

Efecto antifúngico *in vitro* de bacterias aisladas de vegetales sobre *Fusarium oxysporum*

Mendoza Buenrostro, E¹, Rangel Vargas E¹, Gómez-Aldapa CA¹, Villagómez Ibarra, JR¹, Castro Rosas, J¹

¹Área 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.

Correo: etnamendoza27@gmail.com

Palabras clave: Control biológico; antagonismo; hongos fitopatógenos.

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 jitomate 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 a el bloqueo del flujo de nutrientes de la planta y como resultado su muerte [4].

El uso de pesticidas ha sido un 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. 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.

Fusarium oxysporum es un fitopatógeno de la planta de jitomate. No existen estudios sobre el uso de bacterias como control biológico de *F. oxysporum* en cultivos de jitomate.

El objetivo fue aislar bacterias de vegetales y del suelo y evaluar *in vitro* su efecto antifúngico contra *F. oxysporum*.

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: 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 cajas 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 *F. oxysporum in vitro*

En todos los estudios se utilizó la cepa de *F. oxysporum* ATCC MYA-1198. Las cepas bacterianas aisladas se sembraron en tubos de caldo soya tripticaseina y se incubaron a 35°C por 24 h. Se incluyeron en el estudio 3 cepas de *Serratia* (*S. marcescens* B1, *S. marcescens* B3 y *S. nematodiphila* B2) que previamente habían mostrado efecto antifúngico contra otra especie de *Fusarium* (*F. brachygibbosum*) [7]. La actividad antifúngica de todas las bacterias contra *F. oxysporum* 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 *F. oxysporum* (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 inóculo del hongo en cada uno de los cuadrantes se inocularon con una concentración de 20 microlitros de las bacterias aisladas y de las cepas de *Serratia*. Es importante señalar que se probó una sola bacteria por cada caja de cultivo sembrada con *F. oxysporum*. Como control se incluyeron cajas sembradas de la misma manera con *F.*

oxysporum 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 50 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 (Figura1).



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

Se evaluó el efecto antifúngico de las 50 cepas bacterianas. Las 50 cepas mostraron algún efecto antifúngico de contra *F. oxysporum*; no obstante, solo 15 cepas tuvieron los mayores niveles de efecto antifúngico contra *F. oxysporum* (Figuras 2 y 3). De las 15 cepas bacterianas, las denominadas como B17 y B48 fueron las que presentaron el mayor efecto inhibitorio contra el crecimiento radial del hongo en comparación con el crecimiento de *F. oxysporum* libre de bacterias (Figura 3). Cabe señalar que el estudio se concluyó a los 5 días debido a que el crecimiento radial de *F. oxysporum* en las cajas control o libre de bacterias, alcanzó por completo las paredes de las cajas de cultivo al quinto día de incubación (Figura 2).

