



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

EFFECTO SUPRESOR DE LA FUSARIOSIS DEL MAÍZ (*Zea mays*)  
ASOCIADO A LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS DE  
BACTERIAS RIZOSFÉRICAS PERTENECIENTES AL GÉNERO  
*Burkholderia*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

JULIO ALBERTO MOJICA MARTÍNEZ



TUTOR EXTERNO: DR. JUAN JOSÉ PEÑA CABRIALES

TUTOR INTERNO: DR. MANOJKUMAR ARTHIKALA

LEÓN, GUANAJUATO, DICIEMBRE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

EFFECTO SUPRESOR DE LA FUSARIOSIS DEL MAÍZ (*Zea mays*)  
ASOCIADO A LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS DE  
BACTERIAS RIZOSFÉRICAS PERTENECIENTES AL GÉNERO  
*Burkholderia*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

**JULIO ALBERTO MOJICA MARTÍNEZ**

TUTOR EXTERNO: DR. JUAN JOSÉ PEÑA CABRIALES

TUTOR INTERNO: DR. MANOJKUMAR ARTHIKALA

LEÓN, GUANAJUATO, DICIEMBRE 2019



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales.

Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el apoyo del estímulo económico de Asistente de Investigador Nacional SNI III, Exp. Ayte. 15315, CVU 867982.

## **Agradecimiento**

Al Dr. Juan José Peña Cabriales, por ser pieza clave en la culminación de mis estudios profesionales, al darme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en el Laboratorio de Microbiología Ambiental.

A la M. en C. Coyolxauhqui Barrera y al Dr. Sergio Hernández por su tiempo dedicado en la realización y asesoría de la presente tesis.

A Cinvestav Unidad Irapuato, por ofrecer un espacio para mi desenvolvimiento académico, profesional y personal.

A mis maestros, Dra. Kalpana Nanjareddy, Dra. Alejandra Rougon, Dr. Antonio Hernández, Dr. Julio Amezcua, Dr. Manojkumar Arthikala, con especial agradecimiento a mis coordinadores de carrera, Dra. Harumi Shimada Beltrán y Dr. Julio Vega Arreguín, por enseñarme cómo aprender de los aciertos académicos, de los errores en el laboratorio y sobre todo, por alentarme a descubrir el increíble funcionamiento de la molécula de la vida.

A mi universidad. La Universidad Nacional Autónoma de México, específicamente a la Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, por ser el escenario en el cual durante 4 años aprendí a ser un profesionista y sentí el orgullo de tener la sangre azul y la piel dorada.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental, IBQ. Luis Hernández, M. en C. Mónica Rodríguez, Yamily Rossini, Karina Ruiz y Alan Molina por apoyarme en mi aprendizaje microbiológico y algunos de ellos, les agradezco por brindarme su amistad.

Al M. en C. José Antonio Vera Núñez por brindarme consejos y opiniones acertadas en momentos oportunos.

A mis compañeros de licenciatura, Arizbeth Plascencia, Montserrat Aguilar, Cecilia Méndez, Leslie Martínez, Christian Jaén, Carlos Rodríguez e Isaac Villalobos por haberme ayudado con sus risas a sobrellevar los días más duros de carrera.

A todos mis amigos, por enseñarme en cada plática, fiesta y experiencia lo divertido de tener hermanos para compartir el camino. A mis mejores amigos, Ángela Kantún y Mario Facio, por siempre estar presentes en los momentos más difíciles, en los que me han escuchado y apoyado.

A mi familia, mi abuelo, mis tías y mis primos por enseñarme que aun en la distancia sus buenas vibras se hacen sentir en el pecho.

A las personas más importantes en mi vida: mi mamá, mi abuela y mi papá. Les agradezco por los regaños bien aplicados en momentos de terquedad, por haberme puesto el corazón que tengo y por forjar mi alma y mi espíritu con su cariño. Llevo su esencia y su DNA a donde quiera que voy.

A Dios. Porque sin Él, nada es posible.

## Dedicatoria

*A mi mamá, por inspirar mi camino con sus palabras en cada noche de largas e interminables pláticas. Por ser ese ejemplo de mujer fuerte, inteligente y bella.*

*A mi abuela, porque haber crecido con su cariño incondicional de mamá grande y con su carisma encantador, es un regalo de Dios que no cualquiera recibe.  
Te la dedico con el corazón hasta allá arriba.*

*Sin ustedes no sería hoy lo que soy.*

*Con todo mi amor y mi cariño*

*Julio*

# Índice

Índice de Tablas .....	ix
Índice de Figuras .....	x
Simbología y Abreviaturas .....	xi
<b>I. Introducción</b> .....	13
1.1 Justificación .....	15
1.2 Hipótesis.....	15
1.3 Objetivos .....	16
1.3.1 Objetivo general .....	16
Determinar el efecto de la inoculación directa en suelo de cepas del género <i>Burkholderia</i> sobre el desarrollo de la fusariosis en maíz a nivel de invernadero. ....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
<b>II. Antecedentes</b> .....	17
2.1 Producción de maíz en México y el mundo .....	17
2.2 Enfermedades que afectan la producción del maíz .....	18
2.3 Género <i>Fusarium</i> . ....	19
2.4 Mecanismo de infección de <i>Fusarium</i> spp.....	20
2.5 Mecanismo de infección de <i>Fusarium</i> spp. en maíz .....	21
2.6 Sintomatología de la fusariosis en maíz .....	22
2.7 Control tradicional de la fusariosis .....	23
2.8 Biocontrol como una alternativa contra <i>Fusarium</i> .....	24
2.9 Bacterias del género <i>Burkholderia</i> .....	25
2.10 Sideróforos.....	27
2.11 Sideróforos y biocontrol de la fusariosis .....	28
<b>III. Metodología</b> .....	30
3.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	30
3.2 Curva de calibración de Deferoxamina B (DFOM) .....	30
3.2.1 Detección y cuantificación de sideróforos.....	31
3.3 Ensayos de confrontación <i>in vitro</i> .....	31
3.4 Evaluación de la actividad supresora de las cepas bacterianas mediante ensayos de invernadero. ....	32
3.4.1 Esterilización de semillas .....	32
3.4.2 Germinación de semillas .....	33

3.4.3 Preparación de suelo y lavado de macetas .....	33
3.4.4 Inoculación de maíz quebrado .....	33
3.4.5 Preparación del inóculo de bacterias .....	34
3.4.6 Establecimiento de los ensayos en invernadero .....	34
3.4.7 Medición del índice de incidencia-severidad de la fusariosis .....	36
3.5 Establecimiento de los ensayos en invernadero adicionando Fe al suelo.....	37
3.6 Conteo en placa de células viables por dilución .....	37
3.6.1 Aislados bacterianos candidatos.....	38
3.7 Extracción de DNA genómico de bacterias.....	40
3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S .....	41
3.9 Análisis estadísticos .....	42
<b>IV. Resultados</b> .....	<b>43</b>
4.1 Producción de sideróforos de las cepas bacterianas.....	43
4.1.1 Curva de calibración.....	43
4.1.2 Cuantificación de la producción de sideróforos .....	44
4.2 Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> .....	44
4.3 Efecto de la inoculación de <i>B. cenocepacia</i> MSR2 y <i>P. soli</i> FB-2Ma17 en el desarrollo de la planta y la producción de biomasa. ....	46
4.3.1 Efecto de la inoculación de suelo con <i>B. cenocepacia</i> MSR2 y <i>P. soli</i> FB-2Ma17 sobre el progreso de la fusariosis en plantas de maíz .....	48
4.5 Sobrevivencia de bacterias a los ensayos en invernadero .....	51
4.5.1 Recuento en placa por dilución de bacterias en suelo .....	51
4.5.2 Re-aislamiento de bacterias productoras de sideróforos a partir del suelo de los diferentes tratamientos. ....	53
4.6 Identificación molecular de los aislados.....	55
4.6.1 Concentraciones de DNA de los aislados .....	55
4.6.2 PCR de los aislados.....	56
<b>V. Discusión</b> .....	<b>57</b>
<b>VI. Conclusiones</b> .....	<b>61</b>
<b>VII. Bibliografía</b> .....	<b>62</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>70</b>
Anexo I.....	70

## Índice de Tablas

**Tabla I.** Longitud radicular, longitud aérea, peso fresco radicular, peso fresco aéreo, peso seco radicular y peso seco aéreo plantas de maíz expuestas a diversos tratamientos bajo condiciones de invernadero a los 28 ddt. ....41

**Tabla II.** Altura promedio de plantas de maíz sometidas a diversos tratamientos en suelo adicionado con Fe bajo condiciones de invernadero.....51

**Tabla III.** Conteo en placa por dilución de bacterias del suelo provenientes de experimentos de invernadero sin Fe.....52

**Tabla IV.** Aislados candidatos obtenidos del suelo de los experimentos en invernadero.....54

**Tabla V.** Concentraciones de las extracciones de DNA obtenidas de los aislados bacterianos.....55

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Principales estados productores de maíz grano en México.....	17
<b>Figura 2.</b> Rutas infectivas de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Fusariosis en raíces de maíz comparado con raíces de una planta sana.....	23
<b>Figura 4.</b> Distribución de los tratamientos establecidos en los ensayos de invernadero.....	36
<b>Figura 5.</b> Diagrama del re-aislamiento de las bacterias candidatas.....	39
<b>Figura 6.</b> Curva de calibración de Deferoxamina B.....	43
<b>Figura 7.</b> Producción de sideróforos ( $\mu\text{M}$ UDFOM) de bacterias <i>Burkholderia</i> .....	44
<b>Figura 8.</b> Inhibición in vitro del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> ATTC 62941 por bacterias <i>Burkholderia</i> .....	45
<b>Figura 9.</b> Evaluación en el tiempo del crecimiento de las plantas de maíz sometidas a diferentes tratamientos.....	46
<b>Figura 10.</b> Índice de incidencia-severidad de la fusariosis en plantas de maíz bajo condiciones de invernadero.....	48
<b>Figura 11.</b> Evaluación del progreso de la fusariosis en plantas de maíz a los 22 ddt.....	49
<b>Figura 12.</b> Área bajo la curva del progreso de la fusariosis en los tratamientos de invernadero.....	50
<b>Figura 13.</b> Placas de medio CAS agar utilizadas para el conteo en placa por dilución de bacterias del suelo (SNI y SI) utilizado en los tratamientos de invernadero.....	52
<b>Figura 14.</b> Amplificación del gen 16S en aislados obtenidos del suelo de los experimentos en invernadero.....	56

## Simbología y Abreviaturas

<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>Abs ref</b>	Absorbancia de referencia
<b>atm</b>	Atmósfera
<b>Bcc</b>	Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>
<b>CAS</b>	Cromo Azurol Sulfonato
<b>cm</b>	Centímetro
<b>ddt</b>	Días después del trasplante
<b>DFOMeq</b>	Equivalente a Deferoxamina B
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Agua destilada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Fe</b>	Hierro
<b>g</b>	Gramo
<b>g/L</b>	Gramo/Litro
<b>h</b>	Hora
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>Long.</b>	Longitud
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minuto
<b>mg/mL</b>	Miligramo/Mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normalidad

<b>ng/μL</b>	Nanogramo/Microlitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>N/P</b>	No produce sideróforos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pH</b>	Potencial Hidrógeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>s</b>	Segundo
<b>SI</b>	Suelo Infestado
<b>SNI</b>	Suelo No Infestado
<b>SLC</b>	Sobrenadante libre de células
<b>spp.</b>	Todas las especies individuales dentro de un género
<b>sp.</b>	Una especie concreta dentro de un género
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UFC/g</b>	Unidades formadoras de colonias/gramo
<b>V</b>	Volts
<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>° C</b>	Grados Celsius
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

## I. Introducción

Dentro de los hongos del género *Fusarium*, se encuentran muchos patógenos de plantas de importancia agrícola, de cultivos ornamentales y sistemas naturales. Las diferentes especies de *Fusarium* en conjunto ocasionan enfermedades caracterizadas por marchitez, tizones y pudriciones radiculares. El tratamiento tradicional para combatir las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos consiste en la aplicación de agroquímicos, los cuales a pesar de su efectividad, también representan un posible riesgo para la salud y el medio ambiente, debido principalmente a su acumulación en sistemas biológicos y la persistencia de algunos de sus componentes (Villa-Martínez et al., 2014).

En este sentido, una alternativa al uso de agroquímicos consiste en el empleo de bacterias benéficas con capacidad antagónica para el crecimiento de hongos fitopatógenos. Al respecto, se ha reportado la utilización de la cepa *Burkholderia cepacia* MCI 7 como revestimiento de semillas de maíz, observando un efecto positivo en el crecimiento de las plantas inoculadas con la misma, creciendo en suelos infestados por *Fusarium moniliforme* (Bevivino, Dalmastrì, Tabacchioni, & Chiarini, 2000). En México, se han realizado estudios donde se evalúa el potencial de cepas aisladas de la rizosfera de maíz para controlar el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, encontrando resultados positivos al recubrir las semillas de maíz con bacterias del género *Bacillus* (Maldonado-Mendoza, Cordero-Ramírez, & Figueroa-López, 2010). Sin embargo, no hay estudios que realicen una inoculación directa de bacterias en el suelo para controlar el crecimiento de *Fusarium*.

En el laboratorio de Microbiología Ambiental de Cinvestav Unidad Irapuato, se realizaron investigaciones dentro del proyecto de investigación “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz (SEP-CONACyT-2012-179319)”, del cual se aislaron diferentes cepas bacterianas con distintas características, prevaleciendo aquellas del género *Burkholderia*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de bacterias del género *Burkholderia* en la supresión de fusariosis en maíz, mediante la inoculación directa en suelo infestado con *Fusarium oxysporum* ATTC 62941.

## **1.1 Justificación**

Debido a la importancia agrícola de *Zea mays* L. a nivel mundial como una de las principales fuentes de alimentación y la gran incidencia de enfermedades fúngicas relacionados al género *Fusarium*, es necesario ahondar el conocimiento científico para conocer otras alternativas que no impliquen el uso de fungicidas para el combate de estas enfermedades. En este sentido, se han probado varias técnicas para controlar la fusariosis en maíz, como por ejemplo mediante el revestimiento de las semillas con microorganismos o la aplicación de aceites esenciales. Sin embargo, no existen estudios que realicen una inoculación directa en el suelo de bacterias del género *Burkholderia* para controlar el crecimiento de *Fusarium* spp. en plantas de maíz.

## **1.2 Hipótesis**

La inoculación directa en suelo de bacterias del género *Burkholderia* con actividad antagónica relacionada a sideróforos suprime los síntomas de la fusariosis en maíz.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la inoculación directa en suelo de cepas del género *Burkholderia* sobre el desarrollo de la fusariosis en maíz a nivel de invernadero.

### 1.3.2 Objetivos específicos

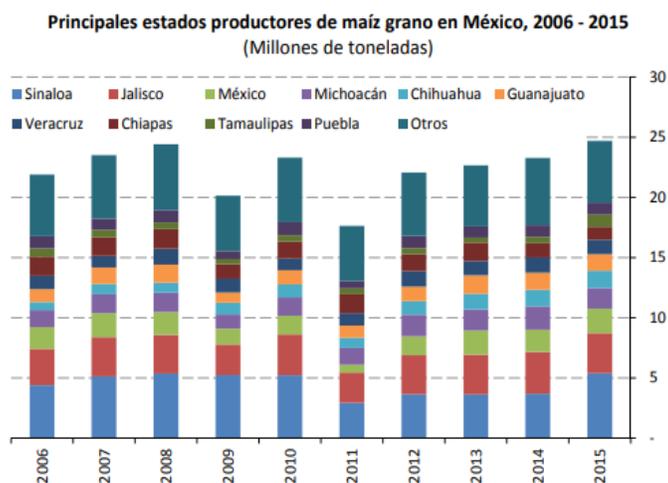
- a) Seleccionar mediante ensayos de confrontación *in vitro* bacterias del género *Burkholderia* productoras de sideróforos con actividad antagónica al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* ATTC 62941.
- b) Evaluar el efecto antagónico de bacterias del género *Burkholderia* productoras de sideróforos en el desarrollo de fusariosis en plantas de maíz utilizando microcosmos de suelo.
- c) Monitorear la sobrevivencia de las poblaciones bacterianas añadidas a los microcosmos de suelo mediante técnicas microbiológicas y moleculares.

