

Efecto antifúngico *in vitro* de bacterias aisladas de vegetales sobre 3 hongos fitopatógenos

Mendoza Buenrostro, E.^{1*} • Castro Rosas, J.¹ • Rangel Vargas, E.¹
Gómez-Aldapa, C.A.¹ • Villagómez Ibarra, J.R.¹

Palabras clave: control biológico, antagonismo, *Fusarium*
Key words: biologic control, antagonism, *Fusarium*

Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es originario de centro América (Perú, Bolivia, Ecuador); sin embargo, su domesticación fue en el sur de México y norte de Guatemala. Los nativos lo cultivaban antes de la conquista de América, pero a partir del siglo XIX, es cuando toma gran relevancia económica en todo el mundo [1]. En la actualidad, el jitomate se considera como una de las hortalizas más importantes; después de la papa, es el más consumido en el mundo ya que tiene una alta demanda por su valor nutricional y por su uso a nivel industrial. La producción de jitomate ha ido en aumento a nivel mundial en los últimos años, entre los principales países productores se encuentra México, ocupando el décimo lugar a nivel mundial [2]. La importancia de la producción del ji-

tomate en México radica en que representa un alto valor comercial, respecto a otro tipo de cultivos. En el estado de Sonora, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades, alcanzando pérdidas de hasta 100% de la producción [3].

Muchas de las enfermedades que afectan al jitomate, representan una limitante para el rendimiento de la producción. En la actualidad existen cerca de 58 enfermedades que atacan este cultivo. Entre los patógenos que originan estas enfermedades destacan los hongos fitopatógenos, los cuales causan pérdidas importantes en el rendimiento del cultivo. Estos se encuentran de manera natural en suelos agrícolas ocasionando destrucción de tejidos de la hoja de la planta huésped, tallo y raíces; conduciendo al bloque

1 Área Académica de Química, Ciudad del Conocimiento, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera-Pachuca Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma, C.P. 42184, Hidalgo, México. Teléfono: 771 717 2000 ext. 2516.

* me306997@uaeh.edu.mx



del flujo de nutrientes de la planta y como resultado su muerte [4].

El uso de pesticidas ha sido una de las opciones más efectivas para controlar la invasión de plagas en cultivos; sin embargo, existen efectos dañinos bien documentados de estos como lo son: la degradación de los recursos naturales, la contaminación del medio ambiente y la toxicidad a los usuarios. Además, el uso de pesticidas aumenta los costos de producción, lo cual hace menos rentable su uso. Otro aspecto importante, es el hecho que actualmente las plagas han generado una resistencia a los pesticidas, aumentando la dificultad para erradicarlas.

Una alternativa al uso de estos pesticidas es el control biológico. Mediante éste, se pueden controlar agentes biológicos fitopatógenos de los cultivos. En el control biológico se utilizan depredadores naturales o parasitoides, sustancias naturales (como derivados de plantas) o el de microorganismos y virus [5]. Las bacterias como control de enfermedades causadas por hongos juegan un papel importante, ya que en la actualidad varios estudios han demostrado su eficacia para inhibir el crecimiento de estos patógenos

La Fusariosis es una de las enfermedades fúngicas más comunes de los cultivos de jitomate y puede provocar la pérdida de la cosecha [6]. Actualmente, la única manera de controlar la Fusariosis es con fungicidas. En estudios recientes, se ha trabajado con control de *Fusarium* con bacterias, pero los estudios siguen siendo limitados. Por lo tanto, se aislarán bacterias de la microbiota de vegetales y del suelo, y se determinará su efecto inhibitorio contra especies de *Fusarium in vitro*.

