

Bioprospección de microorganismos de suelo agrícola como antagonistas frente a cepas de *Fusarium oxysporum*

Vargas Campos, S.S.¹, Reyes Nava, L. A.¹, Pliego Sandoval, J. E.¹, Iñiguez Muñoz, L.E.¹

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur, Av. Enrique Arreola Silva No. 883, Colonia Centro, 49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Tel: +52 (341) 575 2222. luis.reyes@cusur.udg.mx

Palabras clave: inhibición, bacteria, hongo, biocontrol

Introducción

Los rendimientos en la producción de hortalizas y otros cultivos presentes en la canasta básica se ven gravemente disminuidos a causa de las enfermedades, principalmente fúngicas destacando las ocasionadas por hongos del suelo como: *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Rhizoctonia solani* Kühn. Sin embargo, por los daños que producen y la frecuencia con que se presentan, *Fusarium* spp. Es el género de mayor importancia puesto que origina síntomas como son marchitamiento debido al debilitamiento de los peciolos, retardo en el crecimiento, pudrición radicular, del tallo y del fruto, además es de gravedad la capacidad que tiene el género, principalmente la especie *Fusarium oxysporum* por hacer asociaciones con otros fitopatógenos ya que este se encuentra en el complejo de hongos causantes del *Damping-off* [1].

Por su gran diversidad genética *Fusarium* spp. posee alta capacidad de adaptación a condiciones desfavorables de temperatura, nutriente y pH por lo que puede sobrevivir en el suelo por bastante tiempo en ausencia de sus anfitriones, y si se encuentra una planta hospedera, la infección puede iniciar en raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua. La especie *F. oxysporum* posee un amplio rango hospedero, este hongo de forma asintomática penetra por la raíz, posteriormente coloniza el tejido vascular y desencadena un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas de la planta. Hay diferentes síndromes de fusariosis como el síndrome de Marchitez vascular y Amarillez Vascular, que son ocasionados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* del mismo modo, el síndrome de “Marchitez y Podredumbre de Raíz” es asociado con infecciones causadas por diversos hongos de suelo incluyendo *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, varias subespecies de *F. solani* y *F. redolens* [2].

Para controlar enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se emplean diversos fungicidas de acción protectora y algunos de carácter sistémico, pero hasta ahora no existen agentes químicos eficaces y económicamente viables para ello, una vez que el suelo es infectado por *F. oxysporum* sus esporas pueden estar latentes durante largos períodos de tiempo [3], por ello cada vez es más el interés por estudiar, aislar y aprovechar los microorganismos antagonistas para atacar a los fitopatógenos.

Algunos microorganismos, especialmente aquellos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* han mostrado un alto potencial como antagonistas de fitopatógenos por los diversos mecanismos de acción como son, el parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, producción de sustancias antimicrobianas o enzimáticas y la resistencia inducida en la planta hospedera, que en consecuencia, reducen tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad [4]. Dado que contienen diversos mecanismos de acción, el hongo fitopatógeno no genera resistencia inmediata, en cambio los productos químicos que atacan un sitio específico es muy probable que generen resistencia en los hongos.

Algunos investigadores han reportado asociaciones de *Glomus intraradices* con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* que inhiben la germinación de los hongos fitopatógenos (*F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*) causantes de la rabia en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) [5]. Del mismo modo algunos autores sugieren que las cepas bacterianas autóctonas de determinados ecosistemas, comparadas con cepas exóticas, podrían tener mayor eficiencia como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y agentes de biocontrol [6]. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagonista *in vitro* que tienen microorganismos aislados de suelos agrícolas contra cepas de *Fusarium oxysporum*.

Metodología

La cepa de *Fusarium oxysporum* fue donada por el Dr. Douglas Rodríguez Martínez, de Horti-Frut, Zapotiltic, Jalisco. La cepa se propagó, conservó y guardó para estudios posteriores.

