



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA**



**Escrutinio masivo de un banco de
germoplasma para obtener microorganismos
antagonistas a *Fusarium verticillioides***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

ALEJANDRO MIGUEL FIGUEROA LÓPEZ

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

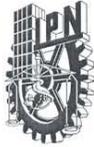
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave el día 25 del mes de Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe **Biólogo Alejandro Miguel Figueroa López** alumno (a) del Programa de **Maestría y Recursos Naturales y Medio Ambiente** con número de registro **B091652**, adscrito a CIIDIR SINALOA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y el Dr. Rubén Félix Gastélum y cede los derechos del trabajo intitulado "Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alejandromiguel85@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Biol. Alejandro Miguel Figueroa López

Nombre y firma



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa a 25 de Noviembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA en su sesión Extraordinaria No. 17 celebrada el día 14 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Figueroa	López	Alejandro Miguel
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>
Con registro:		
B	0	9
1	6	5
2		

Aspirante de: **MAESTRIA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a Fusarium verticillioides".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Escrutinio de bacterias antagonistas mediante bioensayos de antagonismo en medio líquido.
Evaluar las bacterias seleccionadas en líquido y desarrollo de una nueva técnica en cultivos de PDA
Se evaluaron las bacterias en plantas para saber de su bioprotección en maíz contra F. verticillioides

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y Dr. Rubén Félix Gastélum

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
CIIDIR SINALOA
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios. (Financiamiento: Fundación Produce Sinaloa. Monto: 1,787,940.00)

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dr. Rubén Félix Gastélum

Aspirante

Biol. Alejandro Miguel Figueroa López

Presidente del Colegio

Dr. Jorge Montiel Montoya

CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave siendo las 13:00 horas del día 25 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA para examinar la tesis titulada:
Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*

Presentada por el alumno:

Figueroa López Alejandro Miguel
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

B	0	9	1	6	5	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Ignacio Eduardo
Maldonado Mendoza

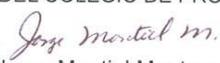

Dr. Rubén Félix Gastélum


Dra. Melina López Meyer


Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez


Dr. Cesar Marcial Escobedo
Bonilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
SINALOA
DIRECCION

Agradecimientos a proyectos

El proyecto mencionado se desarrolló en el laboratorio de **Ecología Molecular de la Rizosfera** del Departamento de **Biología Agrícola** del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del **Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza**. E-mail: imaldona@ipn.mx Domicilio laboral: Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250 CP: 81100 Colonia: San Joachin, Ciudad: Guasave, Estado: Sinaloa, Fax: 01(687)8729625, Teléfono: 01(687)8729626 y el **Dr. Rubén Félix Gastélum** E-mail: castulofelix@hotmail.com Domicilio laboral: Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional México 15 Km. 5. Tel: 01 668 816 1000 Fax: 01 668 816 1023. El presente trabajo fue apoyado económicamente a través de los proyectos SIP-2009-RE/54, SIP-2010-RE/80 y SIP-2011-RE/139, además del apoyo de Fundación Produce Sinaloa proyectos 2008-2009, 2009-2010, 2010-2011 y 2011-2012. El alumno/a **Alejandro Miguel Figueroa López** fue apoyado con una beca CONACYT con clave **302070**.

Dedicatoria y Agradecimientos

A mis PADRES y HERMANA por el apoyo incondicional de su parte, es un gran placer para mí compartir con ustedes todos los logros que me he propuesto y espero que los disfruten porque sin ustedes este libro no se hubiera escrito.

A mi director de tesis el Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza por todo el apoyo brindado, la confianza, la amistad, paciencia y sobre todo por ayudar a superarme académica y profesionalmente.

De igual forma les agradezco a los miembros de mi comité tutorial por sus consejos y guiarme durante la realización de este trabajo.

Sin duda le agradezco al CIIDIR SINALOA por abrirme sus puertas y convertirse en mi segunda casa.

A mis amigos Damián y Juan Carlos por todos esos buenos momentos de pláticas motivacionales en el laboratorio que ayudaron sin duda a que el día de trabajo fuera productivo.