## II. Antecedentes

### 2.1 Producción de maíz en México y el mundo

El maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays* L., es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas o Poaceae, la cual fue domesticada por las antiguas civilizaciones mesoamericanas hace más de 10,000 años (Beadle, 1939). Tiene una gran versatilidad de crecimiento en diferentes tipos de clima, desarrollándose en áreas tan lluviosas que alcanzan los 5000 mm de lluvias hasta en zonas áridas. Además, existen variedades adaptadas a crecer en regiones montañosas y en distintas altitudes. Por ello y otras características, es uno de los cultivos de mayor producción mundial, siendo inclusive el cereal más cultivado en el mundo (Chaudhary, Kumar, & Singh, 2014).

La producción mundial de maíz para el ciclo comercial 2016/17 fue de alrededor de 1,025 millones de toneladas, de las cuales México participó con alrededor de 26.7 millones de toneladas (FIRA, 2016). Esta producción de maíz representó 18% del valor total del sector agrícola nacional (Venegas-García, 2016). Dentro de los



**Figura. 1. Principales estados productores de maíz grano en México.** Fuente: SIAP-SAGARPA 2016.

estados de la república productores de maíz, Sinaloa se destaca como el productor principal de este cereal, alcanzando 21.8 % de la producción total (FIRA, 2016). Esta producción puede ser mermada por distintos factores, entre los que destacan las enfermedades.

## **2.2 Enfermedades que afectan la producción del maíz**

Como cualquier otro cultivo, el maíz es susceptible de padecer enfermedades originadas por factores bióticos y abióticos; no obstante, destacan aquellas enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos. Dentro de ellas, las enfermedades que más pérdidas económicas ocasionan son las pudriciones de la mazorca (Hernández-Juárez et al., 2016), raíz y tallo, llamadas también fusariosis debido a que son causadas por *Fusarium* sp. (Maldonado-Mendoza et al., 2010). Este patógeno tiene la capacidad de colonizar los tejidos de la planta en cualquier etapa del cultivo, debido a que sobrevive en forma de micelio o esporas tanto en el suelo como en residuos vegetales durante largos periodos de tiempo (Hernández-Juárez et al., 2016; Villa-Martínez et al., 2014).

La fusariosis en maíz constituye una de las enfermedades que mayores pérdidas representa a los productores. Los daños generados por lo regular causan pérdidas económicas importantes (De la Torre-Hernández, Sánchez-Rangel, Galeana-Sánchez, & Plasencia-de la Parra, 2014). Éstas llegan a ser catastróficas si no se aplican preventivos o no se realizan labores culturales pertinentes, teniendo mermas que ascienden desde un 60% hasta un 100% de la superficie cultivada, cuando las condiciones ambientales son óptimas para el crecimiento del hongo (Figuroa-Rivera et al., 2010).

Las causas por las cuales la presencia y la incidencia de fusariosis en los maizales se ha visto incrementada en los últimos años son diversas, destacándose el efecto de precipitaciones tempranas en la formación de la espiga hasta la cosecha (CIMMYT, 1997) así como el monocultivo (Coca-Morante, 2011). Además, un tercer factor involucrado es el daño mecánico ocasionado por insectos como el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* y gusano elotero *Helicoverpa zea*, los cuales diseminan la enfermedad mediante las esporas producidas por *Fusarium* spp. adheridas a sus cuerpos (Hernández-Juárez et al., 2016; Paliwal, Granados, Lafitte, & Violic, 2001).

### **2.3 Género *Fusarium*.**

Los hongos del género *Fusarium* son ascomicetos filamentosos constituidos por una gran diversidad de especies, las cuales se caracterizan por tener un micelio bien desarrollado, hifas septadas y conidióforos cortos (Sumalan, Alexa, & Poiana, 2013). Se considera un género fúngico cosmopolita, debido a que la gran diversidad de especies que lo componen están ampliamente distribuidas en todo el mundo, tanto en suelos de regiones de clima templado como tropicales, degradando la materia orgánica (Bullerman, 2003).

La taxonomía de *Fusarium* fue descrita por primera vez en 1803 por Link, siendo motivo de discusión frecuente (Tapia & Amaro, 2014). Wollenweber & Reinking (1935) propusieron una clasificación más clara del género, identificando 65 especies agrupadas en 16 secciones, cada una compartiendo características comunes (De la Torre-Hernández et al., 2014).

Muchas especies dentro del género son consideradas fitopatógenas al causar un sinnúmero de enfermedades en distintos cultivos, caracterizadas por las pudriciones de la raíz, del tallo y marchitamientos (Bullerman, 2003).

*Fusarium* se disemina tanto a distancias cortas, por medio de equipos agrícolas y herramientas infestadas así como por el agua; pero también, es capaz de diseminarse a distancias largas a través de plantas enfermas o suelo adherido a ellas. Si el suelo está infestado por este hongo fitopatógeno, permanecerá así de manera indefinida (Dixon & Tilston, 2010; Vásquez-Ramírez & Castaño-Zapata, 2017).

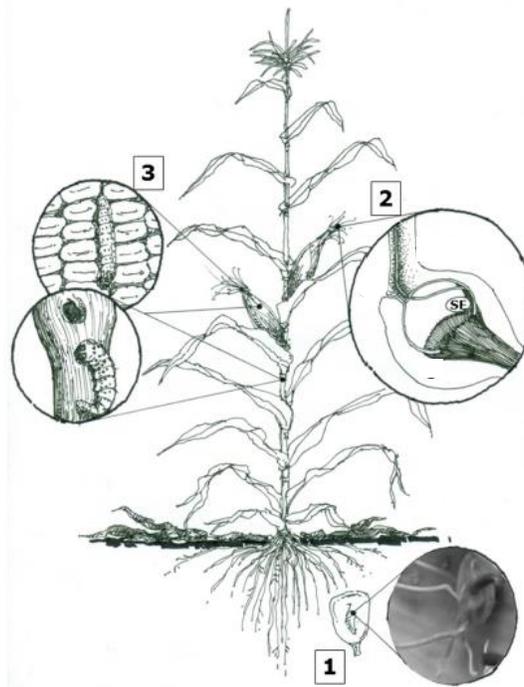
#### **2.4 Mecanismo de infección de *Fusarium* spp.**

En un panorama general, cuando una planta sana crece en un suelo infestado por *Fusarium*, los conidios del hongo comienzan a germinar al contacto con las raíces, y de esta manera, el tubo germinativo de la espora o del micelio penetra por el ápice radicular por vía de algunas heridas u otros puntos donde se están formando las raíces laterales (Vásquez-Ramírez & Castaño-Zapata, 2017). Una vez dentro, el micelio avanza intercelularmente por el córtex de las raíces, entrando por los vasos del xilema. El micelio permanece en los vasos moviéndose a través de ellos de un lugar a otro, primordialmente, hacia arriba, hacia el tallo y hacia la corona de la planta (Agrios, 2005).

## 2.5 Mecanismo de infección de *Fusarium spp.* en maíz

Las especies de *Fusarium* que más daños ocasionan en maíz de grano son *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y *F. subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas, las cuales pertenecen a la sección Liseola (Riley, Norred, & Bacon, 1993). La especie *F. verticillioides* es endémica del maíz y causa putrefacción de tallo, raíz y mazorca en diferentes etapas vegetativas (Gallardo-Reyes et al., 2006).

Si la infección comienza en el establecimiento de la plántula, *F. verticillioides* penetra directamente el pericarpio así como las células epidérmicas de la raíz al tercer día después de la siembra. Aunque las hifas llegan hasta el córtex, la colonización de las zonas vasculares es poco usual (Murillo, Cavallarin, & San Segundo, 1999). A los 25 ó 30 días después de la siembra, las raíces y el mesocotilo



**Figura. 2. Rutas infectivas de *Fusarium verticillioides*.** 1. Infección de las plántulas por la posición estratégica del hongo en el suelo. 2. Infección a través del estigma. 3. Infección del hongo por heridas de insectos. \*Modificado de De la Torre-Hernández et al., 2014.

ya están colonizados, mostrando síntomas a distintos niveles dependiendo de factores ambientales y de la cantidad de inóculo (De la Torre-Hernández et al., 2014).

Ahora bien, cuando la fusariosis se observa en la mazorca, es debido a que *F. verticillioides* llegó por medio del aire y/o el agua en forma de conidias y se depositó en el estigma (De la Torre-Hernández et al., 2014). En este punto, la diseminación continúa por la intervención del gusano elotero, los trips y otros insectos (Gilbertson, Brown, Ruppel, & Capinera, 1986; Munkvold & Desjardins, 1997).

## **2.6 Sintomatología de la fusariosis en maíz**

En las plántulas de maíz, los síntomas iniciales de la fusariosis incluyen lesiones en la raíz seminal. Conforme las plantas maduran, las lesiones en las raíces secundarias se van agrandando, afectando a las raíces principales (Soonthornpoch, Trevathan, & Ingram, 2000). Así, en una etapa avanzada de la infección, las raíces se observan de color café oscuro a negro, en estado de descomposición o completamente podridas. La fusariosis también es observable en la corona de la planta, al ponerse de color café canela, cuando en condiciones saludables es de color blanco-verde (Munkvold, 2002).

Como *Fusarium* ocasiona una obstrucción de los haces vasculares, dificulta el transporte de agua y nutrientes desde el suelo hacia la parte superior, dando por consecuencia un retraso del crecimiento, hojas amarillentas (O' Donnell & Nirenberg, 1998) y marchitamiento, lo que repercute en pérdidas en el potencial del rendimiento e incluso la muerte (Munkvold, 2002).



**Figura. 3. Fusariosis en raíces de maíz (lado derecho) comparado con raíces de una planta sana (lado izquierdo).** Coca-Morante, 2011.

La pudrición de la espiga por *F. verticillioides* presenta síntomas característicos en los granos y regiones de la espiga dañados mecánicamente por insectos u otros factores, en los cuales crece un moho algodonoso color blanco-rosado; en los granos no dañados solo se observa una coloración rosada aunque muchas veces no hay síntomas distinguibles (Programa de maíz del CIMMYT, 2004).

### **2.7 Control tradicional de la fusariosis**

El control de *Fusarium* es difícil debido a la persistencia de este hongo fitopatógeno en el suelo (Liu, Kloepper, & Tuzun, 1995). Las medidas preventivas que se pueden tomar para controlarlo son la rotación de cultivos, utilizar variedades híbridas de maíz resistentes a *Fusarium* sp. (Sepúlveda R, 2016) y tratar las semillas con fungicida previo a la siembra (Munkvold, 2002).

La combinación de prácticas culturales y medidas provisorias no es suficiente, por lo cual la fusariosis es tratada principalmente mediante el uso de fungicidas y agroquímicos comerciales (Parra-González, Centeno-Briceño, & Araque-Calderón, 2009). Los fungicidas sistémicos más utilizados para combatir la fusariosis son los

benzimidazoles; en este grupo se incluyen distintos compuestos como el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato (Villa-Martínez et al., 2014).

No obstante, el uso excesivo y desmedido de éstos representa riesgos para la salud y el medio ambiente, debido a que algunos agroquímicos son agentes mutagénicos de las plantas y también incrementan la resistencia de los patógenos (Agrios, 2005). Por ello, se han buscado nuevas opciones que solucionen estos problemas emergentes, como el uso de aceites esenciales (Abdel-Kader, El-Mougy, & Lashin, 2011) o antagonistas biológicos (Arbeláez-Torres, 2000).

### **2.8 Biocontrol como una alternativa contra *Fusarium***

En décadas recientes, ha tomado mayor relevancia en el mundo científico hacer investigaciones enfocadas en evitar los problemas ocasionados por el uso de pesticidas químicos, mediante el desarrollo de nuevas prácticas. En este caso, la utilización de microorganismos como posibles reemplazantes de los químicos agrícolas convencionales, ha surgido como una opción para controlar un amplio rango de enfermedades en las plantas (Parra-González et al., 2009).

Los mecanismos por los cuales microorganismos benéficos tienen actividad de biocontrol de la fusariosis son complejos (Mahdy, Sagitov, & Ahmed, 2011). Se ha demostrado que los mecanismos que ejercen acción antifúngica son la competencia por nutrientes, como el Fe; la producción de sustancias químicas de origen lipoprotéico, polipéptidos, bacteriocinas y alcaloides (Parra-González et al., 2009).

Entre los microorganismos prometedores para el biocontrol de fitopatógenos, las bacterias *Pseudomonas* del grupo fluorescente se consideran una opción por su probada actividad antagónica (Santoyo, Valencia-Cantero, Orozco-Mosqueda,

Peña-Cabriales, & Farías-Rodríguez, 2009). Para el caso del control biológico contra *Fusarium*, se ha propuesto utilizar al hongo *Trichoderma* sp. y bacterias como *Bacillus* sp., siendo ambos efectivos en el tratamiento contra la fusariosis vascular del garbanzo (Oliva-Ortiz et al., 2017). Para el maíz y el control de *F. verticillioides*, se han utilizado bacterias del género *Bacillus*, específicamente *Bacillus amyloliquefaciens* (Pereira, Nesci, & Etcheverry, 2007) así como bacterias del género *Burkholderia*, *Burkholderia cepacia* MCI 7 (Bevivino et al., 2000) y *Burkholderia cepacia* (Hernández, Rives, Caballero, Hernández, & Heydrich, 2004), teniendo un efecto positivo en la inhibición del hongo.

### **2.9 Bacterias del género *Burkholderia***

El género *Burkholderia*, perteneciente a la Familia *Burkholderiaceae*, son una clase de bacterias Gram negativas que fue definido por vez primera por Yabuuchi et al., 1992 cuando se intentaba reubicar a algunas clases de *Pseudomonas* de rRNA del grupo II. Al principio, el nuevo género sólo consistía de siete especies, pero ha ido incrementando hasta llegar a casi cien por la inclusión de nuevas especies, muchas de ellas definidas por tener un gran potencial biotecnológico (Eberl & Vandamme, 2016). El género *Burkholderia* se encuentra dividido en dos grupos mayores filogenéticamente distantes (Eberl & Vandamme, 2016). El primer grupo se encuentra constituido por especies que generalmente son patógenas oportunistas de humanos inmunocomprometidos, llamadas complejo *Burkholderia cepacia* (*Bcc*). El otro grupo está conformado por especies no patógenas con habilidades para la promoción del crecimiento vegetal y la rizorremediación (Bolívar-Anillo, Contreras-

Zentella, & Teherán-Sierra, 2016), que generalmente se encuentran en el ambiente (Eberl & Vandamme, 2016).

Las bacterias *Burkholderia* encontradas en el ambiente, tienen una ventaja competitiva en suelos ácidos, característica que les permite a algunas cepas crear lazos endosimbióticos con hongos, como es el caso de *Burkholderia rhizoxinica* con el hongo *Rhizopus microsporus* (Moebius, Üzümlü, Dijksterhuis, Lackner, & Hertweck, 2014; Partida-Martinez & Hertweck, 2005). Por otro lado, existen otras cepas de vida libre que son colonizadoras de plantas, las cuales desempeñan distintas funciones tales como nodulación o simbiosis obligada en hojas de sus huéspedes, tal es el caso de *Burkholderia phytofirmans* PsJN (Eberl & Vandamme, 2016).

