PARTITA CON DIFERENTES MEDIOS.....	24
4.3.10 ACTIVIDAD DE BIOCONTROL EN PLANTA.....	24
4.3.11 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	25
4.4 RESULTADOS.....	26
4.4.1 ACTIVIDAD ANTAGONISTA.....	26
4.4.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	26
4.4.3 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS FILTRADOS DE RIZOBACTERIA.....	27
4.4.4 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS FILTRADOS DE RIZOBACTERIAS EN EL CO-CULTIVO.....	28
4.4.5 DETECCIÓN DE ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA EN PLACA.....	30
4.4.6 DETECCIÓN DE PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN PLACA.....	30
4.4.7 FILTRADOS BACTERIANOS UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	30
4.4.8 ANTAGONISMO EN CULTIVO DUAL MEDIANTE LA DIVISIÓN BI-PARTITA CON DIFERENTES MEDIOS.....	31
4.4.9 ACTIVIDAD DE BIOCONTROL EN PLANTA.....	33
4.5 DISCUSIÓN.....	34
4.6 CONCLUSIONES.....	39
4.7 LITERATURA CITADA.....	40
ANEXO I.....	45
EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS FILTRADOS DE <i>Ewingella americana</i>	45
INTRODUCCIÓN.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS PRELIMINARES.....	47
LITERATURA CITADA.....	49

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. PROCEDENCIA DE LOS ANTAGONISTAS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN.....	22
CUADRO 2. EFECTO DE TRES CEPAS DE RIZOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO RADIAL DE <i>Rhizoctonia solani</i> EN CULTIVO DUAL USANDO APD.....	26
CUADRO 3. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>R. solani</i> POR FILTRADOS BACTERIANOS OBTENIDOS DE CEPAS CULTIVADAS INDIVIDUALMENTE O EN CO-CULTIVO CON EL HONGO FITOPATÓGENO.....	29
CUADRO 4. ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS EN TRES CEPAS DE RIZOBACTERIAS EN CULTIVO SÓLIDO.....	30
CUADRO 5. EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE DOS RIZOBACTERIAS.....	31
CUADRO 6. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA RIZOBACTERIA <i>Ewingella americana</i> EN EL CRECIMIENTO RADIAL DE <i>Rhizoctonia solani</i> . LA RIZOBACTERIA SE SEMBRÓ EN UNA MITAD DE LA CAJA QUE CONTENÍA APD, MEDIO DE KING B, AGAR NUTRITIVO Y LB. LA OTRA MITAD DE LA CAJA CONTENÍA APD DONDE SE SEMBRÓ EL HONGO.....	32
CUADRO 7. COMPARACIÓN DE EL ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD (ABCPE) Y DE LAS MEDIAS DEL NÚMERO DE PLANTAS MUERTAS, EN TRES TRATAMIENTOS CONTRA <i>Rhizoctonia solani</i> EN PLÁNTULAS DE CHILE SERRANO (<i>Capsicum annum</i> L.).....	34

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** ENSAYO EN CAJAS DIVIDIDAS PARA DETECTAR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEBIDA A COMPUESTOS BACTERIANOS VOLÁTILES. LADO DERECHO DE LA CAJA LA CEPA BACTERIANA Y LADO IZQUIERDO *Rhizoctonia solani*. A) CONTROL, B) P61, C) A46, D) 108..... 27
- FIGURA 2.** INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE R. SOLANI POR FILTRADOS DE LAS RIZOBACTERIAS *Pseudomonas tolaasii* P61, *P. tolaasii* A46 Y *Ewingella americana* 108 EN MEDIO APD. MITAD SUPERIOR DE LA FOTO, LOS POZOS EN EL MEDIO SE LLENARON CON 200 µL Y MITAD INFERIOR, LOS POZOS SE LLENARON CON 300 µL; T = TESTIGO. LAS FLECHAS SEÑALAN LOS HALOS DE INHIBICIÓN. LAS FLECHAS SEÑALAN LOS HALOS DE INHIBICIÓN. 28
- FIGURA 3.** ENSAYO DE FILTRADOS OBTENIDOS DEL CO-CULTIVO RIZOBACTERIA- *R. solani*; A= 200 µL Y B= 300 µL DE FILTRADOS POR POZO. LA FORMACIÓN DE LA ZONA DE INHIBICIÓN INDICA LA PRESENCIA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA. LAS FLECHAS SEÑALAN LOS HALOS DE INHIBICIÓN..... 29
- FIGURA 4.** EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CEPA *Ewingella americana* 108 CONTRA *Rhizoctonia solani*. LA RIZOBACTERIA SE SEMBRÓ EN UNA MITAD DE LA CAJA QUE CONTENÍA (A) APD, (B) MEDIO DE KING B, (C) AGAR NUTRITIVO Y (D) LB. EN LA OTRA MITAD DE LA CAJA QUE CONTENÍA APD SE SEMBRÓ EL HONGO..... 32
- FIGURA 5.** EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL FILTRADO DE LA CEPA *Ewingella americana* (108) EN EL DAÑO CAUSADO EN PLÁNTULAS DE CHILE SERRANO INOCULADAS CON *Rhizoctonia solani*..... 33
- FIGURA 6.** ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *Rhizoctonia solani* EN PLANTAS DE CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.) EN TRES TRATAMIENTOS, BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO..... 34

CAPÍTULO I

1.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas de producción agrícola convencionales están basados en el uso de una amplia gama de productos químicos para reducir la incidencia de plagas y enfermedades. Entre estos productos, los fungicidas son importantes en el control de enfermedades de tipo radical en diversos cultivos de importancia económica. Sin embargo, los pesticidas químicos tienen costos económicos y ambientales elevados; éstos impactan negativamente a organismos benéficos y a otros organismos de la microbiota del suelo. Además, éstos generan resistencia en especies fitopatógenas, que cada vez son más agresivas (Bertrand *et al.*, 2014; Czaja *et al.*, 2015; Meenu *et al.*, 2014).

El uso de rizobacterias como recurso para incrementar el crecimiento y sanidad vegetal es una alternativa que puede mejorar los sistemas de producción agrícola de forma sustentable. Se ha observado que los microorganismos de la rizósfera producen diversos compuestos que influyen de forma positiva o negativa en las plantas. Entre estos compuestos liberados por los microorganismos se encuentran: hormonas, enzimas, proteínas, carbohidratos, vitaminas, ácidos orgánicos, antibióticos, toxinas y elicitores (Cho *et al.*, 2003; Saraf *et al.*, 2014). Es por ello, que el estudio de metabolitos microbianos con potencial como biopesticidas, estimuladores de crecimiento, biofertilizantes y recuperadores del suelos de gran importancia agronómica (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009; Mondol *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014).

En la industria y en la agricultura, hay gran interés en el descubrimiento de nuevos productos biológicos con características benéficas y limpias para el medio ambiente, que puedan ser utilizados como biopesticidas (Jha y Anjaiah, 2007; Czaja *et al.*, 2015).

Los biopesticidas son insumos de bajo costo que pueden sustituir o complementar a pesticidas de origen químico. Por ello, en los últimos años se ha incrementado el

interés por extraer e identificar compuestos de origen microbiano con actividad antibacteriana o antifúngica. Se ha encontrado que las bacterias producen diversos antibióticos como: fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, piduteorin, pirrolnitrina, lipopéptidos, cianuro de hidrógeno, factores de virulencia como tolaasina y enzimas como: quitinasas, glucanasas y proteasas (Nagarajkumar *et al.*, 2004). La producción de compuestos de origen microbiano se ve influenciado por varios factores entre los que destacan: la temperatura, el medio de cultivo (nutrientes), el pH, fase de crecimiento de la colonia microbiana, condiciones de estrés y la presencia o estímulo de otros microorganismos (Berendsen *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).

El principal interés de esta investigación fue caracterizar y evaluar el potencial de rizobacterias y sus filtrados para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, un hongo fitopatógeno que causa graves daños en cultivos agrícolas.

1.2.- LITERATURA CITADA

- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P. 2012. Therhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17:478–486.
- Bertrand S., Bohni N., Schnee S., Schumpp O., Gindro K., Wolfender J.L. 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32:1180-1204.
- Cho K., Kim Y. 2003. Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol Lett*; 221:221-226.
- Cubillos-Hinojosa J., Valero N., Mejía L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombia*, 27:81-86.
- Czaja K., Góralczyk K., Struciński P., Hernik A., Korcz W., Minorczyk M., Łyczewska M., Ludwicki J.K. 2015. Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union, 71:3-6.
- Jha G., Anjaiah V. 2007. Metabolites of rhizobacteria antagonistic towards fungal plant pathogens. *Annals of Microbiology*, 57:127-130.
- Li H., Zhang S., Lu J., Ulvko H., Pang X., Sun Y., Xue H., Zhao L., Kong T. and Lv J. 2014. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei*; ASTI8 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, 43:57-64.
- Meenu K. 2014. Molecular Mechanism of Cellulase Production Systems in *Trichoderma*. In: Meenu, K., Singh, G., Vishwakarma, R.A. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Publisher: Elsevier, pp319-324.
- Mondol M.A.M., Shin H., Islam M.T. 2013. Diversity of secondary metabolitos from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine drugs*, 11:2846-2872.
- Nagarajkumar M., Bhaskaran R., Velazhahan R. 2004. Involvement of secondary metabolites and etracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctoniasolani*, the rice sheathblight pathogen. *Microbiological Research*, 159:73-81.
- Saraf M., Pandya U., Thakkar A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169:18-29.
- Zhao P., Quan C., Jin L., Wang L., Wang J., Fan S. 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J Microbiol Biotechnol*, 29:401-409.

CAPÍTULO II

2.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1.- Objetivo General

Estudiar el potencial de tres cepas de rizobacterias para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y los mecanismos involucrados.

2.1.1.- Objetivos Específicos

- Estudiar la actividad antagónica de tres cepas de rizobacterias (*Pseudomonas tolaasii* A46, *P. tolaasii* P61 y *Ewingella americana* 108) contra *R. solani*.
- Determinar la actividad antifúngica de los filtrados obtenidos de las tres cepas de rizobacterias crecidas en diferentes medios de cultivo.
- Evaluar el potencial del filtrado bacteriano con mayor actividad antifúngica en el control de *Rhizoctonia solani* en plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.).

2.2.- Hipótesis Particulares

- Las tres cepas de rizobacterias inhiben el crecimiento de *Rhizoctonia solani* nivel *in vitro*.
- Los filtrados de las tres cepas de rizobacterias inhiben el crecimiento de *R. solani*, lo cual es afectado por el medio de cultivo.
- Los filtrados bacterianos reducen el número de plantas dañadas de chile ocasionadas por *Rhizoctonia solani*.

CAPÍTULO III

3.- REVISIÓN DE LITERATURA

3.1.-Problemas fitosanitarios y los biopesticidas como una alternativa para resolverlos

Los fitopatógenos son un problema global que puede generar pérdidas diversas en los cultivos (Suprapta, 2012); en las últimas décadas esto ha ocasionado el abandono de la agricultura en algunas áreas del país donde la incidencia y severidad de las enfermedades está muy acentuada (Mendoza y Pinto, 1983). González-Pérez *et al.* (2004), mencionan que en México, la mayoría de las enfermedades genera pérdidas del 70-80% de la producción. Lugtenberg *et al.*(2013), señalan que la mayoría de las enfermedades en plantas esta asociada con especies patógenas de hongos y oomicetos y, de acuerdo a estos autores, la única forma de controlar es mediante la aplicación de productos químicos.

Los fungicidas químicos son muy tóxicos, tienden a acumularse en el suelo y en los tejidos vegetales, o bien pueden volatilizarse (Waliszewski *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2012). La aplicación constante y excesiva de fungicidas químicos genera razas patógenas cada vez más resistentes y agresivas con los cultivos (Keinath y Zietter, 1998; Pomerantz *et al.*, 2014), contaminación del ambiente y problemas de salud (Bautista *et al.*, 2010; Renxiu *et al.*, 2013).

Por otro lado, la biotecnología ofrece herramientas para el desarrollo sostenible de la agricultura cuando se integra debidamente con otras tecnologías para la producción de alimentos, contribuyendo en gran medida a satisfacer las necesidades de una población en crecimiento (Baysal y Tör, 2014; Gutterson, 2014). La biotecnología hace uso del conocimiento de diferentes disciplinas como la bioquímica, microbiología y genética molecular para aplicarlo en la selección y empleo de organismos en procesos tecnológicos con el fin de obtener un beneficio (Jiménez *et al.*, 2001; Gutterson, 2014; Gupta *et al.*, 2015). Es por ello que el empleo de microorganismos como control biológico es una alternativa que proporciona protección a las plantas y supresión de la enfermedad sin la

aplicación de plaguicidas químicos (Xue *et al.*, 1998; Senthil-Nathan *et al.*, 2009; Baysal y Tör, 2014). En este sentido los estudios se han enfocado en la identificación de especies de rizobacterias y su aplicación como antagonistas de una amplia gama de fitopatógenos en diversos cultivos (Suprpta, 2012; Naupane *et al.*, 2015).

3.2.-Control biológico de patógenos de las raíces de plantas

La rizósfera, es la zona influenciada por las secreciones radicales y alberga gran diversidad de microorganismos que establecen una amplia gama de interacciones entre ellos y las raíces de plantas (Berendsen *et al.*, 2012). Estudios de metagenómica indican que parte de esta diversidad microbiana engloba a especies de bacterias y arqueas que comprenden más de 30,000 especies asociadas con la supresión de enfermedades en plantas (Mendes, 2011).

Desde el punto de vista fitopatológico el control biológico se define como el uso que hace el hombre de cualquier organismo para controlar poblaciones de microorganismos considerados como patógenos (Agris, 2005). En el caso de rizobacterias antagonistas el biocontrol involucra toda una variedad de mecanismos dirigidos a reducir la longevidad o virulencia del agente patógeno, hasta la mitigación de los efectos de la enfermedad, incluyendo mecanismos de respuesta del hospedante mismo (Thomashow, 1996; Suprpta, 2012).