Para el aislamiento de los microorganismos, se muestrearon 3 predios: Rancho Greengold, Rancho La Catarina y un predio en Gómez Farías, Jalisco. Se tomaron aproximadamente 10g de la rizosfera de plantas de berries, 10g a 10cm de profundidad del suelo y 10g a los 20cm del suelo. Las muestras se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL estériles hasta su posterior uso. Para preparar las muestras para el aislamiento, se pesó 1gr de suelo de cada muestra junto con las raíces (para el caso de la muestra de la rizósfera), luego se suspendieron en tubos de ensayo con 10ml de agua estéril, se agitó cada tubo en el vórtex por 1 minuto y se realizaron diluciones hasta 10^{-3} . De las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} se agregaron 10 μ L de cada muestra en cajas Petri de 60x15mm que contenían medio PDA (Papa Dextrosa Agar), y la gota se distribuyó por toda la caja con un asa bacteriológica, la siembra se hizo por duplicado. A los 4 días después de la siembra se seleccionaron los microorganismos que presentaban alguna actividad antagónica o de competencia.

Los hongos seleccionados se aislaron en cajas Petri de 60x15mm con medio PDA, tomando un cuadro de micelio de 5mm. Posteriormente se sembraron en matraces con 20 mL de medio PDA tomando un cuadro de 5mm de micelio. Se incubaron por 7 días a 30°C. Los hongos fueron conservados en caldo nutritivo con glicerol al 50% a -20°C para su uso posterior. Para el caso de bacterias y levaduras el método de selección fue igual al descrito anteriormente. Se aislaron por estriado en cajas Petri de 60x15mm que contenían Agar Nutritivo (AN). Después de tener la muestra pura se procedió a realizar duplicados de cada microorganismo por agotamiento, se incubaron por 5 días. Finalmente, los microorganismos fueron conservados en caldo nutritivo con glicerol al 50%, se guardaron en microtubos de 0.5mL previamente esterilizados y fueron almacenados a -20°C hasta su uso posterior en las pruebas. A los hongos se les hizo tinción con azul de lactofenol y a bacterias y levaduras tinción de Gram.

Se realizaron bioensayos para determinar el efecto antagónico de los microorganismos aislados por medio de la técnica de cultivo dual, en cajas Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo PDA; se inoculó una gota de 5 μ L de *F. oxysporum* en el centro de la caja de Petri y a los lados se colocaron 5 μ L de los hongos previamente conservados. Se incubaron por 7 días a una temperatura de 28 \pm 2°C. Se monitoreó el crecimiento cada día. Para las pruebas de antagonismo con bacterias y levaduras, el sembrado del hongo *F. oxysporum* se realizó igual que con la prueba de antagonismo con hongos, mientras que, las bacterias y levaduras fueron inoculadas en los extremos de la caja por estriado. Tanto en las pruebas de hongos como de bacterias y levaduras se tuvo un testigo (solo *F. oxysporum* sin antagonistas). El crecimiento radial de las colonias de antagonistas y fitopatógeno se midió cada 24 h después del tercer día, realizando las observaciones hasta los 7 días de incubación. La capacidad antagónica de los microorganismos fue evaluada a los siete días de post-inoculación, mediante el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), empleando la fórmula $PICR = \left[\frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100 \right]$; donde, PICR es el porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio del fitopatógeno; R1 fue el crecimiento de la colonia del patógeno-testigo; y R2 el crecimiento radial de la colonia del patógeno en confrontación en cultivo dual [7].

Resultados y discusión

Se aislaron un total de 20 cepas de hongos con códigos desde H1 hasta H20. También se aislaron 3 fueron levaduras y 6 bacterias. Estas últimas fueron Gram positivas y algunas presentaron endosporas.