Aunque se mencionó que el complejo *Burkholderia cepacia* (Bcc) está constituido por patógenos oportunistas en seres humanos (Bolívar-Anillo et al., 2016), algunos integrantes son también patógenos de plantas (Burkholder, 1950). Sin embargo, existen otras especies benéficas que se encuentran en la rizosfera de varios cultivos, ejerciendo un papel positivo para éstos (Ho & Huang, 2015).

El predominio del género en la rizosfera, en muchos casos asociado a las gramíneas, probablemente se deba a una serie de rasgos fisiológicos y genéticos que les confieren supervivencia saprófita competitiva y que contribuyen a la colonización de las raíces (Parke & Gurian-Sherman, 2001). Esto les permite jugar roles importantes en la fijación de nitrógeno y la promoción del crecimiento de plantas (Bolívar-Anillo et al., 2016; Ho & Huang, 2015) al producir reguladores del crecimiento y fitohormonas (Hernández et al., 2004). Además, algo destacable, es

que mediante mecanismos de producción de sideróforos, se ha reportado que intervienen en el biocontrol de patógenos, como *Phytophthora infestans*, *Phytium* y *Fusarium* sp. (Hernández et al., 2004).

### **2.10 Sideróforos**

Los sideróforos son pequeñas moléculas peptídicas de peso molecular estimado entre 200 a 2000 Da, los cuales tienen una gran afinidad por el Fe, específicamente por el ion férrico o  $Fe^{3+}$  (Vala, Dave, & Dube, 2006). La palabra “sideróforo” proviene del griego *Sidero phoro* que significa “transportador de hierro”; es llamado así debido a las siguientes características: a) su producción durante periodos de baja disponibilidad de Fe; b) la facilidad de tomar los metales por parte de los microorganismos (Saraf, Pandya, & Thakkar, 2014).

Los primeros estudios sobre sideróforos surgieron a mediados del siglo XX por Joseph B. Neilands, quien en 1952 publicó un reporte donde caracteriza “pigmentos orgánicos unidos a hierro”, aislados del hongo *Ustilago sphaerogena*, los cuales denominó ferricromos (Neilands, 1952).

Existen varios tipos de sideróforos dependiendo de sus características químicas, clasificándose en tres categorías diferentes: 1) catecolatos o fenolatos; 2) hidroxamatos o hidroxicarboxilatos, y 3) grupos mixtos (Saha, Saha, Donofrio, & Bestervelt, 2013).

Alrededor de 500 tipos de sideróforos han sido descritos en la literatura científica, siendo la mayoría producidos por bacterias (Ahmed & Holmström, 2014). Los

sideróforos bacterianos son bastante diversos, entre los cuales dominan aquellos del tipo hidroxamato (Essén, Bylund, Holmström, Moberg, & Lundström, 2006).

Cuando las bacterias se desarrollan en un medio carente de Fe, producen sideróforos para poder quelatarlo y volverlo biodisponible (Saraf et al., 2014). Una vez que los sideróforos ya formaron un complejo estable con Fe, son absorbidos por las células a través de transportadores o por reductasas membranales (Miethke & Marahiel, 2007). Las bacterias tienen en su membrana receptores específicos para reconocer los sideróforos que absorben de manera activa al citoplasma, dentro del cual el Fe es reducido o los ligandos del complejo son degradados (Matsumoto, Ozawa, Jitsukawa, & Masuda, 2004).

Distintos tipos de bacterias producen sideróforos destacando *Pseudomonas fluorescens* que produce pioverdinas, así como especies de los géneros *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*. En este sentido, se pueden incluir sideróforos con componentes lipopeptídicos producidos por algunos géneros de *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Burkholderia*. Se ha demostrado que *Burkholderia cepacia* produce pioquelina (Sokol, 1986), cepabactina (Meyer, Hohnadel, & Halle, 1989) y ornibactina (Meyer, Van, Stintzi, Berge, & Winkelmann, 1995).

### **2.11 Sideróforos y biocontrol de la fusariosis**

Existen varios estudios en los cuales se ha asociado la producción de sideróforos bacterianos con la supresión de la fusariosis. Scher & Baker, 1982 reportaron en experimentos de invernadero a corto plazo, la supresión del marchitamiento por *Fusarium oxysporum* f. sp. *microconidia lini* en plantas de lino, pepino y rábano al

añadir *Pseudomonas putida*, productora de sideróforos. Explicaron que el mecanismo responsable de la supresión fue la competencia por Fe, pues al parecer es necesario para el alargamiento del tubo germinal (Scher & Baker, 1982).

En otro estudio, la inhibición de la germinación de las clamidosporas de *Fusarium* spp. en el suelo también fue relacionada con la producción de sideróforos de *Pseudomonas* fluorescentes (Elad & Baker, 1985). En ambos estudios al añadir Fe al sistema, no se observó la inhibición del crecimiento.

Basado en lo discutido anteriormente, retomando la importancia agrícola que tiene *Zea mays* L. a nivel mundial y la dificultad de controlar a *Fusarium* en las cosechas, sobre todo por su resistencia y permanencia en las tierras de cultivo, es urgente investigar nuevas estrategias que involucren la implementación de biopesticidas eficientes para el control de esta enfermedad (Raza et al., 2016).

En el presente estudio se propone una alternativa de manejo de la fusariosis en maíz utilizando como agente de biocontrol *Burkholderia cenocepacia* MSR2.

### **III. Metodología**

#### **3.1 Cepas bacterianas utilizadas**

El presente estudio forma parte de la tesis de doctorado “Significancia agronómica del género *Burkholderia* como agente supresor de patógenos del suelo en el cultivo de maíz” de la M. en C. Guadalupe Coyolxauhqui Barrera Galicia. Para el presente trabajo, se utilizaron cuatro cepas bacterianas pertenecientes al género *Burkholderia* (*Burkholderia cenocepacia* MSR2, *Burkholderia graminis* Fcv2, *Paraburkholderia caledonica*, Fcv14 y *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17), las cuales forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental de Cinvestav, Unidad Irapuato. Se mantuvieron activas realizando resiembras constantes en caldo nutritivo (agitación constante de 100 rpm a 28° C) y agar nutritivo (28° C).

#### **3.2 Curva de calibración de Deferoxamina B (DFOM)**

La producción de sideróforos se realizó mediante el ensayo espectrofotométrico de CAS líquido, realizado de acuerdo a lo reportado por Alexander & Zuberer, 1991. A partir de una concentración inicial de 6.09 mM de DFOM se hicieron las siguientes diluciones: 3.045 mM, 1.522 mM, 0.761 mM, 0.380 mM, 0.190 mM, 0.095 mM, 0.047 mM, 0.023 mM, 0.011 mM, 0.005 mM, 0.002 mM, 0.001 mM, a las cuales se agregaron 500 µL de solución CAS líquida y 10 µL de ácido sulfosalicílico 0.2 M. Luego en una placa de ELISA se colocaron 100 µL de cada una de las diluciones para después leer las reacciones en un lector de microplacas, a una absorbancia de 630 nm.

### **3.2.1 Detección y cuantificación de sideróforos**

Utilizando la técnica de Cromo Azurol Sulfonato (CAS) líquida (**Anexo I**), se determinó la cantidad de sideróforos producidos por las bacterias seleccionadas. Primeramente, se incubó 1 mL de caldo nutritivo de cada bacteria en 100 mL de medio mínimo M9 (**Anexo I**) durante 48 h, con una agitación constante de 100 rpm a 28° C. Tanto a las 24 h como 48 h se tomaron alícuotas de 1000 µL para la cuantificación de los sideróforos, centrifugando en tubos de microcentrífuga a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante libre de células (SLC) fue filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm.

La cuantificación se realizó agregando en tubos de microcentrífuga 250 µL de la solución CAS líquida, 250 µL del SLC de las diferentes bacterias, haciendo diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 en los casos necesarios y por último, añadiendo 5 µL de ácido sulfosalicílico 0.2 M. Todo se mezcló por inversión. Después de 1 h, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm en un lector de microplacas marca Bio-rad, modelo xMark™. Los resultados se reportan como µM equivalentes de Deferoxamina B (µM DFOMeq) al compararse con la curva de calibración (Alexander & Zuberer, 1991).

### **3.3 Ensayos de confrontación *in vitro***

Se evaluó la capacidad antagónica de las cepas del género *Burkholderia* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* ATTC 62941 mediante ensayos de confrontación *in vitro* en cajas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Trujillo, Díaz, Hernández, & Heydrich, 2007). Las confrontaciones se realizaron sembrando en un extremo de la caja, una asada de las bacterias y en

el lado opuesto, un círculo de 5 mm de *F. oxysporum* ATTC 62941 previamente activado en medio PDA. Las cajas se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C monitoreando el crecimiento del hongo a las 24 h, repitiendo la observación cada 48 h durante 11 días. El ensayo fue repetido tres veces. Al término de este periodo, las cajas Petri fueron escaneadas para poder medir los porcentajes de inhibición, utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ versión 1.8.0\_112 (Rueden et al., 2017) y la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{Área del control}) - (\text{Área del tratamiento})}{(\text{Área del control})} \times 100$$

### **3.4 Evaluación de la actividad supresora de las cepas bacterianas mediante ensayos de invernadero.**

#### **3.4.1 Esterilización de semillas**

Se utilizaron semillas de maíz blanco provenientes de la comunidad de San Bernardo, ubicada en el municipio de Pénjamo, Gto. Con el objetivo de evitar la contaminación de semillas por agentes patógenos en el proceso de germinación, se realizó la esterilización de las mismas. Para ello, se sumergieron en 100 mL de dH<sub>2</sub>O en un vaso de precipitado con detergente Tween 20 (1 gota) en campana de flujo laminar. Se agitaron las semillas manualmente durante algunos minutos, se decantó la mezcla de agua con detergente y posteriormente se realizaron lavados con dH<sub>2</sub>O estéril. Luego, las semillas se colocaron en una gasa estéril para después depositarse dentro de un nuevo vaso de precipitado estéril, en el cual se añadió hipoclorito de sodio (NaClO) 1.25% durante 20 min. Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados con dH<sub>2</sub>O estéril y por último, se dejaron secar las semillas

durante 15 min para después almacenarse en tubos Falcon de 50 mL estériles. Modificado de Leyva-Madrigal, Larralde-Corona, Calderón-Vázquez, & Maldonado-Mendoza, 2014.

#### **3.4.2 Germinación de semillas**

En cajas de Petri de vidrio con algodón estériles, se agregaron 15 mL de dH<sub>2</sub>O estéril en campana de flujo laminar y con ayuda de unas pinzas estériles, se distribuyeron las semillas uniformemente en toda la caja. Las cajas fueron selladas y almacenadas a 25 ± 2 °C en obscuridad durante 3 días.

#### **3.4.3 Preparación de suelo y lavado de macetas**

Se utilizó una mezcla general de suelo compuesta de partes iguales de turba de esfagno (Peat Moss), perlita y vermiculita, la cual fue esterilizada 5 veces en bolsas plásticas a 1 atm, 121 °C por 1 h. Se lavaron macetas de 1.3 L de capacidad, sumergiéndolas en una solución de HCl 0.1 N durante 24 h. Luego se asperjaron con una solución de NaClO 2% (v/v) y una vez secas, se sometieron a luz UV directa durante 15 min.

#### **3.4.4 Inoculación de maíz quebrado**

En matraces Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 150 g de maíz quebrado seco, añadiendo dH<sub>2</sub>O (40 mL/100 g de maíz quebrado) y se esterilizaron en autoclave a 1 atm, 121 °C durante 15 min. En campana de flujo laminar, fueron inoculados con *Fusarium oxysporum* ATTC 62941 previamente activado en PDA, cortando con un sacabocado círculos de 5 mm (3 círculos/100 g de maíz quebrado). Los matraces

fueron almacenados a  $25 \pm 2$  °C en obscuridad durante 7 días (Jáuregui Rosas, 2017).

#### **3.4.5 Preparación del inóculo de bacterias**

Se diluyó una asada de cultivo de cada cepa en 1 mL de solución salina 0.85% estéril, y se sembró una alícuota de 100  $\mu$ L en matraces Erlenmeyer que contenían 250 mL de caldo nutritivo. Las cepas se incubaron durante 48 h a  $28 \pm 2$  °C. Se centrifugaron 200 mL de cultivo a una velocidad de 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y se realizaron 3 lavados con 100 mL de solución salina 0.85% estéril. Finalmente, el pellet de cada tubo fue disuelto en 100 mL de solución salina 0.85% estéril.

#### **3.4.6 Establecimiento de los ensayos en invernadero**

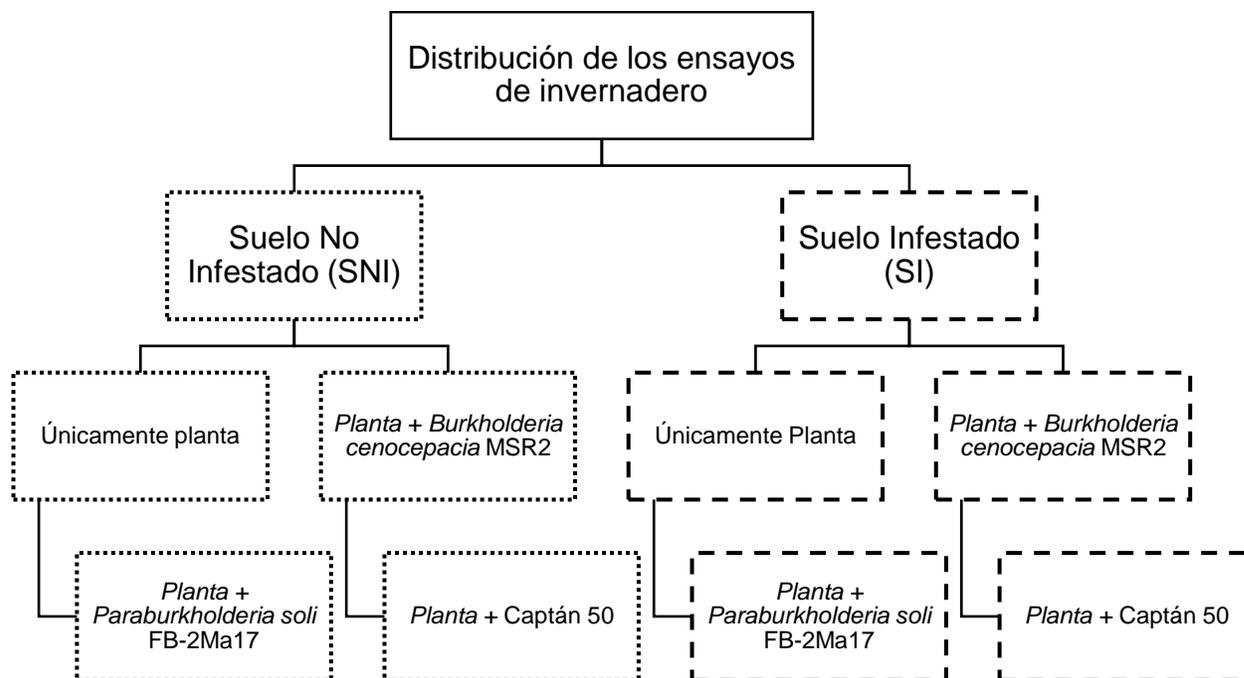
Se realizaron 8 tratamientos que consistieron en 4 tratamientos de suelo infestado (SI) con *Fusarium oxysporum* ATTC 62941 (250 g inóculo/ kg de suelo) y 4 tratamientos con suelo no infestado (SNI). Al tercer día después de la germinación, se colocaron las semillas de maíz en el sustrato correspondiente a los diferentes tratamientos (SI y SNI) (Jáuregui-Rosas, 2017).

Los tratamientos con SI y SNI se dividieron de la siguiente manera: 1 tratamiento al que se agregó una suspensión de 30 mL de la cepa *Burkholderia cenocepacia* MSR2 a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  UFC; 1 tratamiento al que se agregó una suspensión de 30 mL de la cepa *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17 a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  UFC; 1 tratamiento al que se añadieron 30 mL de fungicida

comercial Captán 50 a una concentración de 2 g/L y 1 tratamiento en el que solo se agregaron las semillas germinadas de maíz. Cada tratamiento tuvo 5 réplicas.