El estudio rizobacterias antagonistas se ha centrado en la genética de las bacterias, la bioquímica de los compuestos producidos, los factores ambientales que afectan a este grupo microbiano y en los mecanismos de biocontrol de patógenos (Thomashow 1996; Chauhan *et al.*, 2014). Las rizobacterias más empleadas en el control biológico son especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* entre otras (Suprpta, 2012). Algunos de estos microorganismos presentan amplio espectro de protección, aplicándose en diversos cultivos de interés económico, tanto en condiciones de invernadero como de campo (Suprpta, 2012; Huang *et al.*, 2013). Las interacciones entre microorganismos son diversas, dependen de factores biológicos y ambientales por

lo que su entendimiento tiene especial importancia para el diseño de estrategias que permita una mayor eficiencia en el control de fitopatógenos (Cray *et al.*, 2015).

La estrategia de los agentes de biocontrol se basa en la interacción negativa entre comunidades microbianas; los mecanismos implicados en el biocontrol son: antibiosis, secreción de enzimas líticas, competencia, parasitismo y resistencia sistémica (Whipps, 2001; Compant *et al.*, 2010). Saraf *et al.*(2014) vincula al control biológico con actividad aleloquímica que incluye la producción de antibióticos, enzimas líticas e integra nuevos términos como son: los factores de virulencia, bioácidos, moléculas involucradas en *Quorum sensing* y producción de sideróforos. Por otro lado, cabe señalar que en función de las condiciones imperantes y del antagonista, el control puede ser resultado de un solo mecanismo o, bien, de la acción sinérgica de varios de ellos, ya sea por la acción de uno o varios organismos (consorcios microbianos) (Bélanger *et al.*, 1995; Benhamou *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2014). El uso de productos microbianos con bioactividad es una de las nuevas herramientas biotecnológicas en el control de enfermedades, por lo que el interés en la extracción de metabolitos secundarios con actividad biopesticida se ha incrementado en los últimos años. En particular, las rizobacterias con aptitudes biocontroladoras son vistas como fuentes de antimicrobianos con potencial para ser aplicados como biopesticidas (Suprpta, 2012).

3.3.- Perspectivas de los microorganismos como fuentes de metabolitos secundarios

De acuerdo con análisis metagenómico existe una enorme diversidad de compuestos naturales sin explorar en el ambiente (Charlop *et al.*, 2015). Esto sugiere que la mayoría de los microorganismos poseen genes para producir una gran variedad de metabolitos secundarios, lo que ha generado interés en ellos como fuentes de productos naturales con potencial biotecnológico (Newman y Cragg, 2012; Bertrand *et al.*, 2014). En esta búsqueda por nuevos productos naturales los metabolitos secundarios de microorganismos son de importancia debido a su amplio espectro de actividad biológica. Por ejemplo, los

microorganismos pueden producir toxinas que son perjudiciales para la salud humana y animal (Nielsen *et al.*, 2009; Kew, 2013; Wu *et al.*, 2014), también son fuentes de nuevos fármacos en la industria farmacéutica (Mojid *et al.*, 2013; Araujo *et al.*, 2015), de aditivos de alimentos, antioxidantes, pigmentos, entre otros (Archer *et al.*, 2008).

Así mismo, los metabolitos microbianos pueden ser aplicados como biopesticidas contra diversas enfermedades en una amplia gama de cultivos (Chauhan *et al.*, 2014). En este último caso la extracción de compuestos con actividad aleloquímica ha generado toda una serie de investigaciones cuyos resultados siguen siendo probados para aplicaciones en un futuro. Por ejemplo, los microorganismos benéficos pueden inhibir fitopatógenos mediante la producción de antibióticos, enzimas, moléculas del *Quorum sensing* y compuestos volátiles (Baysal y Tör, 2014; Saraf *et al.*, 2014).

3.4.- Antibiosis

La producción de antibióticos es considerada como uno de los principales mecanismos de biocontrol de las rizobacterias antagonistas (Masood *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2015). Este tipo de mecanismo se caracteriza por la producción y liberación de moléculas heterogéneas volátiles o difusibles que matan o inhiben el crecimiento de otro organismo susceptible (Masood *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2014). Especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* han reportado como antagonistas de una amplia gama de fitopatógenos como: *Pythium*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* (Khabbaz *et al.*, 2015). En el caso de *Pseudomonas* se ha reportado que libera potentes antibióticos desde el ácido fenazina-1-carboxílico, 2,4-diacetilfloroglucinol hasta pirrolnitrina y pioluteorina (Hassan *et al.*, 2014; Khabbaz *et al.*, 2015). En *Bacillus* se ha encontrado que produce fengicina, bacilomicina, bacilisina, surfactina e iturina A. (Cawoy *et al.*, 2014; Cawoy *et al.*, 2015; Khabbaz *et al.*, 2015). Otras especies de bacterias pertenecientes a *Serratia* también producen pirrolnitrina que inhibe a *R. solani* (Neupane *et al.*, 2015).

3.5.- Producción de sideróforos

La producción de sideróforos es una estrategia de plantas y microorganismos para atrapar el hierro en suelos con baja disponibilidad de este elemento (Singh *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2015). Las rizobacterias antagonistas como *Pseudomonas* y *Bacillus* (Khabbaz *et al.*, 2015; Zhu y Yang, 2015) compiten satisfactoriamente con los patógenos y otras bacterias saprófitas por hierro, gracias a la producción de sideróforos (Weller, 1993; Singh *et al.*, 2014). Estos compuestos quelan la mayor parte del Fe^{+3} presente en el suelo, disminuyendo su disponibilidad para otros microorganismos, entre los que se encuentran los patógenos (Ruiz *et al.*, 2015; Zhu y Yang, 2015). La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos depende de la planta, del fitopatógeno a eliminar, la composición del suelo, de la rizobacteria y la afinidad del sideróforo por el hierro (Glick, 2007).

3.6.- Síntesis de enzimas

La producción de enzimas se considera como un componente importante del control biológico, ya que estas pueden actuar sinérgicamente debilitando la pared celular de los hongos patógenos (Chen *et al.*, 2013; Khabbaz *et al.*, 2015). Las enzimas involucradas son: quitinasas, glucanasas, proteasas y catalasas, las cuales pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Faheem *et al.*, 2015). La producción de enzimas como mecanismo para el control biológico de patógenos tiene gran potencial que podría ser explotado comercialmente en la agricultura mundial (Illakkiam *et al.*, 2013).

3.7.- Moléculas del *Quorum sensing*

Las bacterias son capaces de detectarse unas a otras mediante un sistema de comunicación célula-célula. Esto es conocido como *Quorum sensing* y está implicado en la regulación de la expresión genética, mediada por la densidad de población que involucra la producción constante y la detección de moléculas de señalización (Helman y Chermin, 2015). Las moléculas del *Quorum sensing*, están involucradas en la señalización entre microorganismos y en las relaciones entre éstos y las plantas (Basu y Sarkar, 2015; Helman y Chermin, 2015). El interés por

estudiar estas moléculas es debido a que estas son responsables de la regulación de la expresión genética de gran variedad de procesos fisiológicos involucrados en la simbiosis, virulencia, y competencia de microorganismos (Baysal y Tör, 2014; Basu y Sarkar, 2015). Las investigaciones están enfocadas en detectar los compuestos responsables del proceso de señalización que conduce hacia la patogénesis. En este sentido el uso de moléculas bioactivas encargadas de la expresión de genes patógenos puede ser de utilidad para evitar enfermedades en plantas, lo cual podría tener un potencial en la agricultura (Jošić *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013).

3.8.- Producción cianuro de hidrógeno y otros volátiles

Un mecanismo que utilizan las rizobacterias para controlar fitopatógenos es la producción de compuestos volátiles, principalmente de cianuro de hidrógeno (HCN) (Zhang *et al.*, 2015). Por ejemplo; *Pseudomonas* y *Bacillus*, inhiben el desarrollo de hongos mediante la producción de HCN (Abou *et al.*, 2015; Khabbaz *et al.*, 2015). El cianuro de hidrógeno es un compuesto muy volátil y tóxico para otros organismos, esta característica lo hace ideal para el control biológico (Zdor, 2015). Además, las rizobacterias liberan una gran cantidad de metabolitos volátiles de bajo peso molecular que tienen un efecto sobre el crecimiento de otros microorganismos (Blom *et al.*, 2010; Kai *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2012; Weise *et al.*, 2013).

3.9.- Factores que influyen en la producción de metabolitos bacterianos

La producción de compuestos de origen bacteriano en un medio de cultivo está influenciada por varios factores como son la fuente de nutrientes (carbono, nitrógeno y sales minerales), pH, tiempo de incubación y velocidad de agitación del medio, así como algún factor de estrés o estímulo ocasionado por la presencia o ausencia del agente patógeno (Wang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013). Se ha observado que el cambio de la osmolaridad en el medio de cultivo, cuando se adiciona NaCl, aumenta la producción de metabolitos bacterianos (Wang *et al.*, 2011; Jafarzade *et al.*, 2013). Los resultados de investigaciones indican que

fuentes de carbono como glicerol, glucosa, fructosa maltosa, sacarosa y lactosa aumentan la producción de compuestos bioactivos, en comparación con otras fuentes de carbono provenientes de especies vegetales sin procesar (Wang *et al.*, 2011; Jafarzade *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013). En el caso del nitrógeno se ha encontrado que la harina de soya y la peptona proteasa incrementan la producción de compuestos antifúngicos en cepas bacterianas mientras que las fuentes crudas de nitrógeno reducen la síntesis de estos compuestos (Wang *et al.*, 2011). Además, los micronutrientes como $MgSO_4$, $MgCl_2$, $NaCl$, KH_2PO_4 y $(NH_4)_2SO_4$ aumentan la producción de antimicrobianos; mientras que elementos como $Zn(NO_3)$ y $CuSO_4$ disminuyen la producción de metabolitos secundarios de origen bacteriano (Wang *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la acidificación del medio de cultivo bacteriano se debe a la producción de ácidos orgánicos; a las bacterias con estas características se les denomina bacterias ácido lácticas (Liet *et al.*, 2014). Los ácidos orgánicos son metabolitos secundarios con actividad antifúngica o pueden actuar como modificadores del pH (Pramvan *et al.*, 2010; Liet *et al.*, 2014).

3.10.- LITERATURA CITADA

- Abou A.H.E., Neweigy N.A., Zaghloul R.A., El-Sayed S.A., Bahloul, A.M. 2015. Evaluation of some biocontrol agents against soil pathogenic fungi. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 6:439-448.
- Agrios G.N. 2005. *Fitopatología*. Segunda edición, editorial Limusa, pp. 88-146.
- Araujo A.C.V., Abreu F., Silva K.T., Bazylnski D.A., Lins U. 2015. Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts. *Marine Drugs*, 13:389-430.
- Archer D.B., Connerton I.F., MacKenzie D.A. 2008. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Adv Biochem Eng. Biotechnol*, 111:99-147.
- Basu A., Sarkar A. 2015. Molecular docking analysis of ahl molecule on plant protein arr10. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, 340:187-193.
- Bautista-Calles J., García-Espinosa R., Zavaleta-Mejía Emma, Pérez-Moreno Jesús, Montes-Belmont Roberto, Ferrera-Cerrato Ronald y Huerta-Lara Manuel. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia*, 35:613-618.
- Baysal Ö., Tör M. 2014. Smart biologics for crop protection in agricultural systems. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38:723-731.
- Bélanger R.R., Dufour N., Caron J., Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 51:41-53.
- Benhamou N., Rey P., Chérif M., Hockenhull J., Tirilly Y. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 87:108-122.
- Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17:478-486.
- Bertrand S., Bohni N., Schnee S., Schumpp O., Gindro K., Wolfender J.L. 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32:1180-1204.
- Blom D., Fabbri C., Eberl L., Weisskopf L. 2010. Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Appl Environ Microbiol*, 77:1000-1008.