A los 7 días de la prueba de antagonismo de los hongos aislados contra *F. oxysporum*, solo los hongos con códigos H12, H7, H17, H18, H19 y H9 mostraron inhibición (Figura 1). Se observaron cambios en la pigmentación del patógeno, siendo más fuerte en las partes donde había presencia de un hongo antagonista. El crecimiento de *F. oxysporum* frente al hongo H12, tuvo un color púrpura suave, en cambio frente al hongo H11 (que no tuvo actividad) se observó que *F. oxysporum* rodeó al hongo y el crecimiento de micelio no se limitó (figura 2), de igual forma paso con las pruebas realizadas con los hongos H5 y H6. En algunas investigaciones se ha reportado que diferentes microorganismos como bacterias del género *Bacillus* y hongos, son capaces de producir compuestos volátiles al momento de ser utilizados en pruebas de antagonismo contra hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* y *Botrytis cinérea*, provocando un cambio en la coloración del micelio de estos hongos fitopatógenos. Por lo que, los cambios de coloración observados

durante las pruebas de antagonismo contra *F. oxysporum*, realizadas en este trabajo, pueden atribuirse a la producción de metabolitos volátiles producidos por los microorganismos probados.

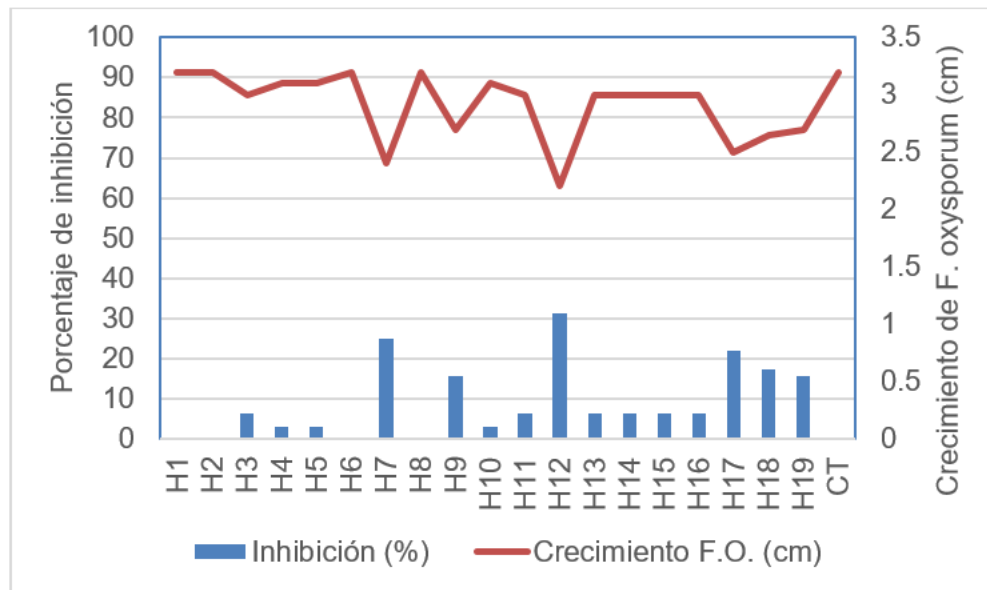


Figura 1. Porcentaje de inhibición de los hongos aislados contra *F. oxysporum*.

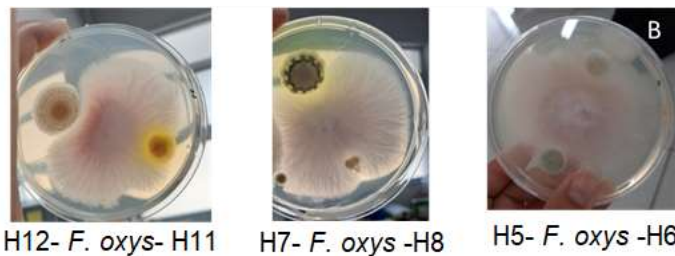


Figura 2. Prueba de antagonismo por cultivo dual en caja Petri.

Como se puede observar en la figura 1, el aislado fúngico H12 fue el que obtuvo la inhibición más alta contra *F. oxysporum*, con una inhibición del 31%, seguido de H7 y H17, con porcentajes de inhibición de 24% y 21%, respectivamente. Mientras que, los aislados H1, H2, H6 y H8 no fueron capaces de inhibir a este patógeno.