Se realizó una re-inoculación de ambas cepas y una re-aplicación de Captán 50 a los 7 días después del trasplante (ddt). Las plantas se regaron cada tercer día con 200 mL de dH<sub>2</sub>O, monitoreando el crecimiento y la incidencia-severidad de la enfermedad diariamente durante 28 ddt (Cooke, 2006).

Al término del experimento (28 ddt), cada una de las plantas fue desprendida cuidadosamente del sustrato, conservando este último a 4 °C dentro de bolsas plásticas estériles para realizar análisis microbiológicos posteriores. Se realizó un lavado de las raíces de cada planta y finalmente se evaluaron como variables de respuesta la longitud de la raíz y la parte aérea, así como el peso fresco y seco de cada planta.



**Figura 4. Distribución de los tratamientos establecidos en los ensayos de invernadero.** Del lado izquierdo (SNI), se observan los tratamientos de suelo no inoculados con *Fusarium oxysporum* ATTC 62941 mientras que del lado derecho (SI), se muestran los tratamientos de suelo inoculados con el hongo.

### 3.4.7 Medición del índice de incidencia-severidad de la fusariosis

Diariamente durante 28 días, se tomó un reporte de los síntomas de la fusariosis presentes en las plantas, como marchitez y/o clorosis en las hojas, asignando un valor numérico a la observación, donde 0 representaba una planta sana y 5 una planta completamente enferma. La asignación del número dentro del rango 0-5 dependió del número de hojas y/o tejido que estaba dañado (Cooke, 2006). El cálculo del índice de incidencia-severidad de la enfermedad se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Incidencia de la Enfermedad (I)} = \frac{\text{Incidencia x severidad}}{\text{Número de plantas analizadas}}$$

También se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) de los días que se tomó la medición de la incidencia-severidad, utilizando el paquete de procedimientos estadísticos para la investigación agrícola “agricolae” del software R, versión 1.2-8. El AUDPC es comúnmente utilizada para combinar múltiples observaciones del progreso de una enfermedad en un solo valor (Simko & Piepho, 2012).

### **3.5 Establecimiento de los ensayos en invernadero adicionando Fe al suelo**

Con la finalidad de demostrar si en un ambiente con alta disponibilidad de Fe las cepas bacterianas no producen sideróforos, se realizó un experimento en invernadero de la misma manera que el anterior con la única diferencia de la adición en el suelo de Fe. Éste fue agregado como  $\text{FeCl}_3$  a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  en  $100 \text{ mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$  al inicio del experimento y repitiendo la aplicación a los 7 ddt. De igual manera, se monitoreó el crecimiento y la incidencia-severidad de la enfermedad durante 28 ddt.

### **3.6 Conteo en placa de células viables por dilución**

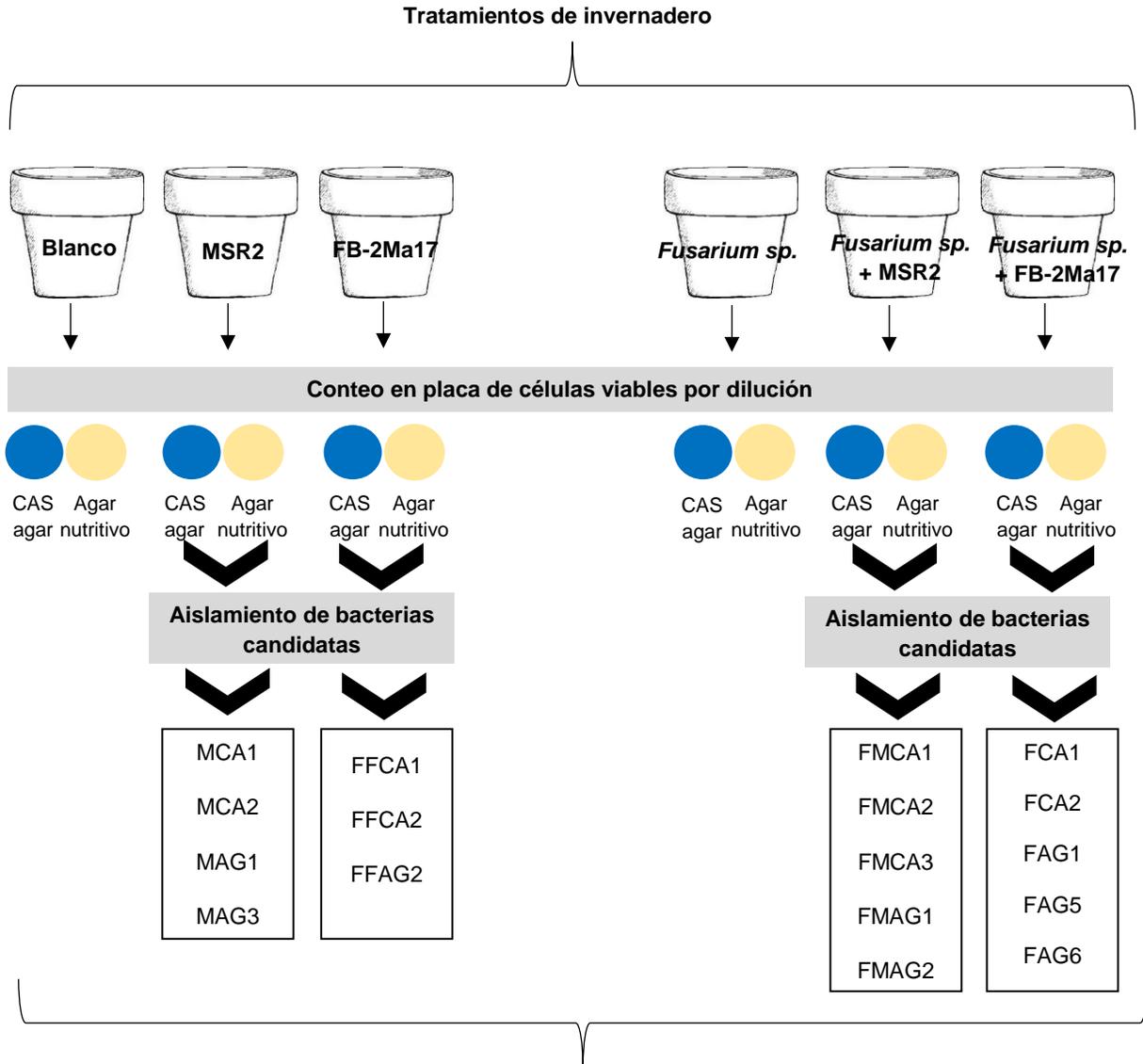
Para verificar la sobrevivencia de las bacterias inoculadas en el suelo al término del experimento, se pesaron  $10 \text{ g}$  de suelo de cada tratamiento inoculado, los cuales fueron transferidos en matraces Erlenmeyer de  $250 \text{ mL}$  a los que se añadieron  $90 \text{ mL}$  de solución salina  $0.85 \%$  estéril. En seguida, los matraces se pusieron en agitación a  $100 \text{ rpm}$  durante  $1 \text{ h}$ . A partir de dicha solución, se hicieron 5 diluciones seriadas tomando  $100 \mu\text{L}$  de cada matraz y agregándolos en  $900 \mu\text{L}$  de solución salina  $0.85 \%$  estéril. Los conteos se realizaron en agar nutritivo adicionado con

cicloheximida a (80 mg/L) y CAS agar (**Anexo I**) para obtener una aproximación de la cantidad de bacterias productoras de sideróforos en los tratamientos. Mediante la técnica de dispersión en placa se sembraron por duplicado 100 µL de las diluciones  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ . Las cajas fueron selladas e incubadas en oscuridad durante 48 h a una temperatura de 28 °C. A las 24 h y 48 h se hicieron conteos de las colonias bacterianas utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ versión 1.8.0\_112. Los resultados se reportaron como UFC/g suelo (López, Hernández-Cruz, Fernández-Dávila, & Mendoza-Herrera, 2015).

### **3.6.1 Aislados bacterianos candidatos**

Las colonias mayormente presentes en los conteos en placa fueron aisladas y estriadas en cajas Petri con agar nutritivo, utilizando un asa microbiológica estéril e incubándolas en oscuridad durante 24 h y 48 h a 28 °C. Una vez aisladas las colonias de bacterias, se identificaron aquellas sobrevivientes que tuvieran una producción de sideróforos (como se describe en **3.2**) y una capacidad de inhibición contra *F. oxysporum* ATTC 62941 (como se detalla en **3.3**) similares a las encontradas, con las cuales se realizaron nuevamente dichas pruebas.

En la **Figura 5** se muestra el diagrama del re-aislamiento de las bacterias candidatas, así como el código de identificación de los aislados.



**Código de identificación de los aislados**

- M** = Proveniente del tratamiento MSR2
- F** = Proveniente del tratamiento FB-2Ma17
- FM** = Proveniente del tratamiento *Fusarium sp.* + MSR2
- FF** = Proveniente del tratamiento *Fusarium sp.* + FB-2Ma17
- CA** = Aislado de CAS agar
- AG** = Aislado de Agar nutritivo

**Figura 5. Diagrama del re-aislamiento de las bacterias candidatas.** Mediante el conteo en placa por dilución, se hicieron aislamientos de las bacterias inoculadas en el suelo de los tratamientos con SI y SNI, utilizando CAS agar y agar nutritivo como medios de cultivo. Se muestra la nomenclatura utilizada para identificar a los aislados, dependiendo del tratamiento y el medio del cual fueron obtenidos.

### 3.7 Extracción de DNA genómico de bacterias

Para la posterior identificación molecular (amplificación del gen 16S rRNA) de los aislados obtenidos a partir de cada tratamiento, como se describe en la sección **3.6.1**, se realizó la extracción de DNA total utilizando fenol-cloroformo (Green & Sambrook, 2012). Las bacterias se cultivaron en 50 mL de caldo nutritivo durante 24 h. Después se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue decantado asegurándose de tener suficiente pellet para luego resuspenderlo en 100  $\mu$ L de NaCl 0.85 % estéril, homogenizando vigorosamente. Se transfirió toda la muestra a tubos de microcentrífuga de 2 mL con perlas de cristal. Se agregaron 200  $\mu$ L de solución Wiston (**Anexo I**), 200  $\mu$ L de buffer TE 1x, 100  $\mu$ L de fenol equilibrado pH 8 y 100  $\mu$ L de cloroformo, sellándolos con parafilm. Después se agitaron vigorosamente durante 10 min utilizando vórtex y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min. Hecho esto, se recuperaron los sobrenadantes obtenidos de las muestras en tubos nuevos, añadiendo posteriormente 100  $\mu$ L de fenol equilibrado y 100  $\mu$ L de cloroformo, centrifugando a 12 000 rpm durante 10 min. Los lavados con fenol y cloroformo se repitieron hasta obtener sobrenadantes limpios. Terminado el lavado, se adicionaron 300  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugaron por 10 min a 12 000 rpm. El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos en los cuales se añadieron 25  $\mu$ L de NaCl 5 M y 1 mL de etanol absoluto frío; se mezcló por inversión y después se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 min a 4 °C. Nuevamente, el sobrenadante se decantó, retirando los residuos de etanol y dejando secar durante 15 min con los tubos destapados. A continuación, se disolvió el pellet de cada tubo en 100  $\mu$ L de buffer TE, agregando 1.25  $\mu$ L de ribonucleasa (20 mg/mL en buffer TE) e incubando

por 30 min a 37 °C. Se añadieron 40 µL de acetato de amonio 5 M y 250 µL de isopropanol, mezclando por inversión y almacenando los tubos cerrados durante 10 min a temperatura ambiente. En seguida, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 12 000 rpm para luego descartar el sobrenadante. El pellet resultante fue lavado con etanol al 70 %. Se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm y se decantó el sobrenadante, dejando secar los tubos durante 15 min en campana de flujo laminar. Por último, se disolvió el pellet en 100 µL de buffer TE (pH=8.0) y las muestras se almacenaron a -20 °C. Se cuantificó la concentración de DNA en Nanodrop 2000, expresando las mediciones en ng/µL.

### **3.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S**

El DNA de las bacterias fue utilizado como templado para amplificar el gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primers universales bacterianos 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). La PCR fue realizada en un volumen de reacción de 50 µL, los cuales consistieron en 2 µL de templado DNA y 48 µL de un Master mix que contenía: 5 µL 10X PCR Buffer -MgCl<sub>2</sub>, 1.5 µL 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 µL 10 mM dNTP Mix, 2.5 µL 10 µM forward primer, 2.5 µL 10 µM reverse primer, 0.2 µL Taq DNA polimerasa y 35.3 µL dH<sub>2</sub>O estéril. En el termociclador, la reacción consistió en un paso de desnaturalización de 95 °C (3 min); luego 35 ciclos de 95 °C (30 s), 48 °C (30 s), 72 °C (1.5 min) y un paso final de elongación de 72 °C (2 min).

Para verificar la calidad de los amplificados, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (0.8 %), durante 30 min a 120 V. Posteriormente se visualizaron

los geles en un transiluminador UV (Green & Sambrook, 2012). Luego se purificaron los productos de PCR del gel utilizando PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen).

### **3.9 Análisis estadísticos**

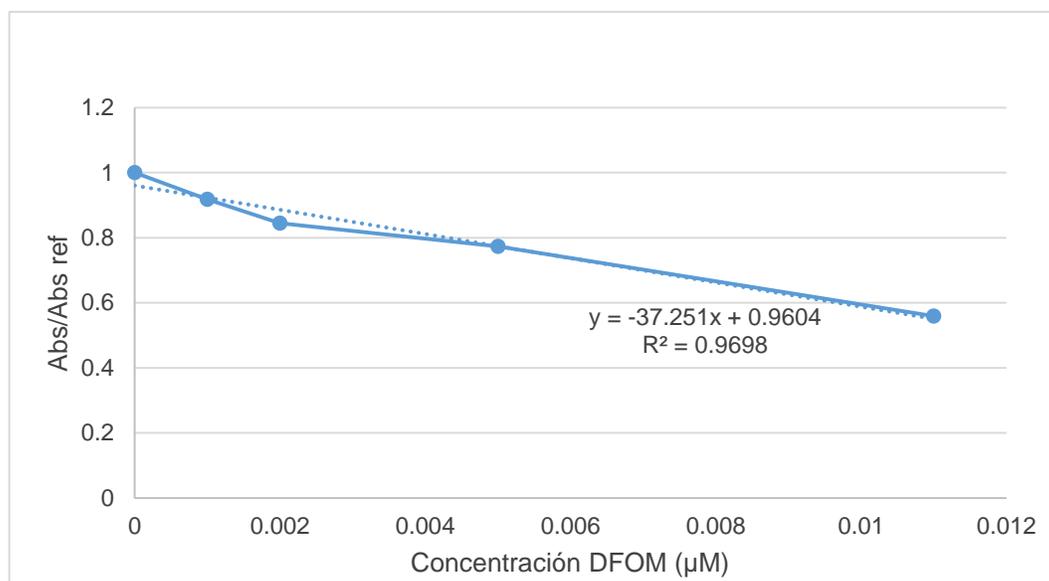
Para cada uno de los experimentos se realizó una prueba de Análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, utilizando el paquete XLSTAT versión 2018.4.51422.