Metodología

Aislamiento de bacterias

Se obtuvieron diferentes muestras de frutos, hoja de diferentes árboles y vegetales y suelo de jardín. Para el aislamiento de las bacterias se empleó la metodología descrita por Ghazanfar et al. (2016) con algunas modificaciones [7]. Las muestras (aprox. 30 g) fueron colocadas en bolsas de plástico; a cada muestra se les adicionó 200 mL de diluyente de peptona y se frotó manualmente desde fuera de la bolsa por 1 minuto. Se realizaron diluciones decimales de las muestras diluidas y las diluciones se sembraron (0.1 mL) en ca-

jas que contenían agar para métodos estándar (AME) solidificado mediante la técnica de extensión por superficie. Las cajas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas. A partir con cajas de cultivo con entre 20 a 100 UFC bien separadas, se seleccionaron entre 2 y 4 UFC con características morfológicas diferentes. A cada colonia se le realizó tinción de Gram. Las bacterias aisladas se sembraron en tubos de cultivo con AME inclinado y se incubaron a 35 °C por 24 h. Las cepas bacterianas fueron almacenadas en refrigeración hasta su uso.

Efecto antifúngico de las bacterias aisladas contra 3 hongos fitopatógenos

En todos los estudios se utilizaron las cepas: *F. oxysporum* ATCC MYA-1198 y *F. brachygibbosum* UAEHJ1 y un hongo recién aislado de plantas de jitomate enfermas y el que no ha sido identificado. Las cepas bacterianas aisladas se sembraron en tubos de caldo soya tripticaseína y se incubaron a 35 °C por 24 horas. La actividad antifúngica de todas las bacterias contra las especies de *Fusarium* se determinó mediante la técnica de crecimiento dual descrita por Ghazanfar et al. (2016), con algunas modificaciones. Con un asa bacteriológica se tomó el micelio fúngico (a partir de cajas previamente cultivadas), y se sembró en cajas que contenían agar papa dextrosa (PDA) solidificado. El hongo se sembró sobre la parte central de la caja de cultivo. Después la caja se dividió en 4 cuadrantes imaginarios y a un centímetro de distancia del inoculo del hongo en cada uno de los cuadrantes se inocularon con una concentración de 20 microlitros de las bacterias aisladas. Es importante señalar que se probó una sola bacteria por cada caja de cultivo sembrada con las especies fúngicas antes mencionadas. Como control se incluyeron cajas sembradas de la misma manera pero que no fueron inoculadas con los cultivos bacterianos. Todas las cajas de incubaron a 30 °C por 5 a 7 días. Se realizaron observaciones y registro del diámetro de crecimiento fúngico cada día.

Resultados y discusión

Se aislaron 70 cepas bacterianas con diferentes características macroscópicas de la colonia y microscopias (Figura 1). En las cajas de cultivo se observaron colonias planas, elevadas, mucoides y con crecimiento en

forma de “swarming”. También al microscopio se observaron diferentes morfologías celulares (Figura 1).

Se evaluó el efecto antifúngico de las 70 cepas bacterianas (Figura 2). Las 70 cepas mostraron algún efecto antifúngico de contra *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum* y hongo aislado de planta de jitomate; no obstante, solo 15 cepas tuvieron los mayores niveles de efecto antifúngico contra *F. oxysporum* (Figura 3), 21 cepas para *F. brachygibbosum* (Figura 4) y 24 cepas para el hongo aislado de la planta de jitomate (Figura 5).

Para el caso de *F. oxysporum* de las 15 cepas bacterianas, solo 4 cepas (B17, B48, B50 y B54) presentaron el mayor efecto antifúngico contra el crecimiento radial del hongo en comparación con el crecimiento de *F. oxysporum* libre de bacterias. Es interesante señalar que las cepas que presentaron el mayor efecto

antifúngico contra *F. oxysporum* fueron aisladas de zanahorias (B17), de duraznos inmaduros (B48) y hojas (B50) y suelo (B54). Es altamente probable que estas bacterias estuvieran colonizando tanto la zanahoria como los frutos de durazno y no de manera pasiva o que hubieran llegado por contaminación arrastradas por el polvo del ambiente. Es probable también que el árbol o el follaje estén colonizados por este tipo de bacterias. Cabe mencionar además que las cepas B17, B48, B50 y B54 microscópicamente presentan marcadas diferencias lo cual sugiere que son distintas bacterias.

Los resultados hasta el momento sugieren la posibilidad de poder usar a las cepas B17, B48, B50 y B54 para el control biológico de *F. oxysporum* en el cultivo de jitomate.