- Cawoy H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P., Ongena M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8:281-295.
- Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus depends* on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27:87-100.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42:669-678.
- Cray J, Houghton J, Cooke L, Hallsworth J. 2015. A simple inhibition coefficient for quantifying potency of biocontrol agents against plant-pathogenic fungi. *Biol Control*, 81:93-100.
- Charlop-Powers Z., Owen J.G., Reddy B.V.B., Ternei M., Guimaraes D.O., De Frias U.A., Pupo M.T., Seepe P., Feng Z., Brady S.F. 2015. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *Elife*, 4:1-10.
- Chauhan A., Balgir P.P., Shirkot C.K. 2014. Antifungal potential of native strain isolated from rhizosphere soil of *Valeriana jatamansi* from temperate regions of Himachal Pradesh. *Journal of Applied Horticulture*, 16:131-135.
- Chen C.Y., Wang Y.H., Chang H.D. 2013. Chitinase and the encoding gene may increase antifungal activity of the antagonistic bacteria. *In: Chen C.Y., Wang Y.H., Chang H.D. (Eds). Applications of Microbial Genes in Enzyme Technology*, pp. 13-18.
- Faheem M., Raza W., Zhong W., Nan Z., Shen Q., Xu Y. 2015. Evaluation of the biocontrol potential of *Streptomyces goshikiensis* YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Biological Control*, 81:101-110.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol*, 119:329-39.
- González-Pérez, E.; Yañez-Morales, M. J.; Santiago-Santiago, V. y Montero-Pineda, A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José manzano, el verde, Puebla. *Agrociencia*. 38:635-661.
- Gupta V.K., Tuohy M.G. 2015. Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications. *In: Gupta V.K., Tuohy M.G., O'Donovan A., Lohani M., (Eds). Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and applications: Publisher: Wiley-Blackwell, p. 736.*

- Gutiérrez R., Ruíz J.L., Ortiz R., Vega S., Schettino B., Yamazaki A., Ramírez M. de L. 2012. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from organic farms in Chiapas, México. *Bull Environ Contam Toxicol*, 89:882–887.
- Gutterson N. 2014. Commercialization of bioagricultural products. *Biotechnology entrepreneurship: starting, managing, and leading biotech companies*, pp. 149-160.
- Hassan M.N., Afghan S., Hassan Z.U., Hafeez F.Y. 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, 53:229-239.
- Helman Y., Chernin L. 2015. Silencing the mob: Disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology*, 16:316-329.
- Huang J., Wei Z., Tan S., Mei X., Yin S., Shen Q., Xu Y. 2013. The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt. *Applied Soil Ecology*, 72:79-84.
- Illakkiam D., Anuj N.L., Ponraj P., Shankar M., Rajendhran J., Gunasekaran P. 2013. Proteolytic enzyme mediated antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* against *Macrophomina phaseolina*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51:1024-1031.
- Jafarzade M., Yahya N.A., Shayesteh F., Usup G., Ahmad A. 2013. Influence of culture conditions and medium composition on the production of antibacterial compounds by marine *Serratia* sp. WPRA3. *Journal of Microbiology*, 51:373-379.
- Jiménez D., Rocio, *et al.* 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: Agro-biotecnología, Avance y Perspectiva, 20, p. 395.
- Jošić D., Pivić R., Miladinović M., Starović M., Pavlović S., Durić S., Jarak M. 2012. Antifungal activity and genetic diversity of selected *Pseudomonas* spp. From maize rhizosphere in Vojvodina. *Genetika*, 44:377-388.
- Jung B.K., Kim Y.H., Kim S.D. 2013. Root colonization and quorum sensing of the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* 2112 involved in the red-pepper rhizosphere. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41:105-111.
- Kai M., Crespo E., Cristescu S.M., Harren F.J., Francke W., Piechulla B. 2010. *Serratia odorifera*: Analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88:965-976.
- Kang Y., Shen M., Yang X., Cheng D., Zhao Q. 2014. A plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) mixture does not display synergistic effects, likely by

- biofilm but not growth inhibition. *Microbiology (Russian Federation)*, 83:666-673.
- Keinath A.P., Zitter T.A. 1998. Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from south Carolina and New York. *Plant Disease*, 82:479-484.
- Kew M.C. 2013. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*, 22:305-310.
- Khabbaz S.E., Zhang L., Cáceres L.A., Sumarah M., Wang A., Abbasi P.A. 2015. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Annals of Applied Biology*, 166:456-471.
- Li H., Zhang S., Lu J., Ulvko H., Pang X., Sun Y., Xue H., Zhao L., Kong T., Lv J. 2014. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei*; ASTI8 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, 43:57-64.
- Lugtenberg B.J.J., Malfanova N., Kamilova F., Berg G. 2013. Microbial control of plant root diseases. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 2:575-586.
- Masood F., Ansari M.I., Malik A. 2012. Role of rhizobacteria in antibiosis. *in: Satinder K.B. (Eds). Biocontrol: Management, Processes and Challenges*, pp. 195-218.
- Mendes R., Kruijt M., De Bruijn I., Dekkers E., Van Der Voort M., Schneider J.H.M., Piceno Y.M., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Bakker P.A.H.M., Raaijmakers J.M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332:1097-1100.
- Mendoza Z.C., Pinto B.C. 1983. *Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 220.
- Miao L., Wang X., Jiang W., Yang S., Zhou H., Zhai Y., Zhou X., Dong K. 2013. Optimization of the culture condition for an antitumor bacterium *Serratia proteamacula* 657 and identification of the active compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29:855-863.
- Mojid M.M.A., Shin H., Tofazzal I.M. 2013. Diversity of secondary metabolites from Marine *Bacillus* species: Chemistry and Biological Activity. *Marine drugs*, 11:2846-2872.
- Neupane S., Finlay R.D., Alström S., Elfstrand M., Högberg N. 2015. Transcriptional responses of the bacterial antagonist *Serratia plymuthica* to the fungal phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Environmental Microbiology Reports*, 7:123-127.

- Newman D.J., Cragg G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75:311-335.
- Nielsen K.F., Mogensen J.M., Johansen M., Larsen T.O., Frisvad J.C. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:1225-1242.
- Pomerantz A., Cohen Y., Shufan E., Ben-Naim Y., Mordechai S., Salman A., Huleihel M. 2014 Characterization of *Phytophthora infestans* resistance to mefenoxam using FTIR spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141:308-314.
- Renxiu Y., Chunling L., Yahua C., Guiping W., Yue X., Zhenguo S. 2013. Copper-Resistant Bacteria Enhance Plant Growth and Copper Phytoextraction, *International Journal of Phytoremediation*, 15:573-584.
- Ruiz J.A., Bernar E.M., Jung K. 2015. Production of Siderophores Increases Resistance to Fusaric Acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS ONE* 10(1): e0117040. doi:10.1371/journal.pone.0117040.
- Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S., Tribedi P. 2015. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI:10.1007/s11356-015-4294-0.
- Saraf M., Pandya, U., Thakkar, A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169:18-29.
- Seiber J.N., Coats J., Duke S.O., Gross A.D. 2014. Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:11613-11619.
- Senthil-Nathan, S., Kalaivani, K., Choi M.Y. 2009. Effects of jasmonic acid-induced resistance in rice on the plant brownhopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95:77-84.
- Singh N., Saini P., Singh P. 2014. Characterization and evaluation of siderophore producing rhizospheric *Pseudomonas fluorescens* as *R. oryzae* and *R. solani* antagonists. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8:505-513.
- Suprpta D.N. 2012. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 18:1-8.
- Thomashow L.S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 7:343-347.

- Waliszewski S.M., Carvajal O., Gómez-Arroyo S., Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Hayward-Jones P.M., Valencia-Quintana R. 2008. DDT and HCH isomer levels in soils, carrot root and carrot leaf samples. *Bull Environ Contam Toxicol*, 81:343-347.
- Wang Y, Fang X, An F, Wang G, Zhang X. 2011. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microb Cell Fact*, 10:1-15.
- Weise T, Kai M., Piechulla B. 2013. Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *Plos One* 8:e63538. doi:10.1371/journal.pone.0063538.
- Weller, D.M., Thomashow L.S. 1993. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Current Opin. Biotechnol*, 4:306-311.
- Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52:487-511.
- Wu F., Groopman J.D., Pestka J.J. 2014. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu Rev Food Sci Technol*, 5:351-372.
- Xue L., Charest P.M., Jabaji-Hare S.H. 1998. Systemic induction of peroxidases, β -1,3-glucanases, chitinases and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, 88:359-365.
- Yuan J., Raza W., Shen Q., Huang Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol*, 78:5942-5944.
- Zdor R.E. 2015. Bacterial cyanogenesis: Impact on biotic interactions. *Journal of Applied Microbiology*, 118:267-274.
- Zhang L., Khabbaz S.E., Wang A., Li H., Abbasi P.A. 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium crown* and root rot disease of tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 118:685-703.
- Zhao P., Quan C., Jin L., Wang L., Wang J., Fan S. 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J Microbiol Biotechnol*, 29:401-409.
- Zhu H., Yang H. 2015. Isolation and characterization of a highly siderophore producing *Bacillus subtilis* Strain. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 332:83-92.

CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD ALELOQUÍMICA DE LOS FILTRADOS DE *Pseudomonas tolaasii* Y *Ewingella americana* CONTRA *Rhizoctonia solani*

4.1.- RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la capacidad de tres cepas de rizobacterias (*Pseudomonas tolaasii* A46, *P. tolaasii* P61 y *Ewingella americana* 108) para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, así como estudiar algunos de los mecanismos involucrados. Las cepas P61 y 108 inhibieron el crecimiento radial de *R. solani* en 49%, mientras que la cepa A46 sólo inhibió al hongo en 37%. Se encontró que las tres cepas de rizobacterias no producen compuestos volátiles. Además, los filtrados obtenidos de cada una de estas cepas mostraron actividad antifúngica siendo el filtrado de la cepa 108 el mejor con un halo de inhibición de 4 mm. El co-cultivo de las rizobacterias con el hongo fitopatógeno no aumentó la actividad antifúngica de los filtrados bacterianos en comparación con los cultivos simples. Las tres cepas no mostraron actividad quitinasa, sin embargo, las cepas A46 y P61 resultaron positivas para la producción de sideróforos. Se seleccionó la cepa 108 para evaluar la actividad antifúngica de esta y de sus filtrados en cuatro medios (Luria Bertani, King B, caldo nutritivo y papa dextrosa); los medios de cultivo influyeron en la actividad antagónica de *E. americana* contra *R. solani*, la más alta se obtuvo en agar papa dextrosa (APD), así mismo el filtrado obtenido de esta cepa crecida en caldo papa dextrosa (CPD) presentó la mayor actividad en comparación con los otros medios. El potencial del filtrado de la cepa 108 como biopesticida para controlar el hongo fitopatógeno se evaluó en plántulas de chile serrano, se observó que la aplicación del filtrado disminuyó la incidencia de la enfermedad ocasionada por *R. solani*.

Palabras clave: biopesticidas, antagonismo, inhibición, hongos fitopatógenos.

**ACTIVITY ALLEOCHEMICAL FILTRATES *Pseudomonas tolaasii* AND
Ewingella americana AGAINST *Rhizoctonia solani*
Mendoza Pineda Deisy Yubeli
Colegio de Postrados, 2015**

ABSTRACT

In the research capacity of three strains of rhizobacteria (*Pseudomonas tolaasii* A46, P61 and *P. tolaasii Ewingella americana* 108) to inhibit the growth of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* we were evaluated, and study some of the mechanisms involved. P61 and 108 strains inhibited growth of *R. solani* radial 49%, while A46 inhibited the fungus strain only 37%. It was found that the three rhizobacteria strains do not produce volatile compounds. In addition, the filtrates obtained from each of these strains showed antifungal activity being filtering the best strain 108 with an inhibition of 4mm. The co-cultivation of plant pathogenic fungus with rhizobacteria did not increase the antifungal activity of the bacterial filtered simple compared to crops. The three strains showed no chitinase activity, however, A46 and P61 strains were positive for the production of siderophores. 108 strain were selected to evaluate the activity of this antifúngica and its filtered in four ways (Luria Bertani, King's B, nutrient broth and dextrose potato); culture media influenced the *E. americana* antagonistic activity against *R. solani*, the highest was obtained in potato dextrose agar (PDA), also the filtrate obtained from this strain grown in potato dextrose broth (PDC) had the highest activity compared with the other media. Filtering the potential strain 108 as biopesticide to control the phytopathogenic fungus was evaluated in seedlings of serrano chile, we observed that the application of filtering reduced the incidence of disease caused by *R. solani*.

Keywords: biopesticidas, antagonismo, inhibición, hongos fitopatógenos.

4.2.- INTRODUCCIÓN

México es el país con mayor variedad genética de *Capsicum* a nivel mundial (Ramírez, 1996; Hermosillo *et al.*, 2008). La palabra chile es de origen náhuatl y es un símbolo de identidad mexicana, se aplica a numerosas variedades y formas de la planta herbácea anual *Capsicum annuum*, de la familia solanaceae; entre estas variedades destaca el chile serrano (*Capsicum annuum* L.) de gran importancia económica, social y cultural. Por lo anterior, México es considerado el centro de origen y domesticación del género *Capsicum* y sobre todo de la especie *annuum*; su consumo prácticamente es en fresco y seco para la preparación de salsas o sus procesados, polvo o encurtidos. El fruto es rico en fibra, vitaminas A y C, potasio, agua, hierro, magnesio, tiamina, riboflavina y niacina, y contiene capsaicina, un compuesto de utilidad farmacéutica (Ramírez, 1996; Pérez-Castañeda *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Bhutia *et al.*, 2015; Venier *et al.*, 2015).

México a nivel mundial, no es el productor más importante de chile debido a los bajos rendimientos del cultivo (Sarath *et al.*, 2011). De acuerdo con Anaya *et al.* (2011) son varios los factores que causan el bajo rendimiento; pero posiblemente el factor más limitante para el cultivo son un complejo de hongos de hábitos radicales conformado por *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. causantes de la enfermedad conocida como marchitez o Damping off. El daño producido en la planta se localiza principalmente en el cuello de la raíz o base del tallo provocando marchitamiento y muerte de la planta (Reddy, 2014). Generalmente la enfermedad es controlada con manejo cultural y agroquímicos (Parry 1990; Secor y Gudmestad 1999); sin embargo, los fungicidas contribuyen a seleccionar razas patógenas resistentes (Pomerantz *et al.*, 2014). A pesar del uso constante de agroquímicos, este tipo de problemas fitosanitarios persisten y el manejo de sustancias químicas genera problemas ambientales y de salud.

Con los avances en la ciencia se han propuesto herramientas biotecnológicas como el control biológico basado en el uso de microorganismos benéficos, el cual es un modelo alternativo que se puede integrar al control de organismos

patógenos y como se trata de modelos biológicos adaptados al manejo agrícola, no afecta al medio ambiente (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Baysal y Tör, 2014; Gutterson, 2014). El control biológico con microorganismos benéficos se basa en estrategias o mecanismos de acción como: producción de antibióticos, producción de enzimas, competencia por espacio o nutrientes, parasitismo y resistencia sistémica adquirida (Whipps, 2001; Compant *et al.*, 2010; Saraf *et al.*, 2014).

En este contexto el propósito de esta investigación fue evaluar la actividad antagonista de tres cepas de rizobacterias (dos de *Pseudomonas tolaasii* y una de *Ewingella americana*) contra *Rhizoctonia solani* y definir sus mecanismos de acción.