## IV. Resultados

### 4.1 Producción de sideróforos de las cepas bacterianas

#### 4.1.1 Curva de calibración

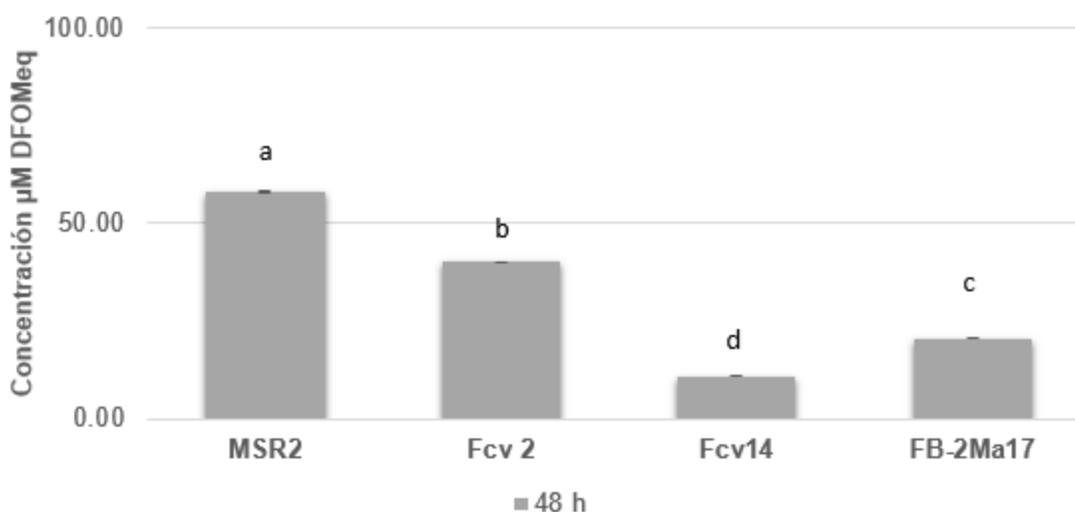
Para medir la producción de sideróforos, se realizó una curva de calibración obtenida de concentraciones conocidas del sideróforo bacteriano Deferoxamina B en relación con la absorbancia medida a 630 nm, se presenta en la **Figura 6**. Se observa que el intervalo de absorbancia en el cual los sideróforos pueden ser detectados abarca desde 0.55 hasta 0.91, lo que corresponde a un rango de concentración de 0.011 a 0.001  $\mu\text{M}$  DFOMeq. La pendiente de la curva es negativa, cuya ecuación lineal resultante fue  $y = -37.251x + 0.9604$ . Esta ecuación se utilizó para calcular la concentración de sideróforos en las mediciones de absorbancia.



**Figura 6. Curva de calibración de Deferoxamina B.** En el eje de las "x", se observa el rango de concentración de Deferoxamina B (un sideróforo de referencia), en el cual los sideróforos son detectados; mientras que en el eje de las "y", se presenta el intervalo de absorbancia para la detección.

#### 4.1.2 Cuantificación de la producción de sideróforos

Se realizaron mediciones de la producción de sideróforos en medio mínimo M9 de las bacterias *Burkholderia* a las 24 h y 48 h. En la **Figura 7**, se presentan los resultados de la medición a las 48 h, obteniendo diferencias significativas entre las bacterias. La bacteria *Burkholderia cenocepacia* MSR2 produce  $58.00 \pm 2.02^a$   $\mu\text{M}$  DFOMeq, *Burkholderia graminis* Fcv2  $40.00 \pm 0.03^b$   $\mu\text{M}$  DFOMeq, *Paraburkholderia caledonica* Fcv14  $10.84 \pm 0.05^d$  DFOMeq y *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17  $20.47 \pm 2.68^c$   $\mu\text{M}$  DFOMeq, siendo *Burkholderia cenocepacia* MSR2 la mayor productora de sideróforos.



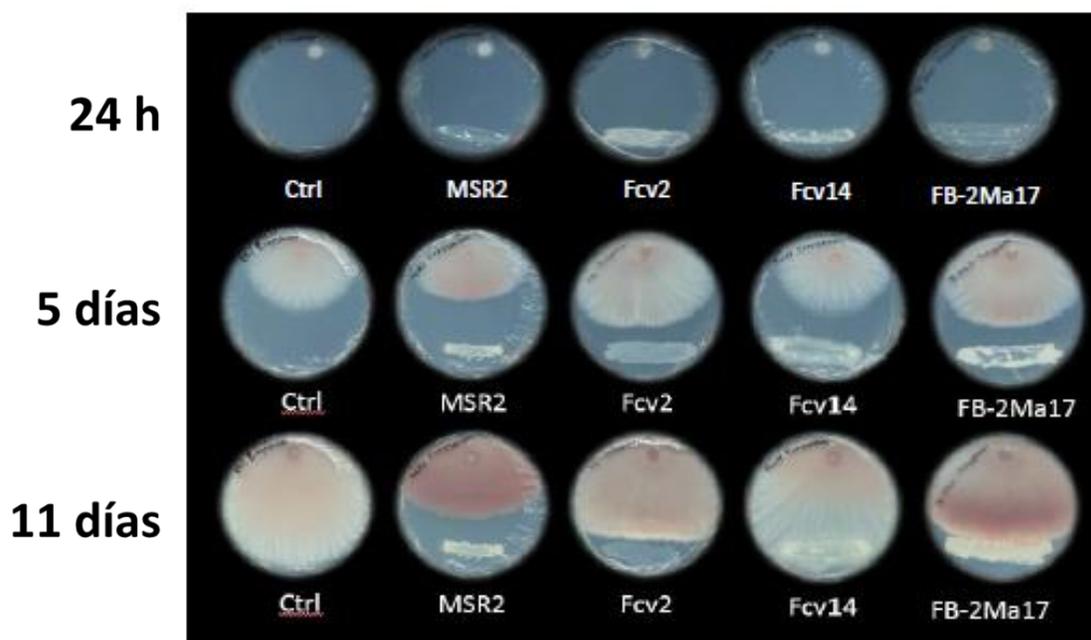
**Figura 7. Producción de sideróforos ( $\mu\text{M}$  DFOM) de bacterias *Burkholderia*.** Se muestran las diferencias significativas entre la producción de sideróforos (dada en  $\mu\text{M}$  DFOMeq) de bacterias *Burkholderia* crecidas en medio mínimo M9. De izquierda a derecha, *B. cenocepacia* MSR2, *B. graminis* Fcv2, *P. caledonica* Fcv14 y *P. soli* FB-2Ma17.

#### 4.2 Inhibición *in vitro* del crecimiento de *F. oxysporum*.

El resultado obtenido a partir del monitoreo diario de los ensayos de confrontación entre *F. oxysporum* ATTC 62941 y bacterias *Burkholderia* se muestra en la **Figura 8**, observándose que la inhibición *in vitro* varía significativamente entre las cepas. A

partir del quinto día se comienza a observar un cambio de coloración en el micelio de *F. oxysporum* ATTC 62941 y a los 11 días es clara la inhibición del crecimiento del hongo en el tratamiento que corresponde a la cepa *Burkholderia cenocepacia* MSR2 ( $47.33 \pm 6.07^a$  %), mientras que en el caso de *Burkholderia graminis* Fcv2 ( $20.31 \pm 1.37^b$  %) y *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17 ( $18.09 \pm 5.23^{bc}$  %) la inhibición fue un 50% menor si se compara con *Burkholderia cenocepacia* MSR2. La que presentó menor inhibición fue *Paraburkholderia caledonica* Fcv14 ( $12.22 \pm 2.24^c$  %).

Luego de obtener los datos de porcentajes de inhibición y producción de sideróforos, se decidió utilizar solamente *B. cenocepacia* MSR2 y *P. soli* FB-2Ma17 debido a su comportamiento contrastante en la inhibición del hongo. Se evaluó bajo condiciones de invernadero, si el efecto observado en los ensayos *in vitro* era el mismo.

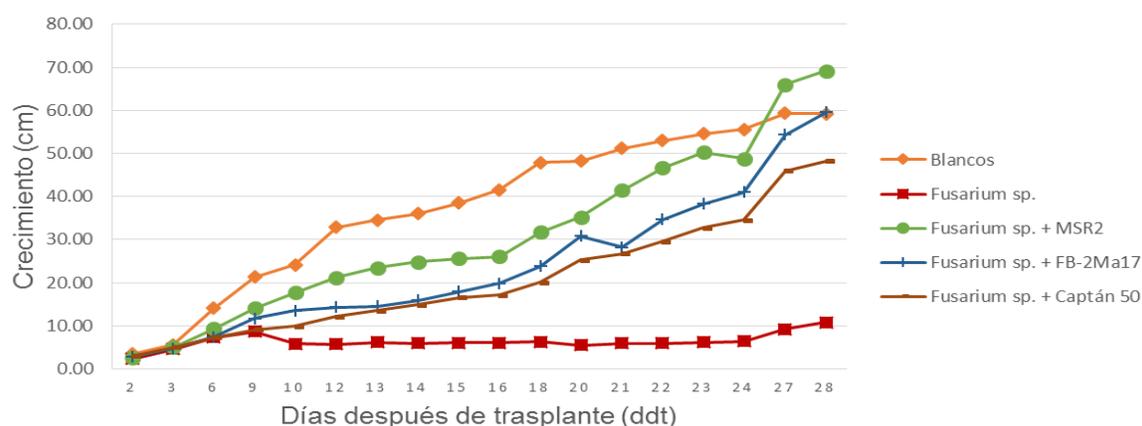


**Figura 8. Inhibición *in vitro* del crecimiento de *Fusarium oxysporum* ATTC 62941 por bacterias *Burkholderia*.** Los ensayos de confrontación se realizaron por triplicado en agar nutritivo. De izquierda a derecha, se observan los ensayos: *F. oxysporum* ATTC 62941 (Ctrl), *B. cenocepacia* MSR2 (MSR2), *B. graminis* Fcv2 (FCV2), *P. caledonica* Fcv14 y *P. soli* FB-2Ma17 (FB-2Ma17).

### 4.3 Efecto de la inoculación de *B. cenocepacia* MSR2 y *P. soli* FB-2Ma17 en el desarrollo de la planta y la producción de biomasa.

Posteriormente, se inoculó el suelo de plantas de maíz con *B. cenocepacia* MSR2 y *P. soli* FB-2Ma17 para ver su efecto en el desarrollo de las plantas. La evaluación del desarrollo en términos de altura de la planta se presenta en la **Figura 9**, donde se observa que con excepción del tratamiento *Fusarium* sp., las plantas con suelo no infestado (SNI) y suelo infestado (SI) tuvieron una tasa similar de crecimiento, llegando a una altura entre 60 cm y 80 cm. El tratamiento *Fusarium* sp. fue el que tuvo un menor crecimiento (10.8 cm) mientras que *Fusarium* sp. + MSR2 alcanzó 69.15 cm, siendo el tratamiento de mayor altura mostrando diferencias significativas entre tales tratamientos para la prueba de ANDEVA realizada.

Los análisis de varianza ANDEVA de XLSTAT indicaron que sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos *Fusarium* sp. + MSR2, Blanco, *Fusarium* sp. + Captán 50 y *Fusarium* sp. en las mediciones de la parte aérea (**Tabla**



**Figura 9. Evaluación en el tiempo del crecimiento de las plantas de maíz sometidas a diferentes tratamientos.** De color naranja, se observan los “Blancos” que representan plantas con SNI; de color rojo, plantas con SI; de color verde, plantas con SI y *B. cenocepacia* MSR2; de color azul, plantas con SI y *P. soli* FB-2Ma17 y por último, de color café, plantas con SI y Captán 50. Cada punto representa el promedio de 5 réplicas.

I). En el caso de la longitud de la raíz, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con SNI pero sí entre los tratamientos con SI (**Tabla I**).

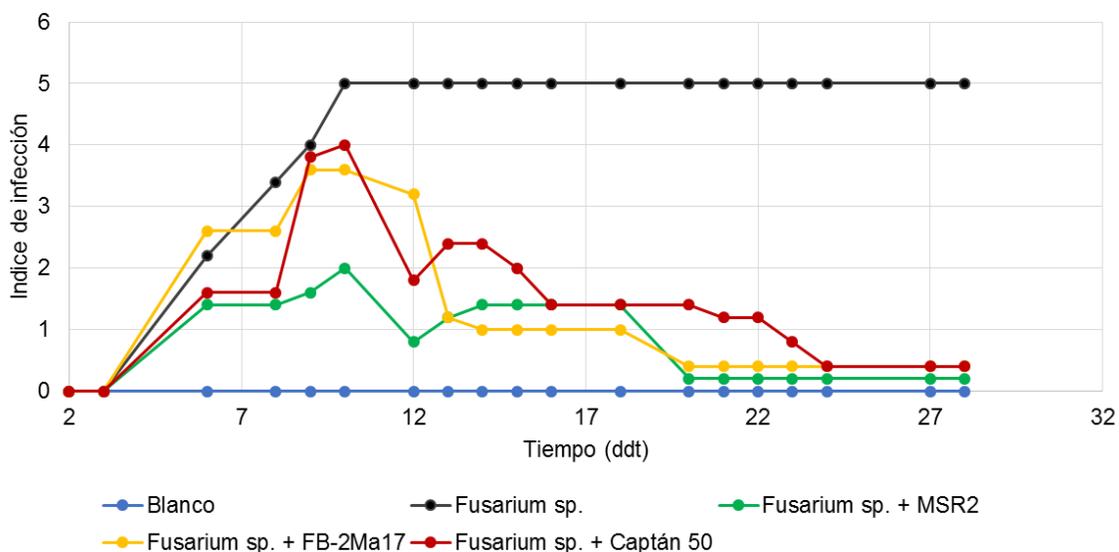
Por otra parte, en lo correspondiente a la biomasa (aérea y radicular) de las plantas (**Tabla I**), se puede observar que no existieron diferencias significativas en el peso seco de las raíces entre los tratamientos inoculados con *F. oxysporum* ATTC 62941 a excepción de *Fusarium* sp. + MSR2 ( $1.02 \pm 0.33^b$  g). Para el caso del peso seco de la parte aérea, si hubo diferencias significativas notorias entre los tratamientos *Fusarium* sp. ( $0.07 \pm 0.03^a$  g), *Fusarium* sp. + FB-2Ma17 ( $1.41 \pm 0.46^b$  g) y *Fusarium* sp. + MSR2 ( $2.18 \pm 0.05^e$  g). Sin embargo, el tratamiento *Fusarium* sp. + Captán 50 ( $1.04 \pm 0.55^{bc}$  g) no es estadísticamente diferente cuando se compara con *Fusarium* sp. + FB-2Ma17 y FB-2Ma17 ( $1.61 \pm 0.16^c$  g).