Figura 1. Fotos de tinción Gram de algunas cepas aisladas de frutos, hojas y suelo.

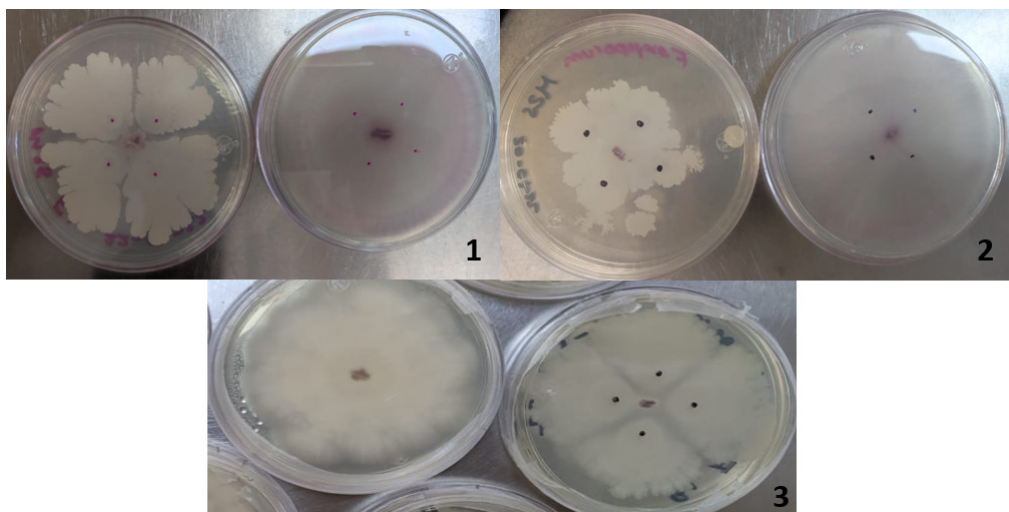


Figura 2. Fotos de algunas de las cepas bacterianas en donde se observa su efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* (1), *F. brachygibbosum* (2) y el hongo aislado de la planta de jitomate enferma (3) en comparación con el control libre de bacterias.