4.3.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1.- Material microbiano

Se utilizaron tres cepas de rizobacterias (A46, *Pseudomonas tolaasii*; P61, *Pseudomonas tolaasii* y 108, *Ewingella americana*) que fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados (Cuadro 1). Las cepas de rizobacterias se cultivaron en agar nutritivo para activarlas. Como hongo fitopatógeno se utilizó una cepa de *Rhizoctonia solani* obtenida del mismo laboratorio y que fue aislada de cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*).

Cuadro 1. Procedencia de las bacterias antagonistas utilizadas en esta investigación.

Cepa	Especie	Origen
P61	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Cultivo de papa, Toluca Estado de México
A46	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Cultivo de papa, Toluca Estado de México
108	<i>Ewingella americana</i>	Esporoma de hongo ectomicorrízico, Monte Tláloc, Estado de México

4.3.2.- Actividad antagonista

Las cepas de rizobacterias se sembraron (en línea) en placas con medio APD (agar papa dextrosa) y a las 24 h posteriores se sembró un disco de agar con micelio de *R. solani* a 5 cm del cultivo bacteriano, se incubó a 28 °C y a los 5 días se midió el crecimiento radial del hongo fitopatógeno. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula: % Inhibición = $\frac{R - r}{R} \times 100$, donde R es el radio del hongo en el testigo y r es el radio del hongo en cada uno de los tratamientos en presencia del antagonista.

4.3.3.- Detección de compuestos volátiles

Las rizobacterias y el hongo fitopatógeno se sembraron en placas de APD divididas; en una sección se sembró la bacteria y a las 24 h se sembró un disco de *Rhizoctonia solani* en la otra sección de la caja. Se observó el crecimiento del hongo a los 5 días y se comparó con el testigo.

4.3.4.- Ensayo de filtrados bacterianos

Se establecieron dos ensayos con filtrados de las cepas bacterianas. En el primer ensayo las cepas se cultivaron en medio caldo papa dextrosa (CPD) por 72 h en agitación a 28 °C. El sobrenadante se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min y se filtró utilizando membranas Durapore marca Millex de 0.22 µm. La actividad de los filtrados bacterianos se evaluó mediante la técnica de pozos en placas con medio APD; en las placas con pozos se sembró en el centro un disco de *Rhizoctonia solani* y a las 24 h posteriores se adicionaron volúmenes de 200 o 300 µL de los filtrados en cada pozo. Se realizaron observaciones a las 24 h; se midió la zona de inhibición cercana al pozo.

4.3.5.- Producción de compuestos antifúngicos mediante el co-cultivo

Las rizobacterias (108, A46 y P61), se sembraron en medio caldo PD inoculado previamente con un disco de *R. solani*, a las 72 h se filtró con membranas de 0.22 µm Durapore; los filtrados se depositaron en volúmenes de 200 y 300 µL en los pozos de las placas de APD, donde en el centro se colocó un disco de *R. solani*

con 24 h de crecimiento. Se midió el halo de inhibición en la zona cercana al pozo. Se incluyó un testigo donde sólo se dejó crecer el hongo fitopatígeno y en los pozos se agregó medio caldo PD. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 28°C. Se evaluó a las 24 h el halo de inhibición del crecimiento del hongo alrededor del pozo.

4.3.6.- Detección de actividad quitinolítica en placa

Las cepas de bacterias P61, A46 y 108 fueron sembradas por método de estría, en medio Luria Bertani (LB) adicionado con quitina coloidal (la quitina en escamas marca Sigma se digestó con ácido clorhídrico concentrado por 24 h) y se cultivaron a 28°C durante 72 h. Se evaluó la formación de un halo incoloro transparente.

4.3.7.- Detección de producción de sideróforos en placa

Las cepas bacterianas P61, A46 y 108 fueron sembradas en cajas con medio de Cromo azurol (CAS) agar modificado (Perez-Miranda *et al.*, 2007), que brevemente se describe: el colorante CAS se preparó de acuerdo con Loudon (2008), y se adicionó a un matraz que contenía caldo nutritivo ajustado a pH 7 al cual se agregó agar (15 g L⁻¹). Se evaluó la formación de halos alrededor de las colonias a las 72 h después de incubadas las cepas a 28°C (Milagres *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2001; Perez- Miranda *et al.*, 2007).

4.3.8.- Filtrados bacterianos usando diferentes medios de cultivo

Las cepas de rizobacterias (P61 y 108) se cultivaron en cuatro medios distintos [caldo nutritivo (Merck), Luria Bertani (por litro: 10 g Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl y 1 g de triptófano), King B (por litro: 20 g de peptona, 6 g de MgSO₄.H₂O, 6 g de K₂HPO₄ y 15 mL de glicerol) y caldo papa dextrosa (Merck)] por 72 h en agitación a 180 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min. El extracto se filtró en una membrana de 0.22 µm.

La actividad antibiótica del filtrado se evaluó en un bioensayo con el hongo fitopatígeno. Para esto, se cortaron discos con el hongo y se sembró uno de estos

discos en cada caja con medio agar papa dextrosa (APD); en las cajas se hicieron tres pozos con sacabocados que se llenaron con 300 μ L del extracto bacteriano. Las cajas se incubaron por 24 h; se midió el halo de inhibición alrededor de los pozos.

4.3.9.- Antagonismo en cultivo dual mediante la división bi-partita con diferentes medios

La cepa 108 fue cultivada en placas con agar nutritivo durante 24 h. Se prepararon placas bipartitas, que consistió en llenar las cajas de petri con APD y después que solidificó el medio se quitó una mitad con un bisturí, la cual se sustituyó llenando con diferentes medios específicos para la bacteria (Luria Bertani, Agar nutritivo, APD y King B). La bacteria se sembró en línea y a las 24 h posteriores se sembró un disco del hongo, el cual siempre se colocó en la mitad que contenía APD; las mediciones del crecimiento del hongo se realizaron a las 48 h. Los datos se usaron para calcular el porcentaje de inhibición mediante la fórmula: % Inhibición = $(R - r) \times 100 / R$, donde: R es el crecimiento radial del hongo en el testigo, r es el crecimiento radial del hongo en cada uno de los tratamientos en presencia del antagonista.

4.3.10.- Actividad de biocontrol en planta

Se usó el filtrado bacteriano de *Ewingella americana* 108 para establecer un ensayo en plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum* L). Se cultivó la cepa bacteriana en caldo papa dextrosa en agitación a 28 °C por 72 h durante 15 min, se centrifugó a 7000 rpm y el sobrenadante se filtró en una membrana estéril de 0.22 μ m; charolas de 7 x 16 x 6 cm se llenaron con arena previamente esterilizada, en cada una se sembraron 30 semillas y a la emergencia se aclaró dejando solo 25 plántulas. Después se inocularon 20 mL de filtrado bacteriano por charola, distribuidos homogéneamente entre las plantas. Además, se incluyeron dos tratamientos, uno con fungicida (Captan, 2 g L⁻¹) y otro sin fungicida. El captan se aplicó solo una vez usando un volumen de 20 mL por charola. En el caso del hongo fitopatógeno *R. solani* éste se cultivó en placas con APD por 5 días para

obtener el inóculo; se colocaron 10 discos con micelio por charola distribuyéndolos entre las plántulas. La humedad relativa en las charolas se aumentó cubriéndolas con bolsas de plástico, esto con el fin de acelerar la aparición de la enfermedad en las plantas. Se tomaron datos de síntomas de la enfermedad en la parte aérea de las plantas y se contó periódicamente el número de plantas muertas en cada uno de los tratamientos.

4.3.11.- Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar en todos los bioensayos. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS versión 9.0, realizando un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

El ensayo con plantulas de chile en el invernadero, se estableció con un diseño experimental de bloques completamente al azar. Se cuantificó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para cada tratamiento, considerando la variable número de plantas dañadas por tratamiento, y se aplicó el método del trapecioide (Campbell y Madden, 1990). Los datos del ABCPE se sometieron a un análisis de varianza y posteriormente a la prueba de separación múltiple de medias de Tukey ($\alpha=0.05$). Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0.

4.4.RESULTADOS

4.4.1.-Actividad antagonista

Las tres cepas de rizobacterias probadas en cultivo dual en placas con APD, presentan actividad antagonista hacia el crecimiento radial de *Rhizoctonia solani*, con diferente grado de inhibición del hongo fitopatógeno, y resaltando las cepas P61 y 108 con 49% de inhibición (Cuadro 2). Se observó la formación del frente de inhibición del hongo en frente de la colonia de cada una de las cepas de rizobacterias.

Cuadro 2. Efecto de tres cepas de rizobacterias en el crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* en cultivo dual usando APD.

Cepa	Crecimiento radial de <i>R. solani</i> (mm)	% Inhibición
Control	70 c *	--
<i>Pseudomonas tolaasii</i> A46	44 b	37
<i>Pseudomonas tolaasii</i> P61	36 a	49
<i>Ewingella americana</i> 108	36 a	49

* Valores con letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$).

4.4.2.- Determinación de compuestos volátiles

Para probar si las rizobacterias producen compuestos volátiles que inhiban a *R. solani*, se usaron cajas de Petri divididas (con una barrera a la mitad de la caja), donde el hongo patógeno se colocó en una de las mitades y la bacteria en la otra. Los resultados mostraron que no hubo inhibición del desarrollo de *R. solani* antes de que este atravesara la barrera de la caja, lo que permite suponer que no hay producción de compuestos volátiles antifúngicos. Sin embargo, el hongo atravesó la división de la caja al cuarto día y creció en el mismo medio donde se sembró la bacteria, hasta que se formó el frente de inhibición causado posiblemente por la difusión de antifúngicos de la cepa bacteriana (Figura 1).

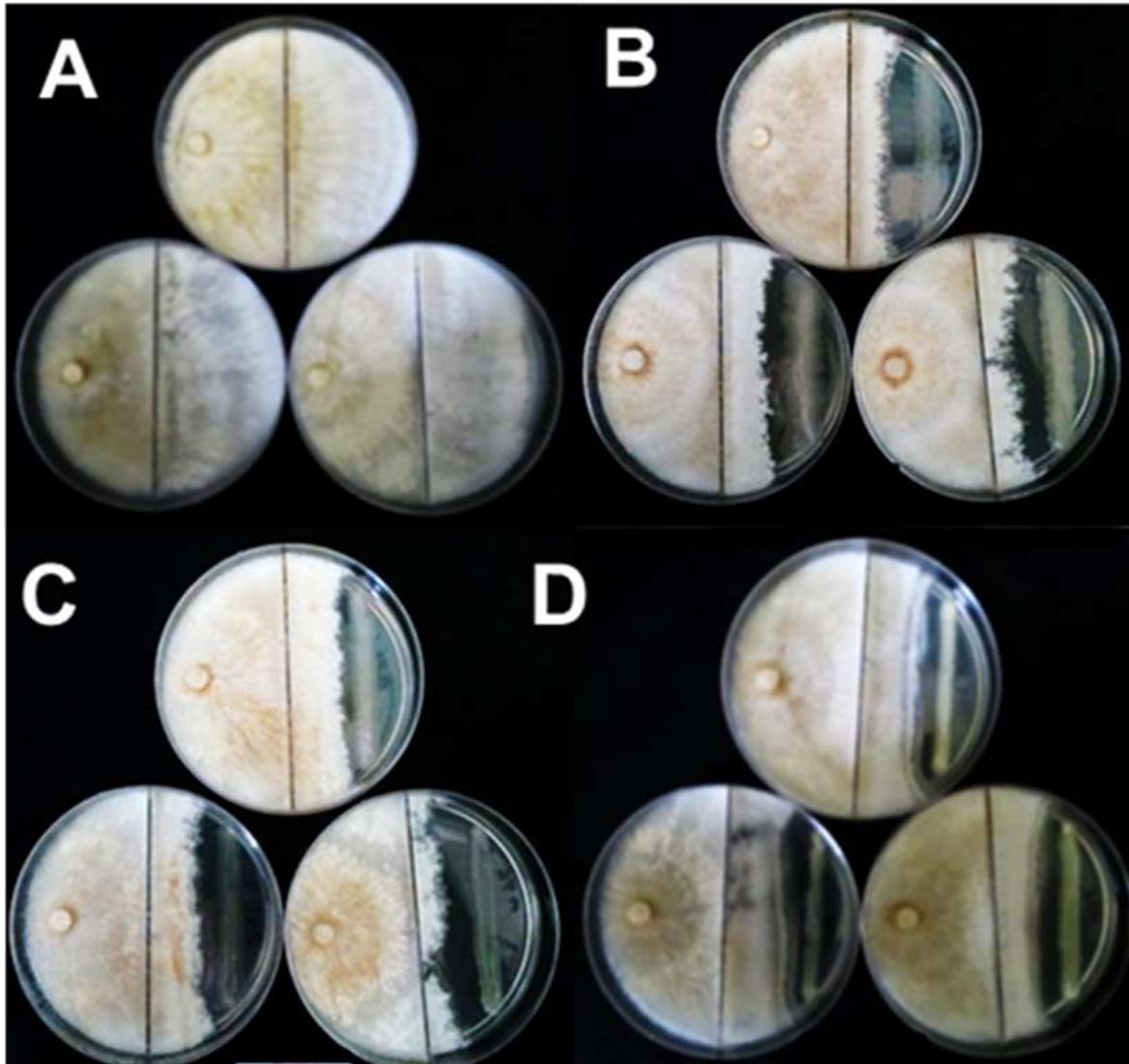


Figura 1. Ensayo en cajas divididas para detectar actividad antifúngica debida a compuestos bacterianos volátiles. Lado derecho de la caja corresponde a la cepa bacteriana y lado izquierdo a *Rhizoctonia solani*. A) control, B) cepa P61, C) cepa A46, D) cepa 108.