Al evaluar el efecto antagonístico de las bacterias y levaduras previamente aisladas se obtuvo que la bacteria con código BRB fue la que presentó mayor porcentaje de inhibición (71.05%) del crecimiento de *F. oxysporum*, seguida por la bacteria 8 y la levadura 13 que obtuvieron un porcentaje de inhibición del 53% y 23% respectivamente (figura 3).

F. oxysporum frente a bacterias que pueden contrarrestarlo cambia su manera de crecimiento, pretendiendo crecer hacia arriba ya que a los lados está limitado, en cambio cuando se enfrenta con microorganismos que no lo inhiben, como la bacteria R1 que no tiene algún efecto antagonista, *F. oxysporum* presenta un crecimiento muy similar a la prueba testigo (figura 4).

En una investigación, se mostraron resultados muy similares utilizando distintas cepas del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, etc.) contra hongos fitopatógenos como *Fusarium equiseti*, con inhibiciones de crecimiento que van desde 25% al 100% [7].

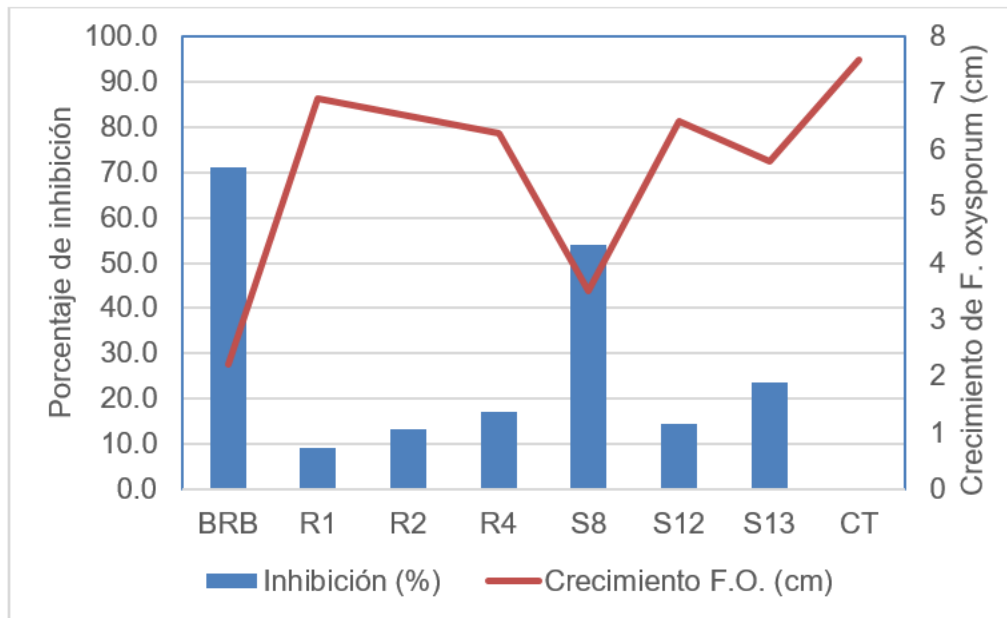


Figura 3. Porcentaje de inhibición de las bacterias y levaduras sobre *F. oxysporum*. CT, control sin antagonista.