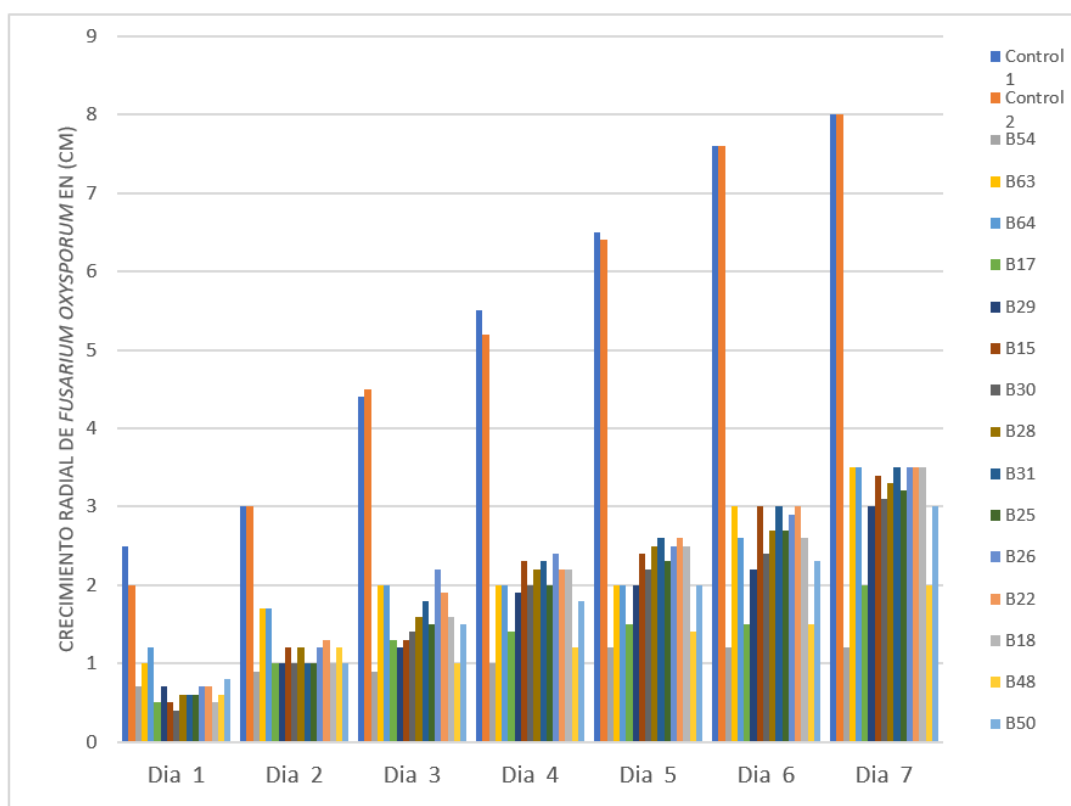


Figura 3. Actividad inhibitoria de las 15 cepas con mayor efecto fúngico sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio de cultivo.

Para el caso de *F. brachygibbosum* de las 21 cepas bacterianas, solo 4 cepas (B19, B55, B50 y B54) presentaron el mayor efecto antifúngico contra el crecimiento radial del hongo en comparación con el crecimiento de *F. brachygibbosum* libre de bacterias (Figura 4). En este caso el estudio se concluyó a los 6 días debido a que el crecimiento radial de *F. brachygibbosum* en las cajas control o libre de bacterias, alcanzó por completo las paredes de las cajas de cultivo al sexto día de incubación (Figuras 2 y 4). Para el caso de las cepas que presentaron el mayor efecto antifúngico contra *F. brachygibbosum* fueron aisladas de limones (B19), de hojas (B50, B55) y suelo (B54).

En este caso *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum* comparten bacterias que provocaron su inhibición (B50 y B54), lo cual refleja que estas bacterias presentan mecanismos de acción que perjudican a ambos hongos, posteriormente se pretende averiguar qué mecanismos están empleando las bacterias ante la presencia de estos hongos fitopatógenos del jitomate.

Los resultados sugieren la posibilidad de emplear

las cepas (B19, B55, B50 y B54) para el control biológico de *F. brachygibbosum* en el cultivo de jitomate.

Para el caso del hongo aislado de una planta de jitomate enferma, de las 24 cepas bacterianas, solo 4 cepas (B12, B14, B15 y B16) presentaron el mayor efecto antifúngico contra el crecimiento radial del hongo en comparación con el crecimiento libre de bacterias (Figura 5).

Las cepas que presentaron el mayor efecto antifúngico contra el hongo aislado de la planta enferma de jitomate fueron aisladas de jitomate (B12) y de espinacas (B14, B15, B16).

En estudios posteriores serán identificadas las cepas que presentaron mayor efecto en los 3 hongos mediante secuenciación del gen 16s ARNr y se evaluará su efecto antagónico sobre el crecimiento del hongo directamente en el follaje, raíz y frutos de jitomate. También se hará la identificación molecular del hongo aislado de la planta enferma de jitomate para conocer la especie.