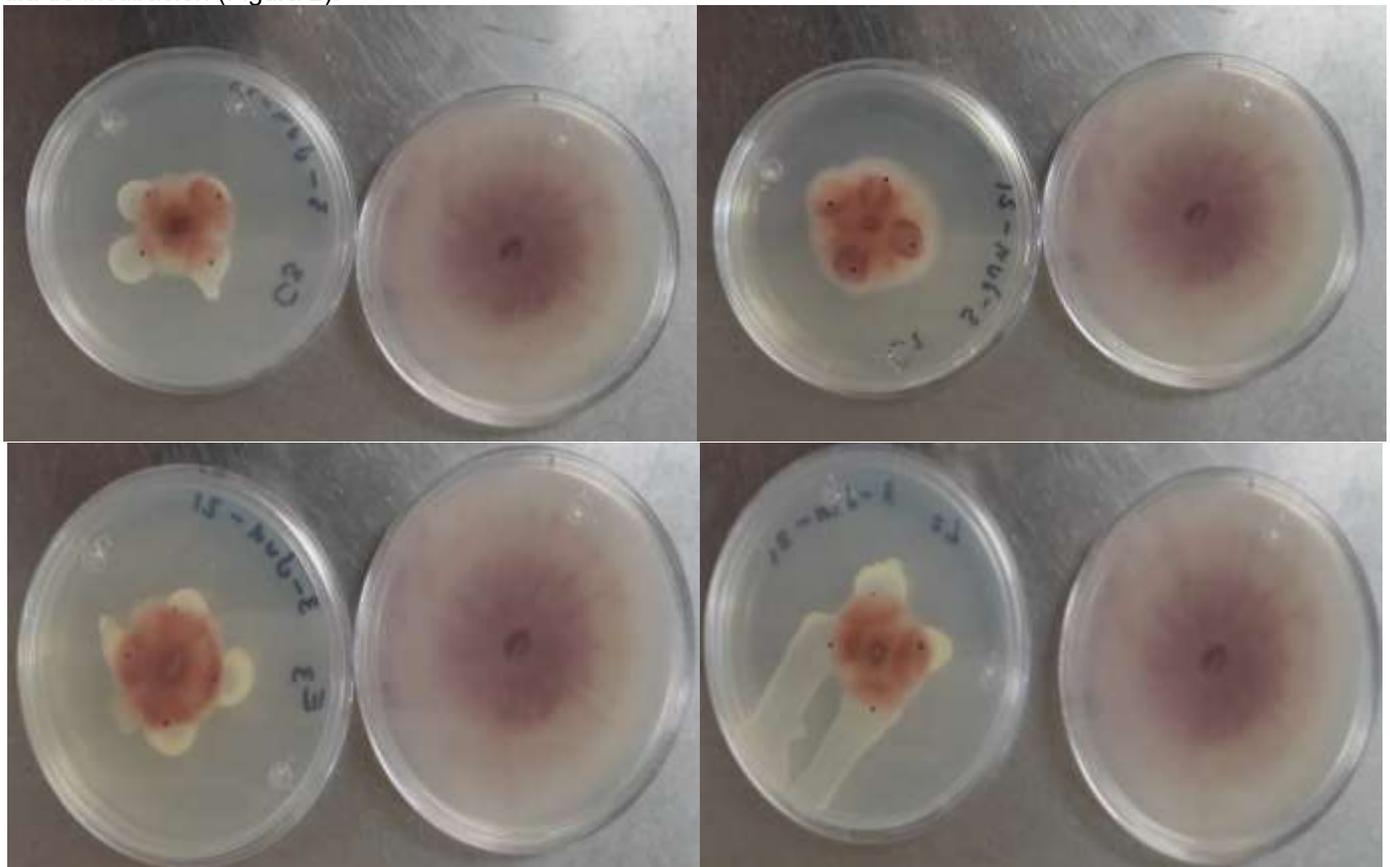


Figura 2. Fotos de algunas de las cepas bacterianas en donde se observa su efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *F.oxysporum* en comparación con el control libre de bacterias.