4.4.3.- Actividad antifúngica de los filtrados de las rizobacterias

El filtrado obtenido de la cepa 108 mostró mayor actividad antifúngica como se muestra en el Cuadro 3 y Figura 2. Los filtrados de las cepas P61 y A46 tuvieron poco efecto inhibitorio sobre el hongo *R. solani*.

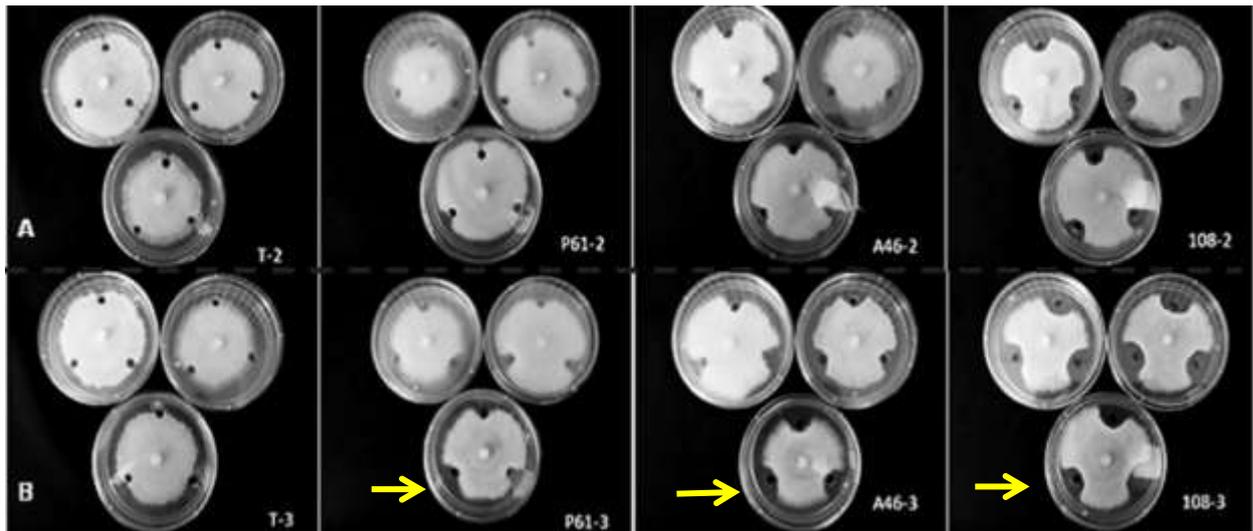


Figura 2. Inhibición del crecimiento de *R. solani* por filtrados de las rizobacterias *Pseudomonas tolaasii* P61, *P. tolaasii* A46 y *Ewingella americana* 108 en medio APD. Mitad superior de la foto, los pozos en el medio se llenaron con 200 µL y mitad inferior, los pozos se llenaron con 300 µL; T = testigo. Las flechas señalan los halos de inhibición.

4.4.4.- Actividad antifúngica de los filtrados de rizobacterias en el co-cultivo

Los filtrados obtenidos de las cepas de rizobacterias cultivadas solas o en co-cultivo con el patógeno tuvieron el mismo efecto sobre el desarrollo del hongo en cajas Petri, como se observa en la Figura 3 y Cuadro 3. Los filtrados de las cepas P61 y A46 no inhibieron el desarrollo del hongo fitopatógeno; pero la cepa 108 si lo inhibieron.

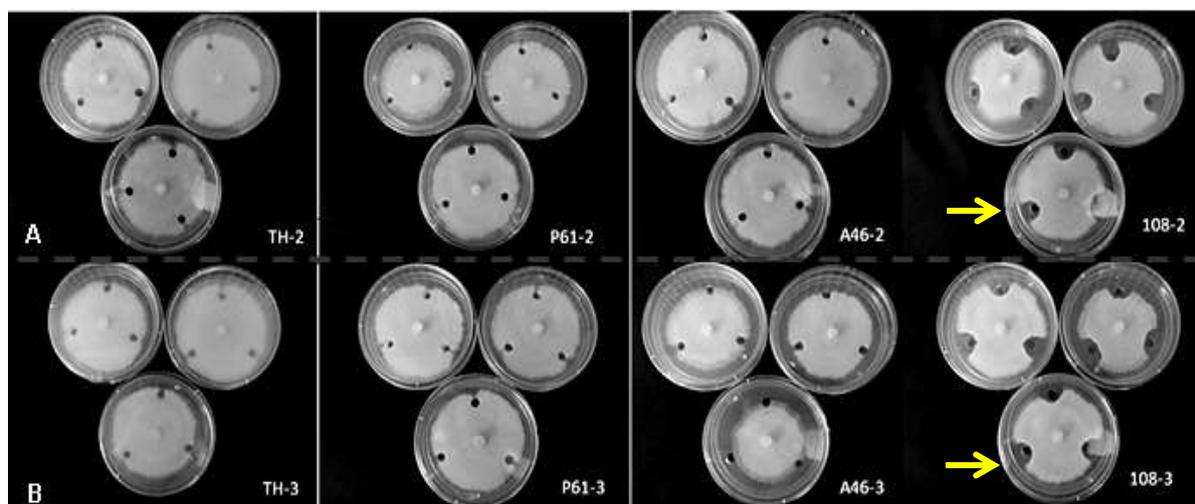


Figura 3. Ensayo de filtrados obtenidos del co-cultivo rizobacteria- *R. solani*; A= 200 µL y B= 300 µL de filtrados por pozo. La formación de la zona de inhibición indica la presencia de compuestos con actividad antifúngica. Las flechas señalan los halos de inhibición.

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento de *R. solani* por filtrados bacterianos obtenidos de cepas cultivadas individualmente o en co-cultivo con el hongo fitopatógeno.

Cepa	Volumen	Inhibición del micelio (mm) con filtrados bacterianos*	Inhibición del micelio (mm) con filtrados de co-cultivo**
Control	200 µL	0.0 b	0.0 c
	300 µL	0.0 b	0.0 c
<i>Pseudomonas tolaasii</i> P61	200 µL	0.0 b	0.0 c
	300 µL	0.6 b	0.0 c
<i>P. tolaasii</i> A46	200 µL	0.0 b	0.0 c
	300 µL	0.6 b	0.0 c
<i>Ewingella americana</i> 108	200 µL	1.0 b	1.0 b
	300 µL	4.0 a	2.0 a

*Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo papa dextrosa (CPD) sin el hongo. **Las cepas se cultivaron en CPD junto con el hongo. Letras idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha= 0.05$).

4.4.5.-Detección de actividad quitinolítica en placa

La producción de enzimas líticas que degradan las paredes de las células de hongos, es otro de los mecanismos de acción de las rizobacterias antagonistas para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Sin embargo, en este ensayo las cepas P61, A46 y 108 no mostraron formación de halos en medio Luria Bertani (LB) más quitina coloidal, lo que indica que las cepas no producen quitinasas (Cuadro 4).

4.4.6.- Detección de producción de sideróforos en placa

Las cepas A46 y P61, resultaron positivas para la prueba de sideróforos, mostraron la formación de un halo alrededor de la colonia de color amarillo. En el caso de la cepa 108, no se observó ningún cambio en el medio CAS, lo que permite descartar la producción de compuestos quelantes en esta cepa(Cuadro 4).

Cuadro 4. Actividad quitinolítica y producción de sideróforos en tres cepas de rizobacterias en cultivo sólido.

Cepa	Actividad quitinolítica	Producción de sideróforos
<i>Pseudomonas tolaasii</i> A46	--	++
<i>Pseudomonas tolaasii</i> P61	--	++
<i>Ewingella americana</i> 108	--	--

++Positivo --No presento cambio.

4.4.7.-Filtrados bacterianos utilizando diferentes medios de cultivo

En este ensayo sólo se utilizaron dos cepas de rizobacterias (P61 y 108) con el propósito de evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antifúngicos. Los filtrados provenientes de la cepa 108 cultivada en medio caldo PD presentaron actividad antifúngica en comparación con los filtrados obtenidos en los otros medios de cultivo donde no se observó actividad. Esto indica que el medio caldo PD es el ideal para que la cepa 108 produzca compuestos con actividad inhibitoria a *R. solani*. Los filtrados de la cepa P61 no mostraron ningún tipo de actividad sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en ninguno de los medios empleados.

Cuando se compara el pH de los cuatro medios utilizados para cultivar las cepas 108 y P61 se observó una acidificación marcada en caldo PD, mientras que otros dos de los medios se alcalinizaron (Cuadro 5). En los cuatro medios utilizados el crecimiento de las células bacterianas para ambas cepas P61 y 108 fue en un rango de 3×10^8 a 1.8×10^9 lo cual sugiere que las cepas crecen bien en los cuatro medio de cultivo, aún en el caso de caldo PD donde el pH se acidificó (Cuadro 5); este cambio de pH posiblemente sea consecuencia de la producción de ácidos orgánicos.

Cuadro 5. Efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad antifúngica de filtrados de dos cepas de rizobacterias.

Medio	Volumen (µL)	Filtrados de <i>Ewingella americana</i> 108			Filtrados de <i>Pseudomona tolaasii</i> P61		
		pH	UFC	Actividad antifúngica (mm)	pH	UFC	Actividad antifúngica
LB	200	7.74	9.6×10^8	--	7.61	5×10^8	--
	300						
CN	200	8.93	3.6×10^8	--	9.05	4.4×10^9	--
	300						
KB	200	6.03	3.3×10^8	--	6.74	2.6×10^8	--
	300						
CPD	200	4.78	1.8×10^9	+(1.0)	5.17	2.6×10^9	--
	300						

*Halo ligero, **Halo marcado, ~No presentó halo. Luria Bertani (LB), caldo nutritivo (CN), medio King B (KB), caldo papa dextrosa (CPD), unidades formadoras de colonias (UFC) y el halo de inhibición esta expresado en milímetros (mm).

4.4.8.- Antagonismo en cultivo dual mediante la visión bi-partita con diferentes medios

El medio base para estudiar el antagonismo de las cepas de rizobacterias contra *Rhizoctoniasolani* fue agar papa dextrosa. En este medio la cepa que presentó una actividad antagónica mayor contra *R. solani* fue la 108. Se realizó un ensayo con esta cepa en cuatro medios (King B, APD, agar nutritivo y Luria-Bertani) en cajas Petri. Una mitad de la caja siempre tuvo como medio APD y fue donde se sembró el hongo y la otra tuvo uno de los medios señalados arriba. La cepa 108 no presentó actividad antifúngica en ninguno de los medios para bacterias, excepto en papa

dextrosa. En la Figura 4 y Cuadro 6 se ilustra el efecto del medio en la actividad antagónica de la cepa 108 contra *R. solani*.

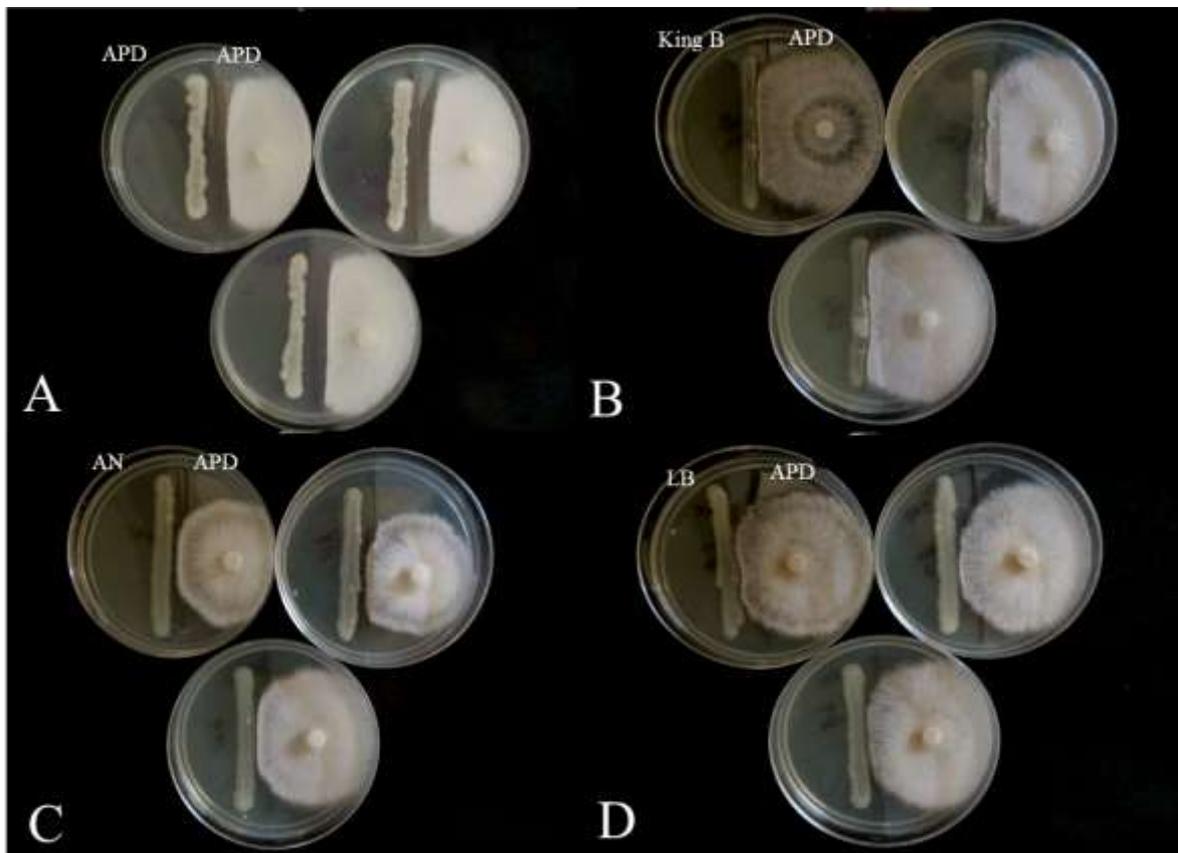


Figura 4. Efecto del medio de cultivo en la actividad antifúngica de la cepa *Ewingella americana* 108 contra *Rhizoctonia solani*. La rizobacteria se sembró en una mitad de la caja que contenía (A) APD, (B) medio de King B, (C) agar nutritivo (AN) y (D) LB. En la otra mitad de la caja que contenía APD se sembró el hongo.