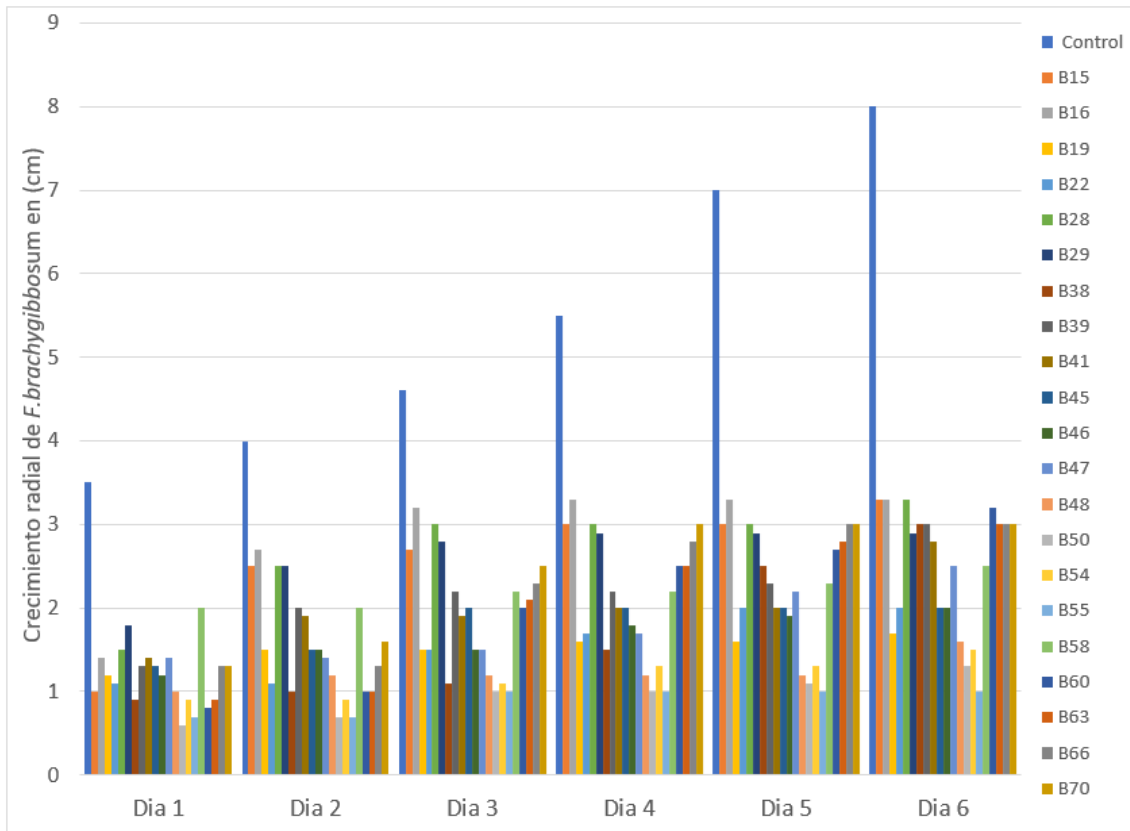


Figura 4. Actividad inhibitoria de las 21 cepas con mayor efecto fúngico sobre el crecimiento radial de *F. brachygibbosum* en medio de cultivo.