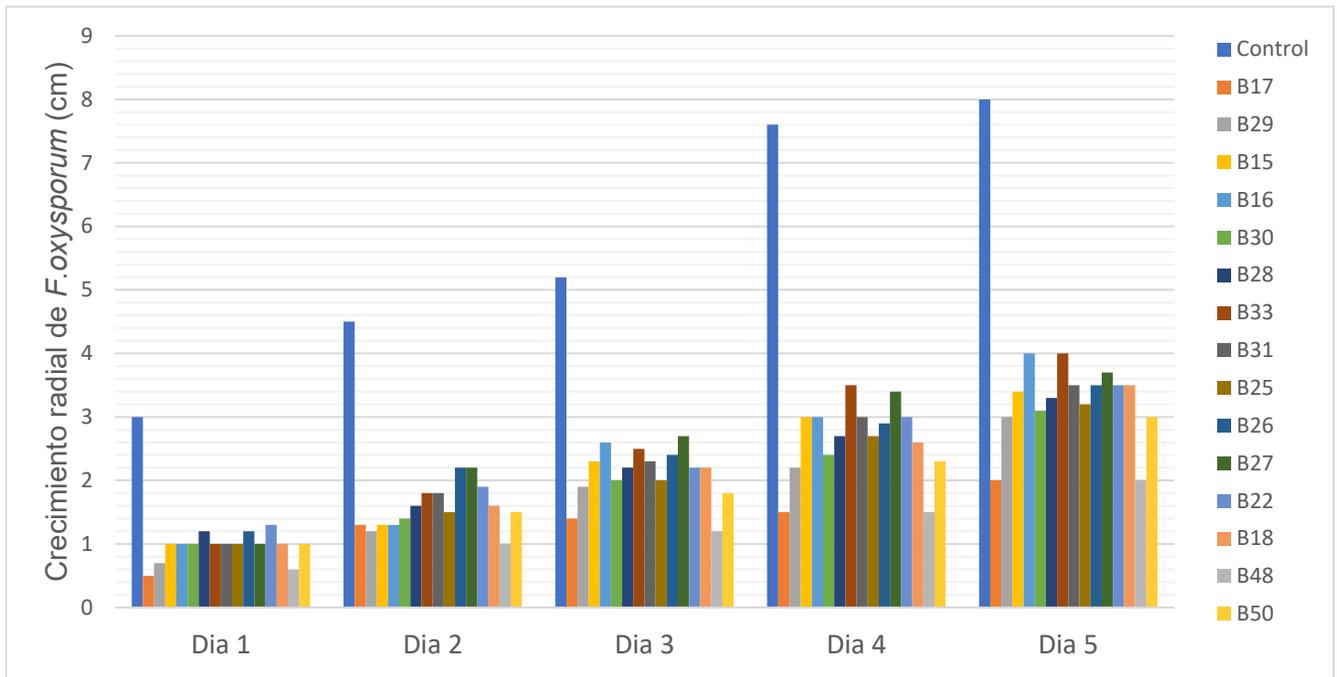


Figura 3. Actividad inhibitoria de las 15 cepas con mayor efecto fúngico sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio de cultivo

Es interesante señalar que las cepas que presentaron el mayor efecto antifúngico contra *F. oxysporum* fueron aisladas de zanahorias (B17) y de duraznos inmaduros (B48) que se obtuvieron directamente de árboles de durazno. 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 y B48 microscópicamente presentan marcadas diferencias lo cual sugiere que son distintas bacterias. No obstante, ambas bacterias presentaron desarrollo en forma de “swarming” durante los estudios de inhibición con el hongo.

Los resultados hasta el momento sugieren la posibilidad de poder usar a las cepas B17 y B48 para el control biológico de *F. oxysporum* en el cultivo de jitomate. Es importante señalar que en estudios posteriores las cepas B17 y B48 serán identificadas mediante secuenciación del gen 16s ARNr y se evaluará su efecto antagónico sobre el crecimiento de *F. oxysporum* directamente en el follaje, raíz y frutos de jitomate.

Para el caso de las 3 cepas de *Serratia* que también se examinaron en este estudio, en general, presentaron un menor efecto antifúngico sobre *F. oxysporum* que las 15 cepas con el mayor efecto antibacteriano que se mencionaron a arriba (Figuras 3 y 4).

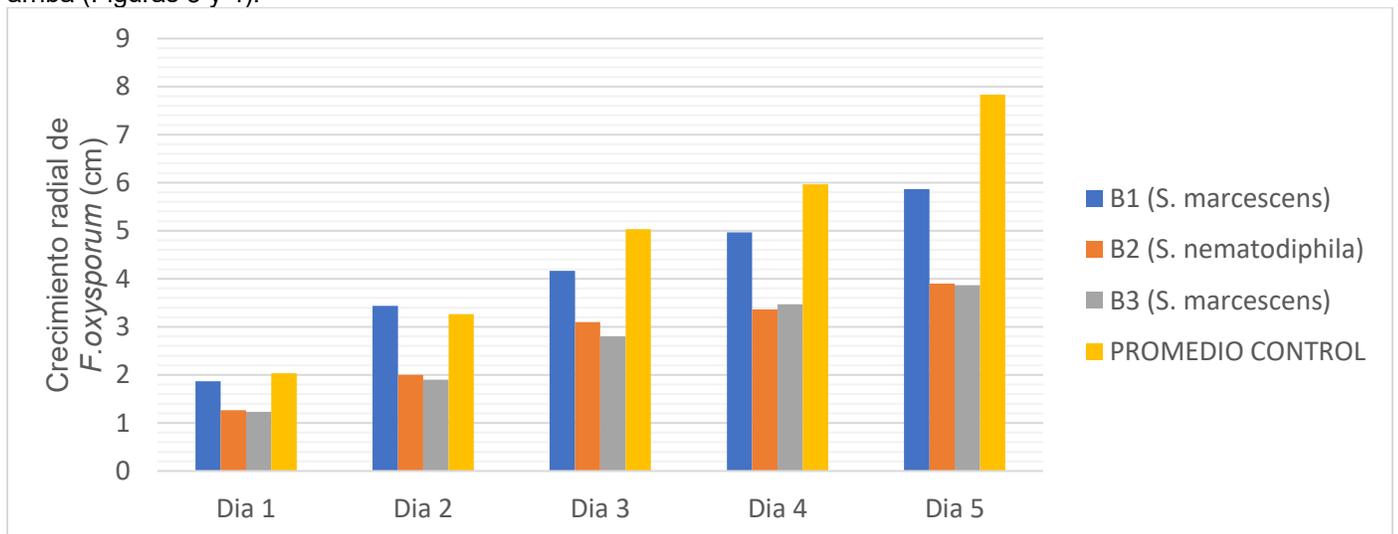


Figura 4. Actividad inhibitoria de *S. marcescens* B1, *S. marcescens* B3 y *S. nematodiphila* B2 sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio de cultivo