Cuadro 6. Efecto del medio de cultivo en la actividad antifúngica de la rizobacteria *Ewingella americana* en el crecimiento radial de *Rhizoctonia solani*. La rizobacteria se sembró en una mitad de la caja que contenía APD, medio de King B, agar nutritivo y LB. La otra mitad de la caja contenía APD donde se sembró el hongo.

Medio	Inhibición del micelio (mm)	% de inhibición
Agar nutritivo	22.6 b	39
King B	28.2 bc	23
Luria-Bertani	24.0 b	30
Agar Papa dextrosa	12.4 a	59

Letras idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha= 0.05$).

4.4.9.- Actividad de biocontrol en planta

El filtrado de la cepa de *Ewingella americana* 108 fue el que presentó la mayor actividad antagónica contra *R. solani* en caja de Petri y el mejor medio fue caldo PD. Este filtrado se utilizó para probar su efectividad en planta para controlar al hongo fitopatógeno. El tratamiento con el filtrado bacteriano tuvo un menor número de plantas dañadas que el tratamiento con fungicida como se observa en las gráficas de la Figura 5. El análisis cuantitativo del área bajo la curva muestra diferencias estadísticas significativas ($\alpha= 0.05$) entre el tratamiento con el filtrado 108 y el fungicida, pero no con el testigo (Cuadro 7). El filtrado se aplicó una sola vez al inicio del experimento, aun así manifestó una reducción de la enfermedad en comparación con el fungicida. En el caso del fungicida también se aplicó sólo una vez por lo que tal vez eso influyó en su nula efectividad, ya que se recomienda aplicarlo por lo menos cada 7 días de acuerdo al fabricante. Probablemente el efecto del filtrado sea más elevado si este se concentra antes de aplicarse.

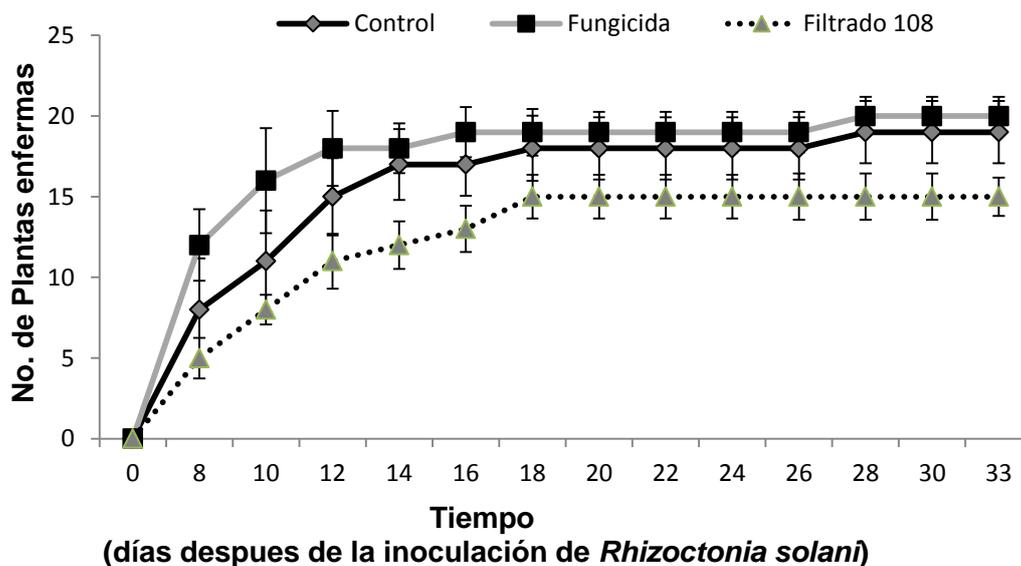


Figura 5. Efecto de la aplicación del filtrado de la cepa *Ewingella americana* (108) en el daño causado en plántulas de chile serrano inoculadas con *Rhizoctonia solani*.

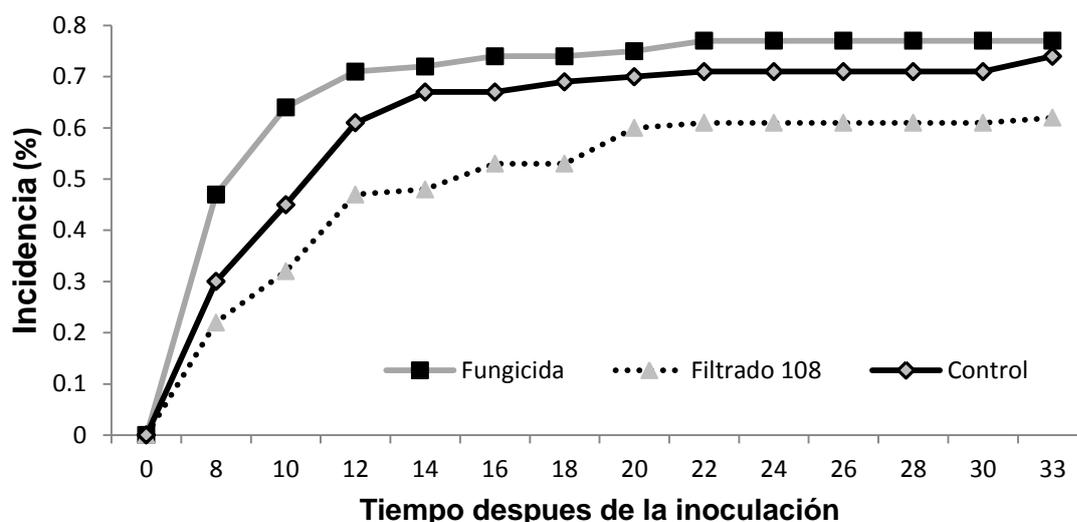


Figura 6. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) en tres tratamientos, bajo condiciones de invernadero.

Cuadro 7. Comparación de el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y de las medias del número de plantas muertas, en tres tratamientos contra *Rhizoctonia solani* en plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.).

Tratamiento	Área bajo la curva (proporción-días)	Número de plantas muertas
Control	1700.0 ab	15 b
Fungicida	2019.0 b	17 b
Filtrado 108	1429.5 a	12 a

Letras idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha= 0.05$).

4.5.- DISCUSIÓN

Las tres cepas de rizobacterias empleadas en este estudio inhibieron el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en cultivo dual (Cuadro 2). Estas cepas pueden tener un uso potencial para controlar enfermedades en cultivos agrícolas. El control biológico mediante el uso de rizobacterias está vinculado con su actividad aleloquímica, que involucra la producción de antibióticos, enzimas líticas, bioácidos, moléculas involucradas en el *Quorum sensing*, factores de virulencia y producción de sideróforos (Saraf *et al.*, 2014). Así como también involucra competencia por espacio o nutrientes e inducción de resistencia sistémica en plantas (Sulochana *et*

al., 2014). Una forma de evaluar los mecanismos involucrados en la inhibición del desarrollo de fitopatógenos, es mediante el estudio de la actividad aleloquímica de los productos obtenidos de cultivos bacterianos o bien evaluando directamente la actividad de las rizobacterias en experimentos de confrontación *in vitro*, usando diferentes medios de cultivo.

En esta investigación se realizaron varios ensayos para determinar los mecanismos de las cepas de rizobacterias para inhibir el crecimiento de *R. solani*; se demostró que la actividad antagónica de las rizobacterias no está dada por la liberación de compuestos orgánicos volátiles, ya que en el ensayo en cajas divididas (con una barrera a mitad de la caja) el hongo fitopatógeno creció atravesando la barrera de la caja al cuarto día y una vez que atravesó la división fue cuando se formó el frente de inhibición (Figura 1). En el caso de los filtrados bacterianos estos presentaron actividad aleloquímica contra el hongo fitopatógeno, lo cual nos indica que los compuestos antifúngicos se encuentran en los filtrados (Figura 2 y Cuadro 3). Sin embargo, sólo el filtrado de *Ewingella americana* 108 presentó una actividad marcada en comparación con los de *Pseudomonas tolaasii* P61 y *P. tolaasii* A46.

Se ha reportado que cepas de *Pseudomonas* se han reportado que producen diferentes antimicrobianos como: fenazina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina, cianuro de hidrógeno, pioverdina, entre otros (Coraiola *et al.*, 2006; Rokni-Zadeth *et al.*, 2012). En el caso particular de *Pseudomonas tolaasii*, esta especie causa pudriciones en hongos comestibles y se ha extraído una toxina denominada tolaasina que está asociada a la enfermedad causada por la bacteria (Cho y Kim, 2003; Sunhee *et al.*, 2011). En nuestro trabajo, probablemente la actividad antagónica de la bacteria también está asociada a la producción de este compuesto, aun cuando los filtrados tuvieron muy baja actividad antifúngica. En el caso de *Ewingella americana* es una enterobacteria causante de pudriciones en hongos comestibles (Madbouly *et al.*, 2014) y raramente se ha reportado como patógeno de seres humanos (Maraki, 2012; Li *et al.*, 2014b). Además, esta especie de bacteria fue reportada como promotora de crecimiento vegetal, productora de quitinasas y de sideróforos (Ribeiro y Cardoso, 2012; Hou y Oluranti, 2013).

Los microorganismos de la rizósfera establecen diversas interacciones y producen una gran variedad de compuestos con bioactividad cuya activación y función dependen del microorganismo, del ambiente y de la misma interacción (Cray *et al.*, 2015), por consiguiente el uso de dos o más microorganismos en co-cultivo podría ser esencial para la producción de compuestos bioactivos, semejando lo que sucede en la rizósfera (Bertrand *et al.*, 2014a). Se ha encontrado que el co-cultivo de dos microorganismos resulta en la producción de metabolitos que no están presentes en cultivos solos de uno u otro (Pettit, 2009; Bertrand *et al.*, 2014b; Dashti *et al.*, 2014). Por esta razón se estableció un ensayo donde se co-cultivó la bacteria junto con el hongo patógeno y los filtrados obtenidos fueron evaluados por su actividad antifúngica en comparación a los filtrados de cultivos bacterianos individuales. En esta investigación se observó que los filtrados provenientes de co-cultivo tuvieron menor actividad antifúngica que los filtrados de los cultivos bacterianos simples (Figura 3 y Cuadro 3).

La producción de quitinas y sideróforos son otros de los mecanismos de biocontrol que poseen las rizobacterias para suprimir el crecimiento de hongos que causan enfermedades en los cultivos (Chermin *et al.*, 1995; Kielaket *et al.*, 2013; Brzezinska *et al.*, 2014). Las tres rizobacterias consideradas en este estudio no presentaron actividad quitinolítica en medio de cultivo sólido y sólo dos de ellas (*P. tolaasii* A46 y *P. tolaasii* P61) produjeron sideróforos (Cuadro 4); lo cual sugiere que en estas dos últimas posiblemente el mecanismo responsable de la actividad antifúngica esté asociado a la producción de sideróforos. Estos compuestos que quelatan hierro, son muy diversos y sólo pueden ser sintetizados por plantas y microorganismos como bacterias y hongos. Se ha observado que cuando las rizobacterias toman el hierro del medio lo hacen no disponible para otros microorganismos, incluyendo fitopatógenos, suprimiendo así su crecimiento (Milagres *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2001; Perez-Miranda *et al.*, 2007; Louden *et al.*, 2008). En otros estudios se ha reportado producción de quitinasas en cepas de rizobacterias de *Pseudomonas* y *Ewingella americana* y la han relacionado con la actividad antifúngica de estos microorganismos (Hou y Oluranti, 2013; Swiontek *et al.*, 2014; Akocak *et al.*, 2015). En nuestro caso la prueba para quitinasas resultó negativa.

En este trabajo se estableció un ensayo con dos cepas de rizobacterias (P61 y 108) con el fin de evaluar el efecto del medio de cultivo en la actividad antifúngica de sus

filtrados. Se encontró que el filtrado obtenido de la cepa 108 crecida en caldo papa dextrosa fue el que tuvo mayor actividad (Cuadro 5). La producción de compuestos de origen bacteriano en un medio de cultivo está influenciada por varios factores como son la fuente de nutrientes (carbono, nitrógeno y sales minerales), pH, tiempo de incubación y velocidad de agitación del medio, así como algún factor de estrés o estímulo (Wang *et al.*, 2011). El conocimiento de estos factores es muy útil para potenciar la producción de compuestos con bioactividad en microorganismos de interés biotecnológico (Djinni *et al.*, 2014). El medio papa dextrosa es recomendado para el cultivo de hongos filamentosos y contiene básicamente dextrosa, papa (almidón) y agar, no es ideal para el crecimiento de bacterias que generalmente prefieren otras fuentes de carbono; sin embargo, posiblemente esta condición del medio de cultivo haya estimulado la producción de compuestos con actividad aleloquímica en *E. americana*. Este medio, después de cultivar las cepas *E. americana* 108 o *P. tolaasii* P61, se acidificó, lo que indica que hubo producción de ácidos orgánicos (Cuadro 5). No obstante, la acidificación del medio fue más marcada con la cepa 108. Diferentes estudios han demostrado que los ácidos orgánicos como láctico, acético, fenilacético y propiónico tienen un efecto en la inhibición de hongos filamentosos (Lavermicocca *et al.*, 2003; Saithong *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014a). Esto hace suponer que la inhibición de *R. solani* por el filtrado de la cepa 108 pudiera estar relacionado con la liberación de ácidos orgánicos que tienen actividad antifúngica; pero no es el caso de la cepa P61. Lo cual concuerda con evidencias que sugieren que no siempre los filtrados bacterianos presentan actividad antifúngica, aún cuando se produzcan ácidos orgánicos (Li *et al.*, 2014a).