**Tabla I. Longitud radicular, longitud aérea, peso fresco radicular, peso fresco aéreo, peso seco radicular y peso seco aéreo de plantas de maíz expuestas a diversos tratamientos bajo condiciones de invernadero a los 28 ddt.** Valores con letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (Fisher  $p < 0.05$ )

Tratamientos	Long. raíz (cm)	Long. aérea (cm)	Peso fresco raíz (g)	Peso fresco aérea (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco aérea (g)
Blanco	75.50 ± 3.72 <sup>a</sup>	58.27 ± 2.11 <sup>b</sup>	11.27 ± 0.44 <sup>bc</sup>	11.88 ± 0.33 <sup>bc</sup>	1.37 ± 0.09 <sup>cd</sup>	1.71 ± 0.14 <sup>d</sup>
MSR2	64.17 ± 14.37 <sup>a</sup>	62.17 ± 3.09 <sup>ab</sup>	12.87 ± 2.35 <sup>ab</sup>	13.97 ± 0.94 <sup>ab</sup>	1.41 ± 0.19 <sup>d</sup>	1.91 ± 0.14 <sup>de</sup>
FB-2Ma17	74.70 ± 4.14 <sup>a</sup>	60.62 ± 3.50 <sup>b</sup>	11.89 ± 1.06 <sup>abc</sup>	11.78 ± 0.80 <sup>bc</sup>	1.26 ± 0.16 <sup>bcd</sup>	1.61 ± 0.16 <sup>c</sup>
Captán 50	76.27 ± 10.67 <sup>a</sup>	53.50 ± 3.25 <sup>bc</sup>	9.89 ± 0.97 <sup>c</sup>	8.43 ± 0.41 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.15 <sup>bc</sup>	1.22 ± 0.08 <sup>b</sup>
<i>Fusarium</i> sp.	10.83 ± 8.33 <sup>d</sup>	13.03 ± 6.60 <sup>d</sup>	0.56 ± 0.08 <sup>e</sup>	0.56 ± 0.38 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>
<i>Fusarium</i> sp. + MSR2	45.00 ± 7.45 <sup>b</sup>	71.73 ± 6.51 <sup>a</sup>	13.74 ± 0.98 <sup>a</sup>	17.81 ± 7.82 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.33 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.05 <sup>e</sup>
<i>Fusarium</i> sp. + FB-2Ma17	31.66 ± 6.42 <sup>c</sup>	62.56 ± 9.17 <sup>ab</sup>	6.45 ± 2.65 <sup>d</sup>	13.26 ± 5.75 <sup>abc</sup>	0.66 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.46 <sup>b</sup>
<i>Fusarium</i> sp. + Captán 50	42.88 ± 19.20 <sup>b</sup>	40.90 ± 17.46 <sup>c</sup>	5.65 ± 2.97 <sup>d</sup>	9.76 ± 5.17 <sup>bc</sup>	0.50 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.55 <sup>bc</sup>

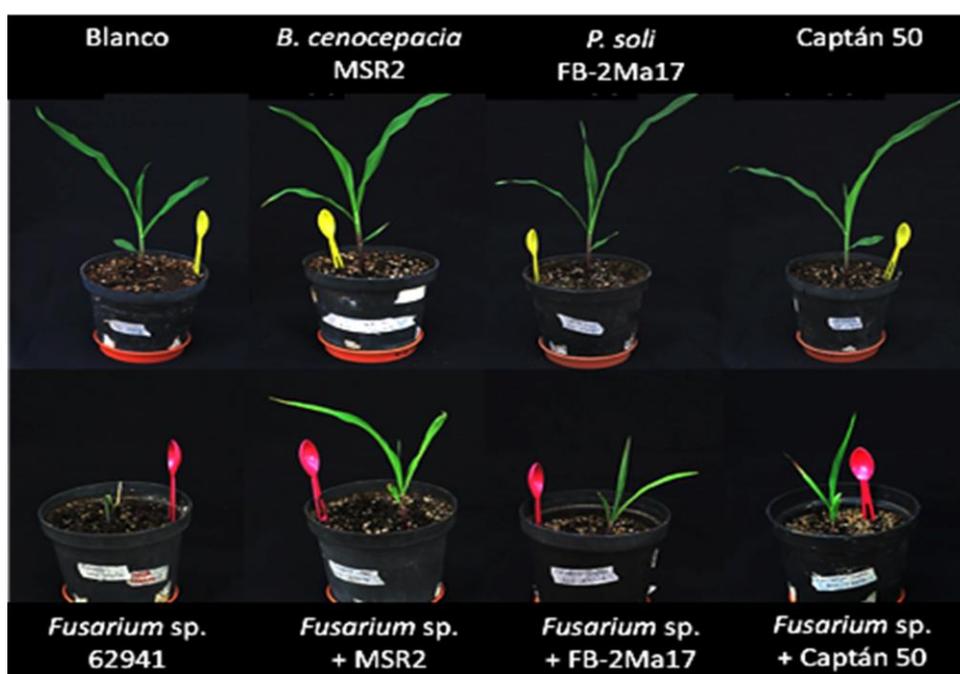
#### 4.3.1 Efecto de la inoculación de suelo con *B. cenocepacia* MSR2 y *P. soli* FB-2Ma17 sobre el progreso de la fusariosis en plantas de maíz

Como se describe en la Metodología (3.4.7), la incidencia-severidad de la fusariosis fue calculada diariamente durante la duración del experimento (28 ddt). En la **Figura 10** se muestra un comportamiento ascendente en las curvas de progreso de la fusariosis en plantas de maíz luego de 2 ddt para todos los tratamientos, a excepción del Blanco sin tratamiento. Sin embargo, después de los 10 ddt este comportamiento se revierte en los tratamientos con *Burkholderia* y Captán 50, los cuales actuaron como agentes supresores de la fusariosis. Los tratamientos con SI mostraron el mayor índice de infección a los 10 ddt; sin embargo, este fue descendiendo progresivamente con excepción de *Fusarium* sp.



**Figura 10. Índice de incidencia-severidad de la fusariosis en plantas de maíz bajo condiciones de invernadero.** El índice de infección (en el eje de las “y”), se mide en una escala del 0-5, donde cero es una planta sana y cinco una planta completamente enferma. En la gráfica, podemos observar de color azul, los “Blancos” que representan plantas con SNI; de color negro, plantas con SI; de color verde, plantas con SI y *B. cenocepacia* MSR2; de color amarillo, plantas con SI y *P. soli* FB-2Ma17 y por último, de color rojo, plantas con SI y Captán 50. Cada punto representa el promedio de 5 réplicas.

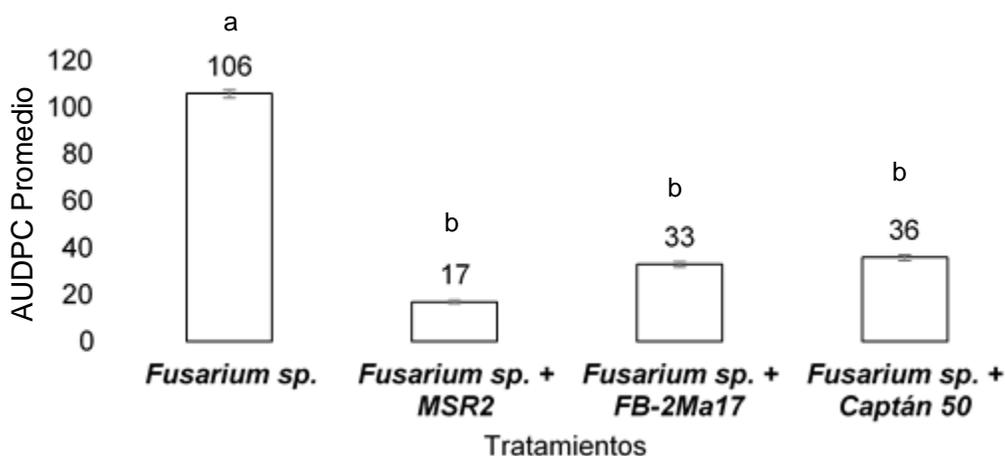
En la **Figura 11**, se observa el progreso de la enfermedad a los 22 ddt. En los SNI, las plantas de maíz muestran un aspecto similar de la parte aérea. No obstante, entre los tratamientos con SI pueden observarse diferencias en los tamaños de las plantas, en las cuales el tratamiento *Fusarium* sp. no desarrolló la parte aérea mientras que *Fusarium* sp. + FB-2Ma17, *Fusarium* sp. + Captán 50 y *Fusarium* sp. + MSR2 si presentaron desarrollo foliar, destacándose esta última como la menos afectada en el crecimiento.



**Figura 11. Evaluación del progreso de la fusariosis en plantas de maíz a los 22 ddt.** En los experimentos de invernadero con SI y SNI, se hicieron inoculaciones de bacterias al momento del trasplante de las plantas de maíz y a los 7 ddt. Se observan más diferencias en el desarrollo foliar entre los tratamientos con SI que en las plantas con SNI.

Los valores para el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) calculados al final del experimento muestran que el tratamiento *Fusarium* sp. + MSR2 presentó una menor área, con un valor calculado de 17<sup>b</sup>, comparado con *Fusarium* sp., con un área de 106<sup>a</sup>. Los tratamientos *Fusarium* sp. + FB-2Ma17 y *Fusarium* sp. + Captán 50 obtuvieron valores muy similares, 33<sup>b</sup> y 36<sup>b</sup>

respectivamente (**Figura 12**). Sin embargo, el único tratamiento que tuvo diferencias significativas fue *Fusarium sp.*



**Figura 12. Área bajo la curva del progreso de la fusariosis en los tratamientos de invernadero.** Aunque cada tratamiento con SI tuvo un valor de AUDPC diferente, solo se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento *Fusarium sp.* comparado con los otros tres tratamientos.

#### 4.4 Efecto de la adición de Fe en el sustrato de ensayos en invernadero

En la **Tabla II**, se muestran los resultados hasta los 11 ddt del estudio preliminar de ensayos de invernaderos a los cuales se adicionó Fe al sustrato. Se observa que desde el quinto día, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con SNI Blanco y MSR2 ni tampoco entre los tratamientos FB-2Ma17 y Captán 50. A los 11 ddt, los tratamientos con SI no presentaron diferencias significativas entre ellos, incluso el tratamiento *Fusarium sp.* + MSR2 no se diferenció entre los tratamientos.

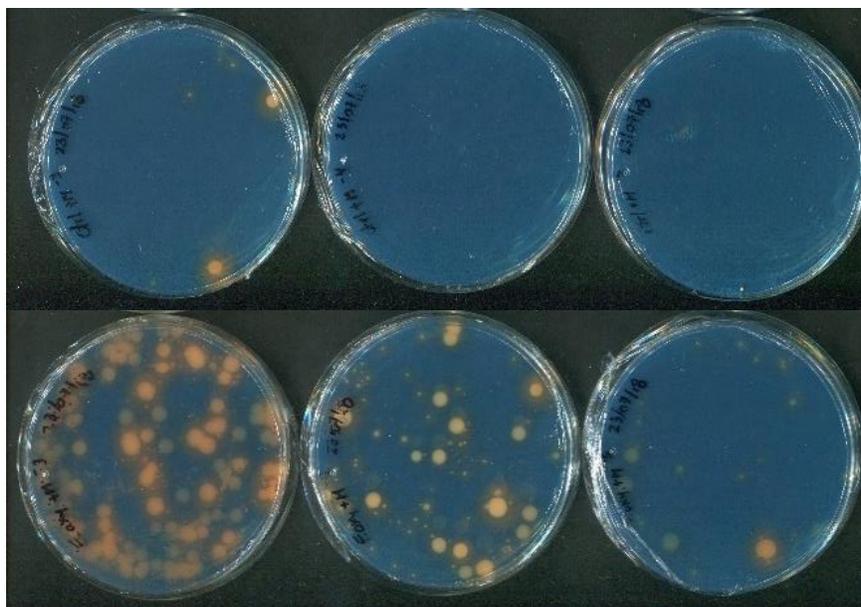
**Tabla II. Altura promedio de plantas de maíz sometidas a diversos tratamientos en suelo adicionado con Fe bajo condiciones de invernadero.** Todos los valores están dados en cm. Valores con letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (Fisher  $p < 0.05$ )

ddt	Blanco	MSR2	FB-2Ma17	Captán 50	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. + MSR2	<i>Fusarium</i> sp. + FB-2Ma17	<i>Fusarium</i> sp. + Captán 50
3	4.98 <sup>abc</sup>	5.2 <sup>ab</sup>	6.2 <sup>a</sup>	4.125 <sup>bc</sup>	5.025 <sup>ab</sup>	3.38 <sup>c</sup>	4.475 <sup>bc</sup>	4.18 <sup>bc</sup>
4	7.24 <sup>ab</sup>	7.48 <sup>a</sup>	5.80 <sup>abc</sup>	5.83 <sup>abc</sup>	5.18 <sup>bc</sup>	5.68 <sup>bc</sup>	4.62 <sup>c</sup>	5.58 <sup>bc</sup>
5	10.54 <sup>a</sup>	11.12 <sup>a</sup>	6.34 <sup>b</sup>	6.40 <sup>b</sup>	5.98 <sup>b</sup>	6.45 <sup>b</sup>	5.46 <sup>b</sup>	6.36 <sup>b</sup>
6	14.62 <sup>a</sup>	15.14 <sup>a</sup>	7.54 <sup>b</sup>	9.00 <sup>b</sup>	7.22 <sup>b</sup>	7.18 <sup>b</sup>	6.72 <sup>b</sup>	7.58 <sup>b</sup>
7	18.26 <sup>a</sup>	18.50 <sup>a</sup>	10.28 <sup>bc</sup>	12.16 <sup>b</sup>	8.70 <sup>bc</sup>	8.85 <sup>bc</sup>	8.20 <sup>c</sup>	8.92 <sup>bc</sup>
11	31.80 <sup>a</sup>	31.92 <sup>a</sup>	21.56 <sup>b</sup>	24.70 <sup>b</sup>	13.60 <sup>c</sup>	12.30 <sup>c</sup>	11.74 <sup>c</sup>	12.42 <sup>c</sup>

#### 4.5 Sobrevivencia de bacterias a los ensayos en invernadero

##### 4.5.1 Recuento en placa por dilución de bacterias en suelo

Para medir la sobrevivencia de las bacterias inoculadas en el suelo de las plantas de maíz, se realizaron recuentos en placa por dilución. En la **Figura 13**, se observa un conteo en placa por dilución de estas bacterias, en el cual se muestra claramente las diferencias entre tratamientos, en relación con la presencia de bacterias productoras de sideróforos. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de UFC obtenidos en las placas de CAS agar, siendo menores los provenientes de los tratamientos no inoculados con bacterias (rango  $1 \times 10^4$ ), mientras que, en los suelos inoculados con bacterias el rango fue de  $1 \times 10^6$  UFC/g (**Tabla III**).



**Figura 13. Placas de medio CAS agar utilizadas para el conteo en placa por dilución de bacterias del suelo (SNI y SI) utilizado en los tratamientos de invernadero.** En este ejemplo se muestran los tratamientos MSR2 (parte superior) y *Fusarium* sp. + MSR2 (parte inferior) a las 48 h de crecimiento. De izquierda a derecha, se observan las diluciones  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ .

**Tabla III. Conteo en placa por dilución de bacterias del suelo provenientes de experimentos de invernadero sin Fe.** Todos los valores están dados en UFC/g suelo. Valores con letras distintas representan diferencias estadísticamente significativas (Fisher  $p < 0.05$ )

Medio	Horas	Blanco	MSR2	FB-2Ma17	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. + MSR2	<i>Fusarium</i> sp. + FB-2Ma17
Agar Nutritivo	48 h	4.397 <sup>c</sup> Log	5.770 <sup>b</sup> Log	6.041 <sup>b</sup> Log	6.505 <sup>a</sup> Log	6.662 <sup>a</sup> Log	Inc*
CAS agar	48 h	0	4.954 <sup>b</sup> Log	4.602 <sup>b</sup> Log	5.812 <sup>ab</sup> Log	6.763 <sup>a</sup> Log	6.643 <sup>a</sup> Log

\*Inc = Incontables

#### 4.5.2 Re-aislamiento de bacterias productoras de sideróforos a partir del suelo de los diferentes tratamientos.

Una vez obtenidos los conteos en placa por dilución de las bacterias del suelo utilizadas en los ensayos de supresión, se tomaron aquellas colonias que eran más abundantes y se aislaron en cajas con agar nutritivo, obteniéndose 17 aislados bacterianos. De estos aislados, cuatro provenían del tratamiento MSR2, cinco del tratamiento FB-2Ma17, cinco del tratamiento *Fusarium* sp. + MSR2 y tres de *Fusarium* sp. + FB-2Ma17. Como se describe en 3.6.1, se realizaron ensayos de confrontación *in vitro* contra *F. oxysporum* ATTC 62941 así como pruebas de producción de sideróforos de los aislados bacterianos para corroborar la sobrevivencia de las bacterias inoculadas en suelo.