Las 3 cepas de *Serratia* se incluyeron en el estudio debido a que previamente habían mostraron efecto antifúngico elevado en estudios *in vivo* contra *Fusarium brachygibbosum*, *Colletotrichum siamense* y *Alternaria alternata* causantes de antracnosis de jitomate y mango [7]. No obstante, en este estudio su efecto contra *F. oxysporum* fue limitado. Estos resultados muestran que se deben contar con cepas bacterianas específicas para el control de hongos fitopatógenos específicos y no usar una bacteria que ha mostrado adecuado o levado efecto en el control de un hongo fitopatógeno para el control de otro hongo fitopatógeno. En tal caso, previo a su uso se deben hacer las evaluaciones científicas pertinentes.

En la actualidad, existen varios estudios que dan evidencia de como las bacterias pueden utilizarse como agentes de control de diversas especies de hongos patógenos del cultivo de tomate. Los aislados de bacterias que protegen a las plantas, tienen características similares a los virulentos; excepto su incapacidad para producir los síntomas de enfermedad en la planta, algunas veces presentan características morfológicas o fisiológicas diferentes, tales como: pigmentación reducida, crecimiento más lento, producción de metabolitos secundarios o producción de determinadas enzimas [8]. Las bacterias utilizan varios mecanismos ante la presencia de estos patógenos. El conocer qué tipo de mecanismo emplea las bacterias aisladas (B17 y B48) es una de las metas a realizar en este trabajo, ya que conocer cual mecanismo está empleando la bacteria nos brinda información importante de como se está llevando a cabo el control biológico de *F. oxysporum*.

Conclusión

Trece cepas bacterianas aisladas de vegetales presentaron un efecto antifúngico moderado contra el crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio de cultivo. Y 2 cepas (B17 y B48) presentaron el mayor efecto antagónico contra *F. oxysporum*. Estas 2 cepas bacterianas tienen potencial para ser usadas en el control biológico de *F. oxysporum* en cultivo de jitomate, siendo estas 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* directamente en plantas y frutos de jitomate.

Referencias

1. Okumoto, S. Tesis de maestría. (1992). Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza. Turrialba, Costa Rica. <http://hdl.handle.net/11554/4857>.
2. Hernández-Herrera, R. M., Santacruz-Ruvalcaba, F., Ruiz-López, M. A., Norrie, J., & Hernández-Carmona, G. (2014). Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of applied phycology*, [online] Vol.26, Art.# 10, <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0078-4>>, ISSN 619-628. Consultado el 25 de mayo del 2021.
3. Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la Zona Árida del noroeste De México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*, [online] Vol. 12, Art. # 16. <https://dagus.unison.mx/publicaciones/indexadas/Art.%20ESJ%20_Edgar%20Jul2016%207612-22143-1-PB.pdf> Consultado el 30 de mayo del 2021.
4. Zhang, Q., Yang, L., Zhang, J., Wu, M., Chen, W., Jiang, D., & Li, G. (2015). Production of anti-fungal volatiles by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and its efficacy in suppression of *Verticillium* wilt of cotton. *Plant and Soil, Springer International Publishing Switzerland 2015* [online] Vol. 392, Art. # (1-2), 101-114. Consultado el 30 de mayo del 2021.
5. Patil, S., & Sriram, S. (2020). Biological control of *Fusarium* wilt in crop plants using non-pathogenic isolates of *Fusarium* species. *Indian Phytopathology*, [online] Vol.73, Art.#10, <https://www.researchgate.net/publication/49965968_Nonpathogenic_Fusarium_as_a_Biological_Control_Agent> ISSN11-19. Consultado el 2 de junio del 2021.
6. Ghazanfar, M. U., Hussain, M., Hamid, M. I., & Ansari, S. U. (2016). Utilization of biological control agents for the management of postharvest pathogens of tomato. *Pak. J. Bot*, [online] Vol.48, Art. # 5, <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48\(5\)/41.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/48(5)/41.pdf)>2093-2100.
7. Trejo-López, A. Tesis doctoral. (2021). Efecto antagónico de cepas de *Serratia* contra *Colletotrichum siamense*, *Alternaria alternata* y *Fusarium brachygibbosum* *in vitro* y sobre mango y jitomate. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
8. Rubio, V., & Fereres, A. (2005). *Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Biotecnología y medio ambiente (eds. Marín, I., Sanz, J.-L., Amils R.), pp. 215-229 1-16.