Este mismo ensayo con los cuatro medios de cultivo se repitió sólo con la cepa 108 en cajas Petri sembrando la bacteria y el hongo en cultivo dual. Una mitad de la caja siempre tuvo como medio APD, donde se sembró el hongo, y la otra mitad tuvo uno de los medios ya señalados: donde se sembró la bacteria. Se evaluó el porcentaje de inhibición de *R. solani*. La cepa 108 en los cuatro medios utilizados inhibió el desarrollo de *R. solani*, presentando la más alta actividad antifúngica en el medio APD (Cuadro 6 y Figura 4). Esto nos confirma que la composición del medio influye en la actividad antagónica de las rizobacterias y de sus filtrados.

La aplicación de los filtrados de *Ewingella americana* en plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) disminuyó el daño causado por *R. solani* en comparación

con el fungicida y el testigo (Figura 5); este hallazgo es sobresaliente ya que sólo se hizo una aplicación al momento de establecer el experimento; además, el filtrado que se aplicó no se concentró al obtenerlo del cultivo bacteriano, lo que sugiere que los filtrados deben tener una alta actividad antifúngica. El número de plantas enfermas y muertas evaluadas después de la inoculación con *R. solani* sugiere que el tratamiento con el filtrado 108 redujo la incidencia de la enfermedad causada por este fitopatógeno en chile serrano, en comparación con los otros tratamientos. Así mismo, cuando se analiza el progreso de la enfermedad en relación al tiempo mediante la cuantificación del área bajo la curva, se demostró que el efecto del filtrado 108 es mejor al tratamiento con fungicida, no obstante el testigo no es diferente a estos dos (Cuadro 7 y Figura 6). Con el propósito de obtener mayor precisión y definición en el comportamiento de los filtrados bacterianos en relación al control de *R. solani*, se recomienda repetir este ensayo aplicando dosis concentradas y tal vez haciendo más de una aplicación del filtrado, debido que en otros estudios se ha encontrado que el efecto de los filtrados antifúngicos depende de la edad del cultivo y sobre todo de la concentración (Boukaew y Prasertsan, 2014). Algunos reportes señalan que *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* disminuyen la severidad de *R. solani* en diferentes cultivos de importancia económica, lo cual se atribuyó a la producción de HCN, sideróforos, enzimas líticas y algunos antibióticos (Pliego *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2014; Abou *et al.*, 2015). Sin embargo, no existen reportes para el caso de *E. americana*. En esta investigación se hizo especial énfasis en los filtrados de *E. americana*, ya que tienen una marcada actividad antifúngica. Además, los filtrados de *E. americana* podrían ser más valiosos que la misma bacteria, debido a que es una enterobacteria considerada en raros casos como patógena de seres humanos (Maraki, 2012; Li *et al.*, 2014b). El filtrado de esta bacteria podría tener utilidad como biopesticida; pero habría que identificar los compuestos bioactivos responsables de tal actividad antifúngica. Los microorganismos antagonistas son muy susceptibles a cambios en el ambiente y a fuentes de alimentación, al patógeno y cultivo, es decir, si se modifica algunas de estas condiciones el efecto del antagonista puede variar es por ello que es esencial tener en cuenta las condiciones ambientales para observar el efecto deseado de los microorganismos (Radja *et al.*, 2002; Saravanakumar *et al.*, 2007; Goudjal *et al.*, 2014; Madbouly *et al.*, 2014).

4.6.- CONCLUSIONES

1. Las tres cepas de bacterias probadas si mostraron actividad antifúngica contra *R. solani*.
2. La actividad antifungica de las cepas de rizobacterias es muy probable que esté relacionada con la producción de sideróforos, y otros compuestos como ácidos orgánicos.
3. *Pseudomonas tolaasii* A46, *P. tolaasii* P61 y *Ewingella americana* 108inhiben el desarrollo de *Rhizoctonia solani* en cajas Petri y su actividad antagónica no estuvo dada por la producción de compuestos volátiles.
4. El co-cultivo de las rizobacterias con el hongo fitopatógeno tendió a disminuir la actividad antifúngica de los filtrados bacterianos en comparación a los cultivos simples.
5. El filtrado de mayor actividad antagónica fue el de la cepa *E. americana* 108. Las tres cepas resultaron negativas para actividad quitinasa, pero las cepas A46 y P61 fueron positivas para sideróforos.
6. La cepa *E. americana* 108 tuvo la mayor actividad antifúngica que fue favorecida por el medio de cultivo papa dextrosa, y el cual también favoreció la actividad del filtrado de esta cepa.
7. El filtrado de la cepa 108 disminuyó la incidencia del daño en plántulas de chile serrano bajo condiciones de invernadero.
8. El filtrado de la bacteria *E. americana* podría tener potencial como biopesticida; pero habría que identificar de manera precisa los compuestos bioactivos responsables de tal actividad antifúngica. Por ello, se recomienda hacer una exploración más detallada del potencial del filtrado 108 como biopesticida para controlar enfermedades causadas por hongos fitopatógenos radicales en plantas.

4.7.- LITERATURA CITADA

- Abou-Aly H.E.,Neweigy N.A.,Zaghloul R.A.,El-Sayed, S.A.,Bahloul, A.M. 2015.Evaluation of some biocontrol agents against soil pathogenic fungi.Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6:439-448.
- Akocak P.B., Churey J.J., Worobo R.W. 2015. Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*.Food Bioscience, 10:48-58.
- Anaya-López J.L., González-Chavira M.M., Villordo-Pineda E., Rodríguez-Guerra R., Rodríguez-Martínez R., Guevara-González R.G., Guevara-Olvera L., Montero-Tavera V., Torres-Pacheco I. 2011. Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. Revista Mexicana de Ciencias Agrícola, 2:373-383.
- Baysal Ö., Tör M. 2014. Smart biologics for crop protection in agricultural systems. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38:723-731.
- Bertrand S., Azzollini A., Schumpp O., Bohni N., Schrenzel J., Monod M., Gindro K., Wolfender J.L. 2014b. Multi-well fungal co-culture for de novo metabolite-induction in time-series studies based on untargeted metabolomics. Mol Biosyst, 10:2289-98.
- Bertrand S., Bohni N., Schnee S., Schumpp O., Gindro K., Wolfender J.L. 2014a. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. Biotechnology Advances, 32:1180-1204.
- Bhutia N.D., Seth T., Shende V.D., Dutta S., Chattopadhyay A. 2015. Estimation of heterosis, dominance effect and genetic control of fresh fruit yield, quality and leaf curl disease severity traits of chilli pepper (*Capsicum annum* L.). Scientia Horticulturae, 182:47-55.
- Boukaew S., Prasertsan P. 2014. Factors affecting antifungal activity of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 against *Rhizoctonia solani*. World J Microbiol Biotechnol, 30:323-9.
- BrzezinskaS., M.,Jankiewicz, U., Burkowska A., Walczak M. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection.Current Microbiology, 68:71-81.
- Campbell C.L., Madden L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology.John Wiley and Sons. New York, p. 532.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry, 42:669-678.
- Coraiola M., Lo Cantore P., Lazzaroni S., Evidente A., Iacobellis, N.S., Dalla Serra M.2006. WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1758:1713-1722.

- Cray J.A., Houghton J.D.R., Cooke L.R., Hallsworth J.E. 2015. A simple inhibition coefficient for quantifying potency of biocontrol agents against plant-pathogenic fungi. *Biological Control*, 81:93-100.
- Chernin L., Zafar I., Shoshan H., Ilan C. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1720–1726.
- Cho K.H., Kim Y.K. 2003. Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221:221-226.
- Dashti Y., Grkovic T., Ramadan A.U., Hentschel U., Quinn R.J. 2014. Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiosis* sp. RV163. *Marine Drugs*, 12:3046-3059.
- Djinni I., Defant A., Kecha M., Mancini I. 2014. Metabolite profile of marine-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8 by liquid chromatography–mass spectrometry and evaluation of culture conditions on antibacterial activity and mycelial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 116:39-50.
- Ferrera-cerrato R., Alarcón A. 2007. Microbiología Agrícola. In: Ferrera-Cerrato R. Lara-Hernandez M.E. (Eds). *Mecanismos microbianos en el control biológico*. Trillas, primera edición, pp. 342-379.
- Goudjal Y., Omrane T., Amine Y., Nasserline S., Florence M., Abdelghani Z. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169:59-65.
- Gutterson N. 2014. Commercialization of bioagricultural products. *Biotechnology entrepreneurship: starting, managing, and leading biotech companies*, pp149-160.
- Hermosillo-Cereceres M.A., González-García J., Romero-Gómez S.J., Luján-Favela M., Hernández-Martínez A., Arévalo-Gallegos S. 2008. Relación genética de materiales experimentales de Chile tipo chilaca con variedades comerciales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14:301-307.
- Hernández V.S., López R.G., Sánchez P., Villarreal M., Parra S., Porras F., Corrales J. 2008. Variación fenotípica entre y dentro de poblaciones silvestres de Chile del noroeste de México. *Rev. Fitotec. Mex.*, 31:323-330.
- Hou M.P., Oluranti B.O. 2013. Evaluation of plant growth promoting potential of four rhizobacterial species for indigenous system. *J. Cent. South Univ.*, 20:164-171.
- Huang X., Zhang N., Yong X., Yang X., Shen Q. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167:135-143.
- Jung W.J., F. Mabood, Souleimanov A., Whyte L.G., Niederberger T.D., Smith D.L. 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51

- against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. Microbial Pathogenesis, 77:13-16.
- Kielak A.M., Mariana S.C., Alexander V.S., Søren J.S., Jan Dirk van E. 2013. Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH alteration in soil. Applied and Environmental Microbiology, 79:263-272.
- Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. 2003. Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. Applied and Environmental Microbiology, 69: 634-640.
- Li H., Zhang S., Lu J., Ulvko H., Pang X., Sun Y., Xue H., Zhao L., Kong T. Lv J. 2014a. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei*; ASTI8 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. Food Control, 43: 57-64.
- Li L., Shen J., Tao J., Xue Z. 2014b. Peritonitis caused by *Ewingella americanain* a patient with peritoneal dialysis: a case report. Journal of Medical Case Reports, 8:86.
- Louden B.C., Haarmann D., Lynne A.M. 2008. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection.
- Madbouly A.K., Elshatoury E.H., Abouzeid M.A. 2014. Etiology of stipe necrosis of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) in Egypt. Phytopathologia Mediterra, 53:124-129.
- Maraki S. 2012. Acute conjunctivitis caused by *Ewingella americana*. Journal of pediatric ophthalmology and strabismus, 49:52-54.
- Milagres A.M.F., Machuca A., Napoleão D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Methods, 37:1-6.
- Parry D.W. 1990. Diseases of potato. In: Plant pathology in agriculture. Cambridge, UK: Cambridge University Press, p 276–80.
- Pérez-Castañeda L.M, Castañón-Nájera G., Mayek-Pérez N. 2008. Diversidad morfológica de chiles (*Capsicum* spp.) en Tabasco, México. Rev. Cuad. Biodiversidad 27:11-22.
- Pérez-Miranda S., Cabirol N., George-Téllez R., Zamudio-Rivera L.S., Fernández F.J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. Journal of Microbiological Methods, 70:127-131.
- Pettit R.K. 2009. Mixed fermentation for natural product drug discovery. Applied Microbiol Biotechnol, 83:19-25.
- Pliego C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. Plant and Soil, 340:505-520.
- Pomerantz A., Cohen Y., Shufan E., Ben-Naim Y., Mordechai S., Salman A., Huleihel M. 2014. Characterization of *Phytophthora infestans* resistance to mefenoxam

using FTIR spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141:308-314.

- Radja C.R., Nandakumar R., Kandan A., Suresh S., Bharathi M., Raguchander T., Samiyappan R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*, 21:671–677.
- Ramírez J. 1996. El chile. *Conabio. Biodiversitas* 8:8-14.
- Reddy P.P. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection. ISBN:978-81-322-1972-9 (Print) 978-81-322-1973-6.
- Ribeiro C.M., Cardoso E.J.B.N. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167: 69- 78.
- Rokni-Zadeh H., Li W., Sanchez-Rodriguez A., Sinnaeve D., Rozenski J., Martins J.C., De Mot R. 2012. Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 4826-4834.
- Saithong P., Panthavee W., Boonyaratanakornkit M., Sikkhamondhol C. 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in *plaa-som*, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110:553-557.
- Saraf M., Pandya U., Thakkar A. 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens *Microbiological Research*, 169:18-29.
- Sarath B.B., Pandravada S.R., Prasada R.R.D.V.J., Anitha K., Chakrabarty S.K., Varaprasad K.S. 2011. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Protection*, 30: 389-400.
- Secor G.A., Gudmestad N.C. 1999. Managing fungal diseases of potato. *Can J Plant Pathol*, 21:213-21.
- Sulochana M.B., Jayachandra S.Y., Kumar S.K.A., Dayanand A. 2014. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Journal of Basic Microbiology*, 54: 418-424.
- Sung H.S., Yong L., Shee E.L., Nam W.Y., Joon H.R. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44:89-95.
- Sunhee L, Geunhyeong J, Doseok H, Yoonkyung W, Younggiu L, Yeonjoong Y, Kyungrai K, Jiye H, Young-Kee K, Dong-Woon K, Yoongho L. 2011. A peptide produced by *Pseudomonas tolaasi*, tolaasin binds to metal ions. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 54: 633-36.
- Swiontek M.B., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Curr Microbiol*, 68:71–81.