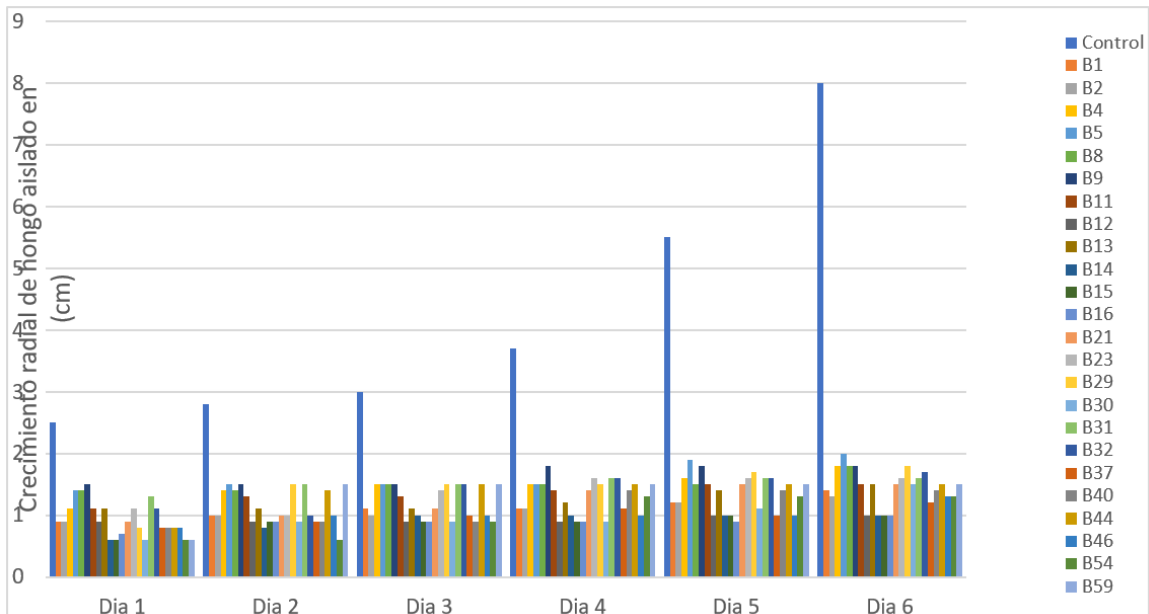


Figura 5. Actividad inhibitoria de las 24 cepas con mayor efecto fúngico sobre el crecimiento radial del hongo aislado en medio de cultivo

Conclusión

Las 70 cepas aisladas, solo 15 presentaron un efecto antifúngico mayor contra el crecimiento radial de *F. oxysporum*, 21 cepas contra el crecimiento radial de *F. brachygibbosum* y 24 cepas contra el crecimiento radial del hongo aislado de la planta de jitomate en medio de cultivo. Las cepas (B17, B48, B50 y B54) presentaron el mayor efecto antagónico contra *F. oxysporum*, in vitro. Para el caso de *F. brachygibbosum*, las mejores cepas in vitro fueron: (B19, B55, B50 y B54), y para el hongo aislado de la planta de jitomate enferma las cepas más efectivas in vitro fueron: (B12, B14, B15 y B16).

A manera de conclusión estas cepas tienen un alto potencial contra estos hongos, siendo una alternativa sustentable al uso de pesticidas, y mostrando un horizonte prometedor en la reducción potencial de contaminantes en el medio ambiente que afectan la salud humana. No obstante, es necesario identificar a estas cepas bacterianas, así como evaluar su efecto antagónico sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, *F. brachygibbosum* y el hongo aislado de la planta de jitomate (que también será identificado molecularmente en estudios posteriores), directamente en plantas y frutos de jitomate.

Referencias

1. Okumoto S. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Published online 1992. Accessed August 9, 2022. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/4857>
2. Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba, Ruiz-López, Norrie, Hernández-Carmona. (PDF) Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). Published 2014. Accessed August 9, 2022. https://www.researchgate.net/publication/257577542_Effect_of_liquid_seaweed_extract_on_growth_of_tomato_seedlings_Solanum_lycopersicum_L
3. Martínez-Ruiz FE, Cervantes-Díaz L, Aíl-Catzím CE, Hernández-Montiel LG, Sánchez CLDT, Rueda-Puente EO. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *Eur Sci J ESJ*. 2016;12(18):232-232. doi:10.19044/esj.2016.v12n18p232
4. Zhang Q, Yang L, Zhang J, et al. Production of anti-fungal volatiles by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and its efficacy in suppression of Verticillium wilt of cotton - Washington State University. Published 2015. Accessed August 9, 2022. <https://rex.libraries.wsu.edu/esploro/outputs/journalArticle/Production-of-anti-fungal-volatiles-by-non-pathogenic/99900548396001842>
5. Patil S, Sriram S. Biological control of *Fusarium* wilt in crop plants using non-pathogenic isolates of *Fusarium* species. *Indian Phytopathol*. 2020;73(1):11-19. doi:10.1007/s42360-020-00202-5
6. Parasuraman P, Pattnaik SS, Busi S, Marraiki N, Elgorban AM, Syed A. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their biocontrol efficacy against phytopathogens of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol*. 2022;156(1):164-170. doi:10.1080/11263504.2020.1845842
7. Ghazanfar M, Hussain M, Hamid MI, Ansari S. (PDF) Utilization of Biological control agents for the management of postharvest pathogens of tomato. Published September 10, 2016. Accessed August 9, 2022. https://www.researchgate.net/publication/314367889_UTILIZATION_OF_BIOLOGICAL_CONTROL_AGENTS_FOR_THE_MANAGEMENT_OF_POSTHARVEST_PATHOGENS_OF_TOMATO