Les agradezco a mis amigos Odet, Karla, Ana Lilia, Nadia, Olimpia, Gustavo, Gerardo el Maza y Lalo por todos esos momentos de risa, todas esas amanecidas, todos los pleitos y consejos que sin duda sirvieron. En especial a las niñas mencionadas que me ayudaron a salir del agujero donde caí por unos meses y esas bud light que ayudaron a curar las tristezas y los malos ratos. Salud y adelante.

ÍNDICE

RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Rizosfera: interacciones planta-microorganismo.....	2
2.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	3
2.3 Mecanismos de efecto directo para promover el crecimiento vegetal.....	4
2.3.1 Fitohormonas.....	4
2.3.2 Solubilización de fosfatos	4
2.3.3 Aumento en la toma de hierro.....	5
2.3.4 Compuestos volátiles.....	6
2.4 Mecanismos indirectos que promueven el crecimiento vegetal	7
2.4.1 Antibiosis	7
2.4.2 Competencia.....	8
2.4.3 Parasitismo	8
2.5 El cultivo del maíz y el patógeno <i>Fusarium</i>	9
2.6 <i>Fusarium verticillioides</i>	9
2.7 Control biológico con bacterias	12
2.8 Bancos de germoplasma	13
2.9 Creación y naturaleza del banco de germoplasma de maíz a emplear en la presente tesis	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo General	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. MATERIALES Y METODOS	22
5.1 Esquema general de trabajo	22
5.2 Identificación molecular de los aislados patogénicos.....	23
5.3 Material biológico	24

5.3.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	24
5.3.2 MOs del banco.....	24
5.4 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido	25
5.5 Estandarización de monitoreo de antagonismo en medio sólido	28
5.6 Pruebas de hemólisis de sangre como criterio para la selección de las mejores cepas con potencial antagonista.....	29
5.7 Pruebas de antagonismo <i>in planta</i>	30
5.8 Posibles mecanismos de actividad antagónica contra patógenos	31
5.8.1 Producción de quitinasas.....	32
5.8.2 Solubilización de fosfatos	32
5.8.3 Producción de ácido indolácetico.....	32
5.9 Pruebas de compatibilidad entre aislados.....	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Identificación molecular de los aislados patogénicos de <i>Fusarium verticillioides</i>	34
6.2 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido	34
6.2.1 Estandarización de la cantidad de WGA ALEXA FLUOR 488 (wheat germ agglutinin) a emplear en el ensayo de antagonismo en medio líquido	34
6.2.2 Determinación de la cantidad óptima de tejido fúngico a emplear para el ensayo en medio líquido.....	35
6.2.3 Selección de aislados bacterianos con potencial antagónico de un escrutinio masivo de 11,520 aislados.....	37
6.3 Estandarización técnica de monitoreo en medio sólido en placas de formato de 96.....	39
6.4 Pruebas de hemólisis en sangre humana como criterio para la selección de las mejores cepas con potencial antagonista	40
6.5 Pruebas de antagonismo a nivel <i>in planta</i>	43
6.5.1 Desinfección de las semillas de maíz	43
6.5.2 Cinéticas de crecimiento de los aislados bacterianos.....	43
6.5.3 Bioensayos de bioprotección en plántulas de maíz	44

6.6 Mecanismos de interacción con la planta y de actividad antagónica contra patógenos de los aislados antagonistas	47
6.6.1 Solubilización de fosfatos	48
6.6.2 Producción de auxinas.....	49
6.6.3 Producción de quitinasas.....	49
6.7 Pruebas de compatibilidad entre los aislados bacterianos.....	50
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
7.1 Identificación de los aislados patogénicos de <i>Fusarium</i>	52
7.2 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido	52
7.3 Monitoreo masivo en medio sólido.....	58
7.4 Pruebas de hemólisis de los aislados seleccionados por su potencial antagónico	60
7.5 Pruebas en planta	60
7.6 Mecanismos de interacción de los aislados seleccionados con las plantas de maíz.....	62
7.6.1 Solubilización de fosfatos	63
7.6.2 Producción de auxinas.....	63
7.7 Posibles mecanismos de antagonismo	64
7.7.1 Producción de quitinasas.....	64
7.8 Pruebas de compatibilidad.....	65
8. CONCLUSIONES.....	66
9. PERSPECTIVAS.....	67
10.BIBLIOGRAFÍA.....	68
11. ANEXOS.....	83

GLOSARIO

Antagonismo. Interacción de efecto negativo entre dos o más especies de organismos. Si una de especies, corresponde al de un patógeno y está siendo desplazada o inhibida en su crecimiento por otra u otras especies, podemos decir que estamos frente la acción de un antagonista.