- Venier N.A., Colquhoun A.J., Sasaki H., Kiss A., Sugar L., Adomat H., Fleshner N.E., Klotz L.H., Venkateswaran V. 2015. Capsaicin: A novel radio-sensitizing agent for prostate cancer. *Prostate*, 75:113-125.
- Wang Y., Fang X., An F., Wang G., Zhang X. 2011. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microbial Cell Factories*, 10:98.
- Whipps J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52:487-511.

ANEXO I

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS FILTRADOS DE *Ewingella americana*

INTRODUCCIÓN

Existe una gran diversidad de microorganismos y por lo tanto son considerados como fuentes de productos naturales. Además, son vistos como fuentes potenciales en la extracción de nuevos metabolitos secundarios con importancia en las grandes industrias de cosméticos, farmacéutica, y en especial en la agricultura (Kryuchkova *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2014). En esta última, se utilizan como fertilizantes biológicos y como biopesticidas. Existe controversia en la aplicación de microorganismos vivos en el ambiente, debido a que se desconoce qué problemas podrían ocasionar a largo plazo en los habitats donde son aplicados; otro de los puntos medulares es el uso de microorganismos que pueden ser un factor de riesgo para la salud de plantas como de animales; sin embargo tienen potencial en la producción de compuestos secundarios valiosos para la sociedad (Dubuis *et al.*, 2007; Newman y Cragget *et al.*, 2012). Los microorganismos producen diferentes metabolitos que pueden tener aplicación en la medicina, la industria y la agricultura; varios compuestos microbianos se han obtenido de bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Shapiro *et al.*, 2009; Saithong *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2014b). Dentro de este grupo de microorganismos se han identificado enzimas líticas (quitinasa y glucanasas), sideróforos, antibióticos (lipopéptidos, polipéptidos, macrolactonas, policétidos, isocumarinas), y algunos ácidos orgánicos que modifican el pH del medio lo que permite la producción de otros compuestos que tienen efecto antimicrobiano (Mojid *et al.*, 2013; Bock *et al.*, 2014a; Liet *et al.*, 2014). *Ewingella americana* es una enterobacteria en forma de bacilo que raramente se ha reportado como patógeno de seres humanos, aún cuando se ha aislado de diversos especímenes clínicos como orina, fluidos y sangre, así como de otras fuentes como sistemas de riego y fuentes de agua doméstica; hay investigaciones que la relacionan como patógena de hongos comestibles y algunas otras la citan como promotora de crecimiento y productora de quitinasas (Kobayashi y Crouch, 2009; Ribiero y Cardoso, 2012). El objetivo de esta investigación es extraer los metabolitos secundarios e identificar los posibles compuestos con actividad antifúngica contra *Rizoctonia solani* de los

filtrados de *E. americana*. Para ello, se deberá seleccionar el mejor disolvente para su extracción, liofilizar para su concentración, purificar e identificar.

MATERIALES Y METODOS

Selección de diferentes solventes para la extracción del compuesto de interés

La bacteria 108, se cultivó en frascos con 50 mL de caldo nutritivo con pH ajustado, y se incubó en agitación por 72 h. En embudos de separación se colocaron 50 mL de cultivo bacteriano con 50 mL de disolvente orgánico (hexano o acetato de etilo) y se agregó sulfato de amonio, se agitó y se dejó reposar toda la noche. Las dos fases se recuperaron en matraces. Las fases orgánica e inorgánica se utilizaron para el bioensayo en pozos, se colocó 300 µL de cada fase por pozo y a las 24 h se sembró en el centro de la placa (agar papa dextrosa) un disco con *R. solani*. Se evaluó crecimiento a las 24 y 48 h. Los tratamientos consistieron en fase orgánica y acuosa de hexano con sulfato de amonio con su respectivo testigo (sin sulfato de amonio y sólo con hexano), fase orgánica y acuosa de acetato de etilo con sales con su respectivo testigo sin sales, y testigo con acetato de etilo. Se observó la formación de la zona de inhibición alrededor del pozo.

Liofilización de los filtrados

La cepa bacteriana 108, se cultivó en medio caldo papa dextrosa por 72 h en agitación a 180 rpm. Posteriormente se filtró con membranas Durapore de 0.22 µm. Se colocaron volúmenes de 10 mL de los filtrados en viales con capacidad de 150 mL. Los viales se sometieron a un proceso de liofilización (LABCONCO) por 8 h continuas. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en metanol y posteriormente se concentraron en un rotavapor; el concentrado se resuspendió en metanol y se analizó en cromatografía en capa fina.

RESULTADOS PRELIMINARES

1. Selección del solvente apropiado para la extracción de compuestos con actividad antifúngica

En este ensayo se observó que los compuestos y la bioactividad se presentaron en la fase acuosa, lo que indica que ambos disolventes no fueron adecuados para extraer los compuestos del cultivo bacteriano. En las Figuras 1 y 2, se presenta la actividad antifúngica de las fases acuosa y orgánica, donde se usó hexano (Figura 1) o acetato de etilo (Figura 2) para la extracción. El o los posibles compuestos se encontraron en la fase acuosa como se observa en ambas figuras.

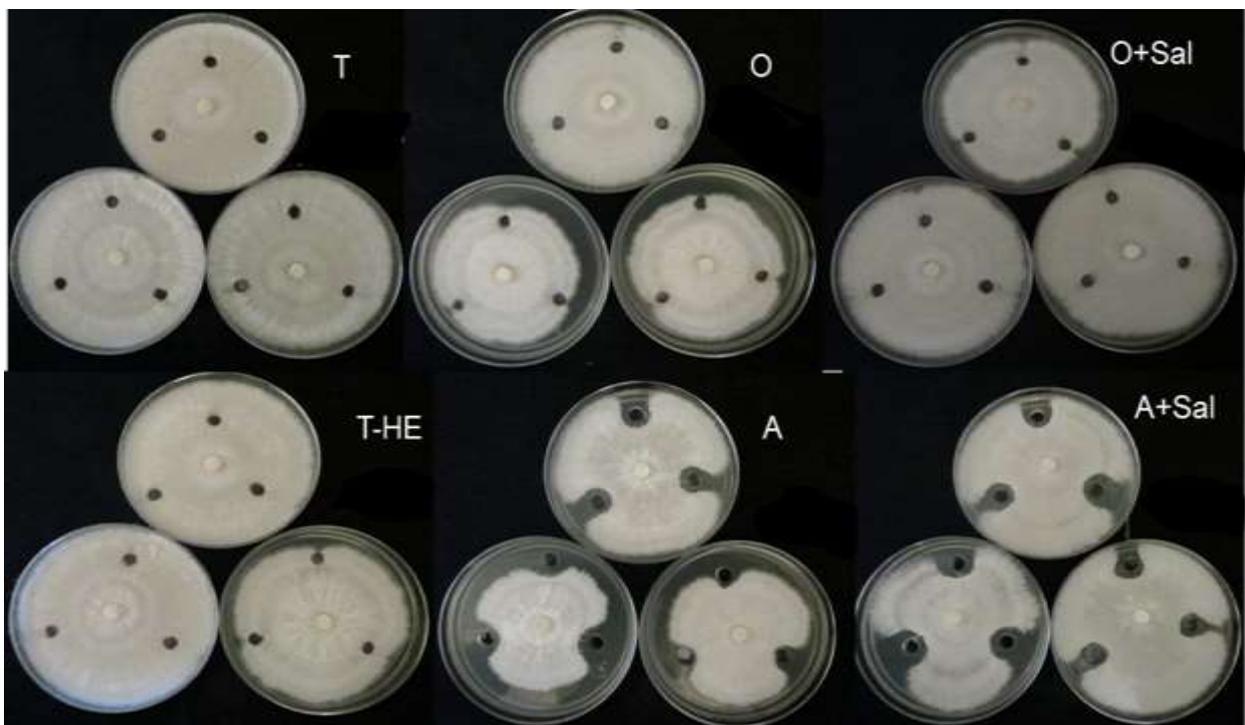


Figura 1. Extracción de compuestos bacterianos con hexano, ensayo de ambas fases orgánica (O) y acuosa (A). Donde: (T) control, (O+Sal) fase orgánica más sulfato de amonio, (T-HE) testigo con hexano y (A+SAL) fase acuosa más sulfato de amonio.

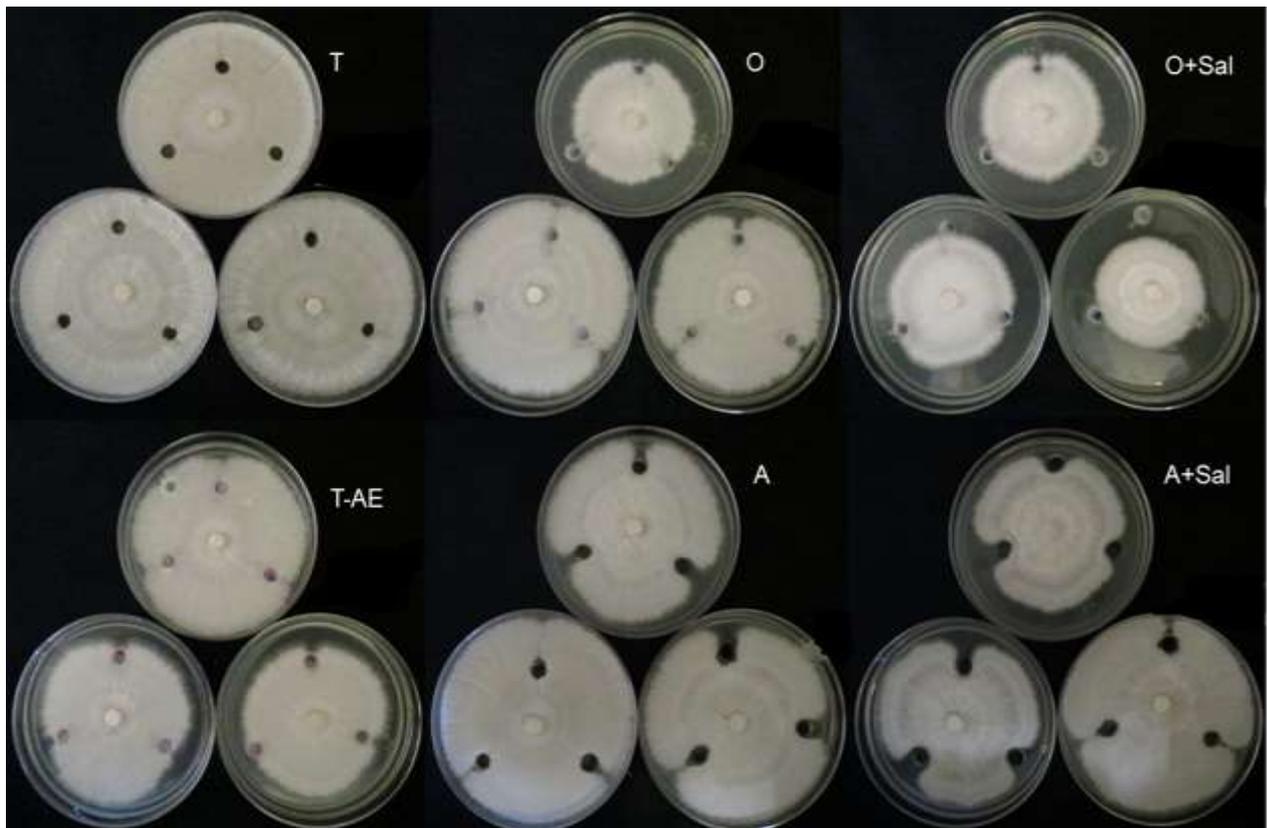


Figura 2. Extracción de compuestos con acetato de etilo, ensayo de ambas fases orgánica (O) y acuosa (A). Donde; (T) control, (O+Sal) fase orgánica más sulfato de amonio, (T-AE) testigo con acetato de etilo y (A+Sal) fase acuosa más sulfato de amonio.

2. Liofilización de los filtrados

Las muestras fueron liofilizadas para su posterior análisis y extracción de compuestos con bioactividad en cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC)(Figura 3).



Figura 3. Liofilización de los filtrados de la cepa 108 (*Ewingella americana*)

LITERATURA CITADA.

- Bock C.H., Gottwald T.R., Graham J.H. 2014a. A comparison of pathogen isolation in culture and injection-infiltration bioassay of citrus leaves for detecting *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Phytopathology*, 162:291-301.
- Bock C.H., Shapiro-Ilan D.I., Wedge D.E., Cantrell C.L. 2014b. Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab. *J. Pests*, 87:155-162.
- Dubuis C., Keel C., Haas D. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol *Pseudomonas*. *Eur J. Plant Pathol.*, 119:311-328.
- Kobayashi D.Y., Crouch J.A. 2009. Bacterial/fungal Interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts. *Annu. Rev. Phytopathol*, 47:63-82.
- Kryuchkova Y.V., Burygin G.L., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Chernyshova M.P., Makarov O.E., Fedorov E.E., Turkovskaya O.V. 2014. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological research*, 169:99-105.
- Li H., Zhang S., Lu J., Ulvko H., Pang X., Sun Y., Xue H., Zhao L., Kong T., Lv J. 2014. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei*; AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control*, 43:57-64.
- Mojid M.M.A., Shin H., Tofazzal I.M. 2013. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine drugs*, 11:2846-2872.
- Newman D.J., Cragg G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75:311-335.
- Ribeiro C.M., Cardoso E.J.B.N. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167:69-78.
- Saithong P., Panthavee W., Boonyaratanakornkit M., Sikkhamondhol C. 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasoon, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110:553-557.
- Shapiro-Ilan D.I., Reilly C.C., Hotchkiss M.W. 2009. Suppressive effects of metabolites from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* spp. on phytopathogens of peach and pecan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42:8, 715-728.
- Zeng W.L., Li W.K., Han H., Tao Y.Y., Yang L., Wang Z.T., Chen K.X. 2014. Microbial biotransformation of gentiopicoside by the endophytic fungus *Penicillium crustosum* 2T01Y01. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:184-192.