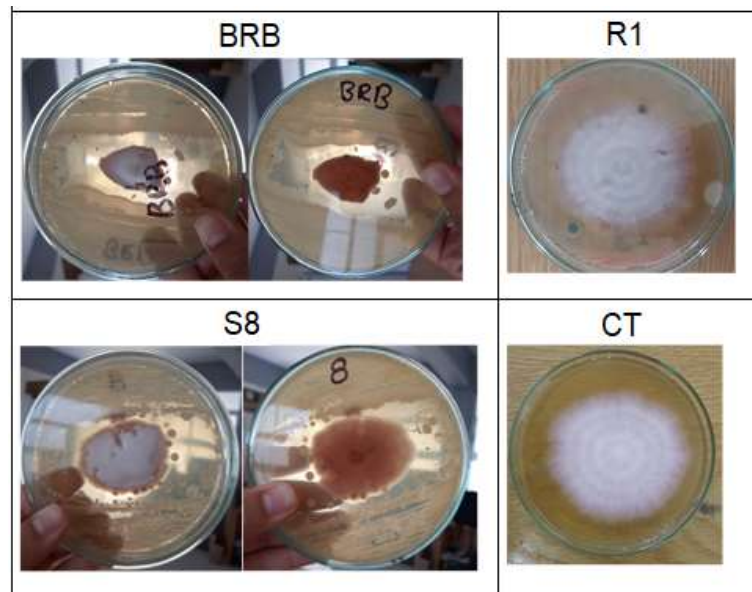


Figura 4. Prueba de antagonismo de bacterias y levaduras a los 7 días. CT, control sin antagonista.

Un resultado muy interesante que se debe profundizar en investigaciones futuras, fue el obtenido por la cepa BRB ya que presentó un alto efecto antagonista a *Fusarium*, y además, presenta un rápido crecimiento en caja Petri, lo que facilita su estudio y manejo.

Conclusiones

A partir de las muestras de suelo recolectadas, se obtuvieron 29 aislados, 20 corresponden a hongos, 6 bacterias y 3 levaduras, como producto de la preselección de cepas antagonistas a *F. oxysporum* se obtuvo 5 cepas de hongos con actividad antagonista de estos el hongo H12 Y H17 son los más destacados con un porcentaje de inhibición del 30% y 25% respectivamente; por parte de las bacterias y levaduras se obtuvieron 5 cepas que mostraron actividad: BRB, R4, S8, S12 y S13, de los cuales el aislado BRB fue el que presentó un mayor porcentaje de inhibición. Este último es de gran interés ya que tiene potencial para ser considerado como una alternativa al control biológico del *F. oxysporum*.

Bibliografía

1. Lugo Z., Sanabria N. (2001). Características culturales y patogénicas en aislamientos de *Fusarium oxysporum* F. sp. lycopersici procedentes de plantaciones comerciales de tomate. *Agronomía Tropical*, 51:(4), 519 - 530.
2. Jiménez-Fernández D., Navas Cortés J., Montes Borrego M., Jiménez-Díaz R., Landa B. (2011). Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* Yellows in Chickpea. *Plant Disease* [online] Vol. 95, Art. # 7. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-12-10-0946>. Consultado: 05 junio 2021.
3. Dita M., Waalwijkb C., Buddenhagen W., Souza Jr M. & Kema G. (28 febrero 2010) A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology* [online]. Vol. 59: 348–357; doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x. Consultado 05 junio 2021.
4. González R., Montealegre J. y Herrera R. (2004). Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* [online] Vol. 31, Art. #1. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2174014>. Consultado: 05 junio 2021.
5. Paredes-Escalante J., Carrillo-Fasio J., García-Estrada R., Allende-Molar R., Sañudo-Barajas J. y Valdez-Torres J. (14 octubre 2008). Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* [online] Vol.27, Art # 1. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?idp=1&id=61211414004&cid=58327>. Consultado: 05 junio 2021.
6. Hernández-Rodríguez A., León-Plasencia D., Rives-Rodríguez N., Díaz-de la Osa A., Almaguer-Chávez M., Acebo-Guerrero Y. (2010) Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescentes* con actividad antagonista ante *Curvularia* spp. *Revista Protección Vegetal* [online]. Vol. 25(3):181-189. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/305/283>. Consultado: 05 junio 2021
7. Méndez-Úbeda J., Flores, H. M., y Páramo-Aguilera L.A. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo* [online] Vol. 30, Art. # 02. <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>, ISSN-E 1995-9516. Consultado: 05 junio 2021.