De los 17 aislados, los que mostraron porcentajes de inhibición similares a los encontrados por *B. cenocepacia* MSR2 ( $47.33 \pm 6.07$  %) fueron FMCA1 ( $45.32 \pm 4.74$  %) y MCA2 ( $59.76 \pm 5.78$  %); sus producciones de sideróforos ( $149.21 \mu\text{M DFOMeq}$  y  $207.42 \mu\text{M DFOMeq}$  respectivamente) aunque fueron las más altas entre los aislados candidatos para MSR2, difieren de la producción encontrada por *B. cenocepacia* MSR2 ( $58.00 \pm 2.02^a \mu\text{M}$ ). Por otro lado, el aislado FCA2 mostró tanto un porcentaje de inhibición ( $13.03 \pm 2.52\%$ ), como una producción de sideróforos ( $30.12 \mu\text{M DFOMeq}$ ) similares a las encontradas por *P. soli* FB-2Ma17 ( $18.09 \pm 5.23$  %) y ( $20.47 \pm 2.68 \mu\text{M DFOMeq}$ ), respectivamente. Los resultados de todos los aislados se muestran en la **Tabla IV**.

**Tabla IV. Aislados candidatos obtenidos del suelo de los experimentos en invernadero**

<b>Aislados candidatos</b>	<b>Porcentaje de inhibición (%)</b>	<b>Producción de sideróforos (<math>\mu\text{M}</math> DFOMeq)</b>
FMCA1	45.32 $\pm$ 4.74	149.21
MCA2	59.76 $\pm$ 5.78	207.42
FFCA2	19.58 $\pm$ 1.82	N/P
FFCA1	35.88 $\pm$ 4.99	166.78
FMCA2	28.60 $\pm$ 5.09	N/P
FMCA3	38.26 $\pm$ 0.02	73.78
FAG1	8.52 $\pm$ 2.70	N/P
FCA2	13.03 $\pm$ 2.52	30.12
MAG3	59.16 $\pm$ 0.06	181.55
FMAG2	11.68 $\pm$ 0.01	N/P
MAG1	9.03 $\pm$ 0.21	N/P
FMAG1	16.06 $\pm$ 0.01	96.42
FCA1	2.63 $\pm$ 1.87	N/P
FFAG2	36.08 $\pm$ 0.04	165.37
FAG6	7.39 $\pm$ 1.52	N/P
FAG5	6.03 $\pm$ 1.13	98.86
MCA1	43.37 $\pm$ 1.07	197.72
N/P significa "No Produce sideróforos"		

## 4.6 Identificación molecular de los aislados

### 4.6.1 Concentraciones de DNA de los aislados

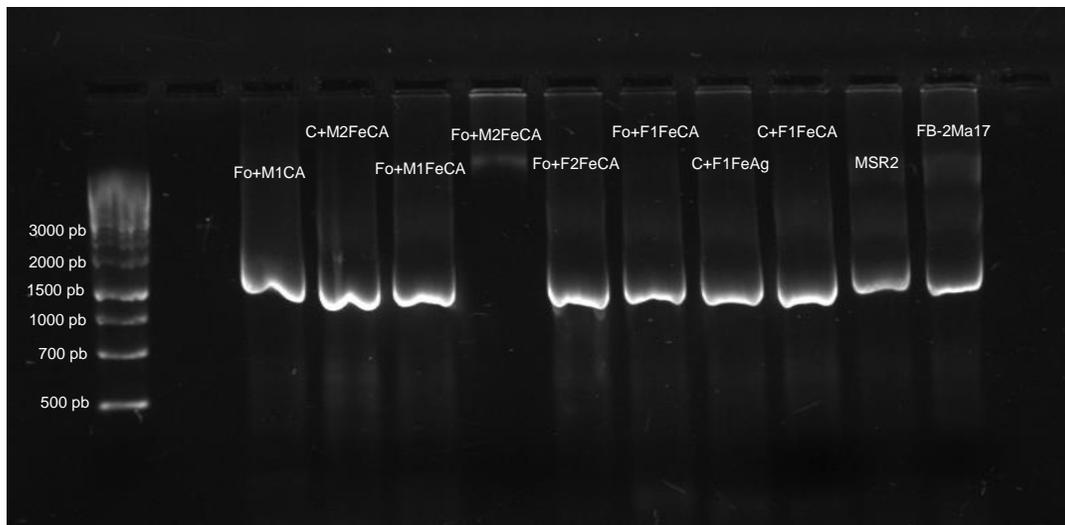
De los 17 aislados obtenidos, se seleccionaron 8 para realizar extracción de DNA. Los aislados se eligieron de la siguiente manera: cuatro que tuvieron resultados de inhibición in vitro y producción de sideróforos similares (FMCA1, MCA2, FCA2, FFCA2) y cuatro que diferían (FMCA3, FMCA2, FAG1, FCA1) de los resultados encontrados por *B. cenocepacia* MSR2 y *P. soli* FB-2Ma17. Una vez realizadas las extracciones, se midieron las concentraciones de DNA en Nanodrop 2000. Los resultados se muestran en la **Tabla V**.

**Tabla V. Concentraciones de las extracciones de DNA obtenidas de los aislados bacterianos**

<b>Aislado</b>	<b>Concentración DNA (ng/μL)</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
FMCA1	79.8	1.87	1.62
MCA2	41.7	1.82	1.22
FMCA3	70.5	1.89	1.54
FMCA2	72.7	1.81	1.28
FCA2	45.8	1.57	1.16
FFCA2	91.2	1.86	1.56
FAG1	121.0	1.49	1.13
FCA1	36.8	1.91	2.05
<b>MSR2 (controles)</b>	<b>76.6</b>	<b>1.83</b>	<b>1.49</b>
<b>FB-2Ma17 (controles)</b>	<b>70.4</b>	<b>1.87</b>	<b>1.76</b>

#### 4.6.2 PCR de los aislados

Con el objetivo de confirmar mediante PCR la sobrevivencia e identificación de las bacterias adicionadas a los suelos, se realizó la PCR de los 8 aislados antes mencionados. En la **Figura 13** se presentan las bandas correspondientes a los amplicones del gen 16S mostrando el tamaño de 1500 pb esperado en la mayoría de los aislados seleccionados, exceptuando el aislado Fo+M2FeCA, lo cual sugiere que no se trata de una bacteria. También se muestran como controles positivos en la amplificación, las bacterias inoculadas en los tratamientos de invernadero *Burkholderia cenocepacia* MSR2 y *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17. Cabe destacar que los experimentos realizados se quedaron hasta esta etapa de desarrollo. Esta evidencia molecular la presencia del fragmento



**Figura 13. Amplificación del gen 16S en aislados obtenidos del suelo de los experimentos en invernadero.** Se observan bandas de un tamaño aproximado de 1500 pb con excepción del aislado Fo+M2FeCA,

## V. Discusión

La literatura científica relacionada al control de hongos fitopatógenos mediante el uso de bacterias, ha aumentado rápidamente debido al interés por una agricultura sustentable que disminuya el uso de agroquímicos (Salette-Mota, Bauer-Gomes, Souza-Júnior, & Bittencourt-Moura, 2016) y también, por la facilidad para responder los mecanismos responsables del biocontrol mediante técnicas moleculares (Whipps, 2001). Conocer estos mecanismos es de suma importancia pues es difícil que un solo modo de acción sea el responsable de la supresión de una enfermedad (Serrano-Carreón & Galindo-Fentanes, 2007).

En la presente tesis, se probó el antagonismo *in vitro* de cuatro bacterias del género *Burkholderia* contra *Fusarium oxysporum* ATTC 62941. Aunque mediante la técnica CAS líquido se determinó que las bacterias *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17 y *Burkholderia cenocepacia* MSR2 producen sideróforos, los ensayos de confrontación *in vitro* mostraron que MSR2 tiene una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de *F. oxysporum*, con un porcentaje de inhibición de  $47.34 \pm 6.07$  % comparado con  $18.10 \pm 5.225$  % de FB-2Ma17. Esto sugiere que el efecto de la inhibición quizá sea dependiente del tipo de sideróforo y no de la concentración del mismo.

Respecto a lo anterior, se ha reportado que existen bacterias que producen un solo tipo de sideróforos mientras que otras secretan diversas clases que les brindarían una ventaja competitiva para colonizar diferentes ambientes (Aguado-Santacruz, Moreno-Gómez, Jiménez-Francisco, García-Moya, & Preciado-Ortiz, 2012). Dentro del género *Burkholderia*, se sabe que el Bcc tiene la capacidad de producir distintas

clases de sideróforos, como pioquelina (Sokol, 1986), cepaciaquelina (Rojas-Rojas et al., 2018), cepabactina (Meyer et al., 1995) y ornibactina (Meyer et al., 1995).

Utilizando la prueba de Arnow (Arnow, 1937) y Csáky (Csáky, 1948) para detectar sideróforos catecolatos e hidroxamatos, respectivamente, se podrían determinar cuáles son los tipos de sideróforos producidos por *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17 y así establecer aquellos que no están implicados en el antagonismo *in vitro*, puesto que se ha determinado la presencia de sideróforos del tipo hidroxamato en *Burkholderia cenocepacia* MSR2 (Barrera-Galicia, 2016).

En este trabajo, se encontró que *Burkholderia cenocepacia* MSR2 ejerce la mayor inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* con  $47.33 \pm 6.07$  %. Bevivino et al., 2000 reportaron que *Burkholderia cepacia* MCI 7 inhibe el crecimiento de *Fusarium* spp. entre 35.89 % y 64.86 %, por lo que los datos obtenidos de *Burkholderia cenocepacia* MSR2 se encuentran en un rango reportado. Sin embargo, en este mismo estudio mencionaron que en medio King (medio limitante de Fe), la inhibición del crecimiento fúngico fue significativamente mayor comparado con PDA (Bevivino et al., 2000). Por lo tanto, realizando experimentos *in vitro* en este medio como también en agar Martin desferrizado (Kurek & Jaroszuk-Ściseł, 2003), se podrían obtener resultados directamente relacionados con la producción de sideróforos, sin que intervengan posibles trazas de hierro del medio PDA (Venner-Rodríguez & Martin-Hernández, 2009).

Bajo condiciones de invernadero y en interacción con plantas de maíz, *B. cenocepacia* MSR2 mostró el mayor efecto protector contra la fusariosis,

corroborándose con un AUDPC menor que significa mayor tolerancia a la enfermedad (Caligiore-Gei, Valdez, Piccolo, & Rómulo-Galmarini, 2014) y reflejado en plantas significativamente más altas, con mayor peso seco de raíz y generalmente más sanas que los tratamientos con solo *Fusarium* sp. y *Fusarium* sp. con Captán 50. En estudios de actividad antagónica de bacterias rizosféricas contra hongos fitopatógenos, se encontró una correlación de mayor altura de plantas de garbanzo con la producción de ácido giberélico y solubilización de fósforo por parte de *Bacillus subtilis* (Fernández-Herrera, Martínez-Rentería, Moreno-Salazar, Jiménez-Peña, & Ramírez-Bustos, 2018). Esta misma capacidad de producir ácido giberélico fue reportada en *Bacillus amyloliquefaciens* lo que incrementó la longitud de raíz, peso seco y peso fresco en plantas de arroz (Shahzad et al., 2016), por lo cual habría que considerar medir la capacidad de *B. cenocepacia* MSR2 para producir algún tipo de promotor del crecimiento.

Por otro lado, se sabe que los sideróforos representan una ventaja en la competencia por nutrientes en microambientes como la rizosfera (Loper & Buyer, 1991), al restringir la disponibilidad de Fe y por tanto, disminuir el crecimiento de organismos patógenos de las plantas (Valencia-Cantero, Villegas-Moreno, Sánchez-Yáñez, Peña-Cabriales, & Farías-Rodríguez, 2005). Por ello, es preciso evaluar otros factores que afecten la efectividad de las bacterias utilizadas para producir sideróforos *in vivo*, como son la temperatura, el pH (Parra-González et al., 2009) y características del suelo (Heydari & Misaghi, 1998).

También, es deseable investigar qué otros mecanismos, como la antibiosis, son los responsables del biocontrol por parte de *B. cenocepacia* MSR2, ya que en la

literatura se ha descrito que dentro del género *Burkholderia*, *B. cepacia* y *B. contaminans* producen péptidos y oligopéptidos no ribosomales con actividad antifúngica, como son cepacidinas, altericidinas y occidiofungina (Rojas-Rojas et al., 2018).

El ensayo preliminar de Fe no mostró diferencias significativas en el crecimiento entre los tratamientos con SI, por lo cual la adición de Fe en el sustrato quizá ejerció un efecto en la producción de sideróforos de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2. Se sabe que la presencia de Fe en el sustrato es un factor limitante en la elongación del tubo germinativo de *Fusarium* (Scher & Baker, 1982).

De los conteos en placa por dilución, se puede decir que se encontró una mayor cantidad de microorganismos en los suelos infestados con *F. oxysporum* ATTC 62941, dentro del rango de  $1 \times 10^6$ , lo que coincide con lo reportado en la rizosfera de maíces híbridos convencionales y genéticamente modificados (López et al., 2015). Se plantea la hipótesis de que muchos microorganismos encontrados en los conteos, provienen del ambiente al ser acarreados por corrientes de aire o por el agua de riego (Méndez-Puentes, Camacho-Suárez, & Echeverry-Hernández, 2015), ya que el suelo se esterilizó previo al establecimiento de los experimentos en invernadero. Una mayor cantidad de microorganismos no siempre equivale a una mayor diversidad de los mismos, ya que existe competencia entre géneros y especies en la rizosfera (Vélez-Calvo, Meneses, & Zúñiga-Dávila, 2008).

## VI. Conclusiones

Bajo condiciones *in vitro*, *Burkholderia cenocepacia* MSR2 mostró la mayor inhibición del crecimiento ( $47.33 \pm 6.07$  %) de *Fusarium oxysporum* ATTC 62941.

Esta misma tendencia se observó bajo condiciones de invernadero, donde las plantas infectadas con *F. oxysporum* ATTC 62941 e inoculadas *B. cenocepacia* MSR2 mostraron menores síntomas de fusariosis, incluso al compararse con el fungicida comercial Captán 50.

Aunque *Paraburkholderia soli* FB-2Ma17 y *Burkholderia cenocepacia* MSR2 producen sideróforos, ésta última cepa bacteriana es la mayor productora ( $58.00 \pm 2.02$   $\mu$ M DFOMeq) y tiene la mayor capacidad de supresión de *F. oxysporum* ATTC 62941, sugiriendo que la inhibición del crecimiento fúngico depende del tipo de sideróforo y no de su concentración, apuntando a la producción de sideróforos como uno de los mecanismos responsables.

Por último, se determinó que al inocular *B. cenocepacia* MSR2 en el sustrato, es capaz de sobrevivir a condiciones de invernadero, por lo que pudiera ser utilizada como agente de biocontrol de la fusariosis en campo.

## VII. Bibliografía

- Abdel-Kader, M., El-Mougy, N. S., & Lashin, S. M. (2011). Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, 51(3), 306–313. <https://doi.org/10.2478/v10045-011-0050-8>
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Fifth Ed. Academic Press, Burlington. 635p.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Arbeláez Torres, G. (2000). Aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17, 11–16.
- Arnou, L. E. (1937). Colorimetric Determination of the Components of 3-4 Didihydroxyphenylamine-Tyrosine Mixtures. *The Journal of Biological Chemistry*, 118, 531–538.
- Barrera Galicia, G. C. (2016). *Análisis y caracterización de sideróforos producidos por rizobacterias para el control de la antracnosis causada por Colletotrichum gloeosporioides en frutos de aguacate (Tesis de maestría)*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Beadle, G. W. (1939). Teosinte and the origin of Maize. *Journal of Heredity*, 30(6), 245–247. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104728>
- Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (2000). Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, 31(3–4), 225–231. <https://doi.org/10.1007/s003740050649>
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), 102–108.
- Bullerman, L. B. (2003). Fungi in Food – An Overview. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Ed, pp. 5511–5522).

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01129-9>

- Burkholder, W. H. (1950). Sour skin, a bacterial rot. *Phytopathology*, 40(1), 115–117. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500300856>
- Caligiore Gei, P. F., Valdez, J. G., Piccolo, R. J., & Rómulo Galmarini, C. (2014). Influence of Fusarium spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. *Tropical Plant Pathology*, 39(1), 19–27.
- Chaudhary, D. P., Kumar, S., & Singh, S. (2014). *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. (D. P. Chaudhary, S. Kumar, & S. Langyan, Eds.). New Delhi: Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1623-0>
- CIMMYT, P. S. de M. (1997). Seminario Taller de Cosecha de Maíces de la Zona Andina. In *Memorias Reunión Internacional de Diagnóstico y Enfermedades de Maíz*" (pp. 1–86). Tarija, Bolivia: 10-11 abril de 1997.
- Coca Morante, M. (2011). Fusariosis del maíz. *Boletín Técnico. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias "Dr. Martín Cárdenas" Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia*, 5(1), 4pp.
- Cooke, B. M. (2006). Disease assessment and yield loss. In *The Epidemiology of Plant Diseases*. Cooke B., Jones D., Kaye B. (eds) (pp. 43–94). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/1-4020-4581-6\\_2](https://doi.org/1-4020-4581-6_2)
- Csáky, T. (1948). On the Estimation of Bound Hydroxylamine in Biological Materials. *Acta Chemica Scandinavica*, 2, 450–454.
- De la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin –síntesis y Función en la interacción Fusarium verticillioides-maíz. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.
- Dixon, G. R., & Tilston, E. L. (2010). *Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment*. In: Dixon G., Tilston E. (eds) *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. Springer, Dordrecht.
- Eberl, L., & Vandamme, P. (2016). Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev), 1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>
- Elad, Y., & Baker, R. (1985). The Role of Competition for Iron and Carbon in Suppression of Chlamydo-spore Germination of Fusarium spp. by Pseudomonas spp. *The American Phytopathological Society*, 75(9), 1053–1059.
- Essén, S. A., Bylund, D., Holmström, S. J. M., Moberg, M., & Lundström, U. S. (2006). Quantification of hydroxamate siderophores in soil solutions of podzolic soil profiles in Sweden. *BioMetals*, 19(3), 269–282. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-8418-8>

- Fernández-Herrera, E., Martínez-Rentería, M. E., Moreno-Salazar, S. F., Jiménez-Peña, N., & Ramírez-Bustos, I. I. (2018). Bacterias de la rizosfera de garbanzo con capacidad antagónica a hongos fitopatógenos y de promoción del crecimiento de la planta. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21, 557–568.
- Figuroa-Rivera, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., Jiménez-Bremont, J. F., ... Mendoza-Elos, M. (2010). Caracterización de Especies de Fusarium Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 124–134. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- FIRA. (2016). *Panorama Agroalimentario | Maíz 2016*.
- Gallardo-Reyes, E. D., Ibarra-Moreno, G. M., Sánchez-Mariñez, R. I., Cuamea-Cruz, G., Molina-Gil, D., Parra-Vergara, N. V., ... Cortez-Rocha, M. O. (2006). Micobiota de Maíz ( *Zea mays* L .) Recién Cosechado y Producción de Fumonisina B1 por Cepas de *Fusarium verticillioides* ( Sacc .) Nirenb . *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 27–34.
- Gilbertson, R. L., Brown, W. M., Ruppel, E. G., & Capinera, J. L. (1986). Association of Corn Stalk Rot *Fusarium* spp . and Western Corn Rootworm Beetles in Colorado. *Phytopathology*, 76(12), 1309–1314. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-1309>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed., Vol. 1). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A. N., & Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA , sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VI(1), 6–13.
- Hernández Juárez, A., Aguirre Uribe, L. A., Flores Dávila, M., Cerna Chávez, E., Landeros Flores, J., Ochoa Fuentes, Y. M., & Frías Treviño, G. A. (2016). Incidencia y severidad de pudrición de mazorcas de maíz genéticamente modificado y convencional en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6), 1477–1484.
- Heydari, A., & Misaghi, I. J. (1998). Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant and Soil*, 202, 109–116.
- Ho, Y.-N., & Huang, C.-C. (2015). Draft Genome Sequence of *Burkholderia cenocepacia* Strain 869T2, a Plant-Beneficial Endophytic Bacterium. *Genome Announcements*, 3(6), e01327-15–e01327-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01327-15>

- Jáuregui Rosas, M. G. (2017). *Evaluación de parentales de maíz (Zea mays L.) a la infección por el fitopatógeno Fusarium nygamai bajo condiciones de invernadero (Tesis de Licenciatura)*. Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui.
- Kurek, E., & Jaroszk-Ściseł, J. (2003). Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control*, 26(1), 48–56. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00115-9)
- Leyva Madrigal, K. Y., Larralde Corona, C. P., Calderón Vázquez, C. L., & Maldonado Mendoza, I. E. (2014). Genome distribution and validation of novel microsatellite markers of *Fusarium verticillioides* and their transferability to other *Fusarium* species. *Journal of Microbiological Methods*, 101, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.03.011>
- Liu, L., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1995). Induction of Systemic Resistance in Cucumber Against *Fusarium* Wilt by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *The American Phytopathological Society*, 85(6), 695–698.
- Loper, J. E., & Buyer, J. S. (1991). Siderophore in Microbial Interaction on Plant Surface. *Molecular Plant- Microbe Interaction*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-005>
- López, V. L., Hernández Cruz, M. A., Fernández Dávila, S., & Mendoza Herrera, A. (2015). Diversidad bacteriana en raíces de maíz híbrido convencional y genéticamente modificado. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 01(899), 233–243.
- Mahdy, A. M., Sagitov, A. O., & Ahmed, G. A. (2011). Biological control of cucumber *Fusarium* wilt disease using *Chaetomium* and *Penicillium* isolates under protected houses. *Issledovaniye Rezul'taty*, 1, 90–95.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Cordero-Ramírez, J. D., & Figueroa-López, A. M. (2010). *Búsqueda de bacterias benéficas para el control de fusariosis en maíz*. Fundación Produce Sinaloa A.C.
- Matsumoto, K., Ozawa, T., Jitsukawa, K., & Masuda, H. (2004). Synthesis, solution behavior, thermal stability, and biological activity of an Fe(III) complex of an artificial siderophore with intramolecular hydrogen bonding networks. *Inorganic Chemistry*, 43(26), 8538–8546. <https://doi.org/10.1021/ic048761g>
- Méndez-Puentes, C. A., Camacho-Suárez, J. G., & Echeverry-Hernández, S. (2015). Identificación de bacterias y hongos en el aire de Neiva, Colombia. *Salud Pública*, 17(5), 728–737. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/rsap.v17n5.3846>
- Meyer, J.-M., Hohnadel, D., & Hallé, F. (1989). Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J Gen Microbiol*, 135(6), 1479–1487. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-6-1479>

- Meyer, J. M., Van, V. T., Stintzi, A., Berge, O., & Winkelmann, G. (1995). Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). *Biometals*, 8(4), 309–317. <https://doi.org/10.1007/BF00141604>
- Miethke, M., & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Moebius, N., Üzümlü, Z., Dijksterhuis, J., Lackner, G., & Hertweck, C. (2014). Active invasion of bacteria into living fungal cells. *eLife*, 3, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.03007>
- Munkvold, G. P. (2002). Crown rot symptoms common in corn. *Integrated Crop Managements News*, 488(15), 125–126.
- Munkvold, G. P., & Desjardins, A. E. (1997). Fumonisin in Maize. Can We Reduce Their occurrence. *Plant Disease*, 81(6), 556–565.
- Murillo, I., Cavallarin, L., & San Segundo, B. (1999). Cytology of Infection of Maize Seedlings by *Fusarium moniliforme* and Immunolocalization of the Pathogenesis-Related PRms Protein. *Phytopathology*, 89(9), 737–747.
- Neilands, J. B. (1952). A Crystalline Organo-Iron Pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). *Journal of the American Chemical Society*, 74(19), 4846–4847. <https://doi.org/10.1021/ja01139a033>
- O' Donnell, K., & Nirenberg, H. I. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434–458.
- Oliva-Ortiz, L. del C., Velázquez-Alcaraz, T. de J., Sosa-Pérez, R., Partida-Ruvalcaba, L., Díaz-Valdés, T., Arciniega-Ramos, J., & López-Orona, C. A. (2017). Control de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. *Agrociencia*, 51(6), 683–695.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., & Violic, A. D. (2001). *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*. Roma, Italia: Depósito de documentos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Parke, J. L., & Gurian-Sherman, D. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and Implication for Risk Assessment of Biological Control Strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 225–258.
- Parra González, E., Centeno Briceño, S., & Araque Calderón, Y. (2009). Artículo original Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 103–109.
- Partida-Martinez, L. P., & Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours

- endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437(7060), 884–888. <https://doi.org/10.1038/nature03997>
- Pereira, P., Nesci, A., & Etcheverry, M. (2007). Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biological Control*, 42(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.015>
- Programa de maíz del CIMMYT. (2004). *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo*. (CIMMYT, Ed.) (Cuarta). México, D.F.
- Raza, W., Ling, N., Zhang, R., Huang, Q., Xu, Y., & Qirong, S. (2016). Critical Reviews in Biotechnology Success evaluation of the biological control of *Fusarium* wilts of cucumber , banana , and tomato since 2000 and future research strategies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 00(00), 1–11. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1130683>
- Riley, R. T., Norred, W. P., & Bacon, C. W. (1993). Fungal Toxins in foods: Recent Concerns. *Annual Review of Nutrition*, 13, 167–189. <https://doi.org/10.1016/j.optha.2017.06.009>
- Rojas-Rojas, F. U., López-Sánchez, D., Meza-Radilla, G., Méndez-Canarios, A., Ibarra, J. A., & Estrada-de los Santos, P. (2018). El controvertido complejo *Burkholderia cepacia* , un y patógenas de plantas , animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2 : ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(529), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: A mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303–317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Salete Mota, M., Bauer Gomes, C., Souza Júnior, T. I., & Bittencourt Moura, A. (2016). Bacterial selection for biological control of plant disease : criterion determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M. del C., Peña-Cabriales, J. J., & Farías-Rodríguez, R. (2009). *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos Role of siderophores in antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 against plant fungi. *Terra Latinoamericana*, 28, 53–60.
- Saraf, M., Pandya, U., & Thakkar, A. (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological*

- Research*, 169(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.009>
- Scher, F. M., & Baker, R. (1982). Effect of *Pseudomonas putida* and a Synthetic Iron Chelator on Induction of Soil Suppressiveness to *Fusarium* Wilt Pathogens. *Phytopathology*, 72(12), 1567–1573.
- Sepúlveda R, P. (2016). *Fusariosis en maíz (Ficha Técnica 09)*. INIA La Platina. Chile.
- Serrano Carreón, L., & Galindo Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 85, 77–88.
- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., ... Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.006>
- Simko, I., & Piepho, H.-P. (2012). The Area Under the Disease Progress Stairs: Calculation, Advantage, and Application. *Phytopathology*, 102(4), 381–389. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0216>
- Sokol, P. A. (1986). Production and utilization of pyochelin by clinical isolates of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(3), 560–562.
- Soonthornpoc, P., Trevathan, L. E., & Ingram, D. (2000). The colonization of maize seedling roots and rhizosphere by *Fusarium* spp. in Mississippi in two soil types under conventional tillage and no-tillage systems. *Phytoprotection*, 81(3), 97. <https://doi.org/10.7202/706203ar>
- Sumalan, R. M., Alexa, E., & Poiana, M. A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-32>
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Retrato Microbiológico. Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182005000100001>
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., & Heydrich, M. (2007). Antagonismo de cepas *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Protección Vegetal*, 22(1), 41–46.
- Vala, A. K., Dave, B. P., & Dube, H. C. (2006). Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial aspergilli. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(6), 603–607. <https://doi.org/10.1139/w06-012>
- Valencia-Cantero, E., Villegas-Moreno, J., Sánchez-Yáñez, J. M., Peña-Cabriales, J. J., & Farías-Rodríguez, R. (2005). Inhibición de *Fusarium oxysporum* por

cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *TERRA Latinoamericana*, 23(1), 81–88. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/573/57323111.pdf>

- Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363–374.
- Vélez Calvo, P., Meneses, L. R., & Zúñiga Dávila, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa ( *Solanum tuberosum* ) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 141–148.
- Venegas García, M. del R. S. (2016). Producción y comercialización del maíz en México, cobertura de riesgo con derivados. In *21° Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México* (pp. 1–21). Mérida, Yucatán: 15 al 18 de noviembre de 2016.
- Venner Rodríguez, C., & Martín Hernández, M. J. (2009). *Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de Uchuva (Physalis peruviana L.) con capacidad antagónica frente a Fusarium sp. (Tesis de licenciatura)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487–511.

## Anexos

### Anexo I

#### Solución indicadora CAS

En un matraz Erlenmeyer, se disuelven 21.9 mg de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) en 25 mL de dH<sub>2</sub>O en agitación constante. En otro matraz Erlenmeyer, se hace una segunda mezcla con 1.5 mL de 1 mM FeCl<sub>3</sub> (en 10 mM HCl) con 7.5 mL de 2 mM de CAS. La segunda mezcla se vacía muy lentamente en la primera; la solución resultante, se pasa a un matraz volumétrico de 100 mL, llamándola solución colorante. En un matraz diferente, se prepara la solución buffer disolviendo 9.76 g de MES en 50 mL de dH<sub>2</sub>O. Se ajusta el pH a 5.6 con KOH 50 %. Por último, se añade la solución buffer al matraz volumétrico que contenía la solución colorante, aforando con dH<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 100 mL.

#### Medio mínimo M9

Reactivo	Cantidad (para 1 L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl concentrado o KOH y esterilizar la solución salina en autoclave a 1 atm a 121 °C durante 15 min.

MgSO <sub>4</sub> (1 M)*	2.0 mL
Glucosa (20%)*	10.0 mL

CaCl<sub>2</sub> (1 M)\*

0.1 mL

---

\* Esterilizar por separado en autoclave a 1 atm, 121 °C durante 15 min. Agregar a la solución salina la cantidad necesaria

---

### **Medio Cromo Azurol Sulfonato (CAS) agar**

#### **A.- Solución Colorante Azul**

- a) Disolver 60.5 mg de CAS en 50 mL de agua
- b) Preparar 10 mL de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mM (disuelto en HCl 10 mM).
- c) Preparar 40 mL de una solución de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) a una concentración de 1.82 mg/mL adicionado en agitación constante.

Mezclar cuidadosamente a) + b) y agregar c) en agitación lenta. Luego esterilizar a 1 atm, 121 °C durante 15 min.

#### **B.- Solución salina amortiguadora**

Disolver 30.24 g PIPES en 750 mL de una solución salina con la siguiente composición:

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.3 g
- NaCl = 0.5 g
- NH<sub>4</sub>Cl = 1.0 g

Ajustar pH 6.8 utilizando KOH 50 %, agregar 50 mL de agua destilada para obtener un volumen final de 800 mL. Agregar 15 g de agar bacteriológico y esterilizar a 1 atm, 121 °C durante 15 min.

#### C.- Solución nutritiva

Preparar 70 mL de una solución:

- 2 g glucosa
- 2 g manitol
- 493 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 11 mg  $\text{CaCl}_2$
- 1.17 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1.4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0.004 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 1.2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Esterilizar en autoclave a 1 atm, 121 °C durante 15 min.

Mezclar cuidadosamente A+B y agregar C en agitación lenta para evitar la formación de burbujas. El resultado es una solución azul intensa.

#### D.- Solución de Casaminoácidos

Esterilizar por filtración (filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ ) 30 mL de casaminoácidos (10% p/v) y agregar al matraz de 2 L que contiene las soluciones A, B y C.

#### **Solución Wiston**

Para 100 mL disolver: 1 g de SDS; 2 mL de Tritón 100X; 584 mg de NaCl; 157 mg de Tris HCl; 37.224 mg de EDTA.