Auxina. Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea a los haces vasculares.

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de plantas.

Banco de germoplasma. Consiste en una colección de organismos preservada de manera viable. Su misión consiste en ubicar, recolectar, conservar y caracterizar el plasma germinal de organismos que, por sus atributos son considerados de interés prioritario para beneficio de la humanidad, además de aportar conocimiento científico orientado a la optimización de la conservación y uso de los recursos fitozoo genéticos y/o microbiológicos.

Coloide. En química un coloide, suspensión coloidal o dispersión coloidal es un sistema fisicoquímico formado por dos o más fases, principalmente: una continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas; por lo general sólidas. La fase dispersa es la que se haya en menor proporción.

Criopreservado. Es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de *vida suspendida* por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.

Fitohormonas. También llamadas hormonas vegetales son sustancias químicas producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y éstas hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.

Hemólisis. Es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).

Patogenicidad. Alteración que ocasiona un parasito sobre una o varias funciones esenciales de la planta.

Quitina. Es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos) y algunos otros animales (quetas de anélidos y perisarco de cnidarios).

Quitinasas. Las quitinasas son enzimas que degradan la quitina.

Rizosfera. Es una parte del suelo inmediata a las raíces donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos.

Sideróforo. (del griego: transportador de hierro) es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos. El ion Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro y por ende no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos

iones a complejos de Fe^{3+} , que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo.

Solubilización. Es una medida de la capacidad de disolverse de una determinada sustancia (solute) en un determinado medio (solvente); implícitamente se corresponde con la máxima cantidad de soluto disuelto en una cantidad de solvente a una temperatura fija y en dicho caso se establece que la solución está saturada.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Estructuras infectivas del hongo <i>F. verticillioides</i>	11
Figura 02. Posición relativa de los primers empleados para la amplificación de la región del DNA ribosomal.	23
Figura 03. Procedimiento para descongelar los microorganismos del banco	25
Figura 04. Ensayo de antagonismo convencional en placas Petri de 10 cm	28
Figura 05. Método de inoculación	29
Figura 06. Principio en el cual se basan las pruebas de antagonismo en medio líquido.	26
Figura 07. Evaluación de diferentes concentraciones de WGA	35
Figura 08. Cinética de crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en medio de cultivo líquido	37
Figura 09. Microorganismos antagonistas probados en medio sólido	40
Figura 10. Prueba de hemólisis	41
Figura 11. Semillas en germinación	43
Figura 12. Cinéticas de crecimiento de los 14 aislados bacterianos.....	44
Figura 13. Gráfico para volumen radical expresado en centímetros cúbicos.....	45
Figura 14. Severidad en por ciento de los tratamientos	46
Figura 15. Volumen radical expresado en centímetros cúbicos, efecto de los aislados sobre las plantas.....	47
Figura 16. Aislados con capacidad de producir quitinasas en Agar quitina coloidal.	50
Figura 16. Aislados que mostraron capacidad de solubilizar fosfato in vitro	49
Figura 17. Compatibilidad de crecimiento entre bacterias gamma hemolíticas	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Puntos de muestreo y localización por georeferenciación del sitio donde se colectaron las muestras	16
Tabla 02. Resultados del análisis con el software BLAST-N de las secuencias de los aislados patogénicos que se usaron en este trabajo	34
Tabla 03. Géneros representativos de los 622 microorganismos seleccionados como potenciales antagonistas en las pruebas de medio líquido.....	38
Tabla 04. Antagonistas seleccionados con mayor inhibición en las pruebas con medio líquido y sólido	42
Tabla 05. Mejores aislados obtenidos en las pruebas realizadas en el presente estudio.....	48
ANEXO 1. Listado de los posibles antagonistas seleccionados en las pruebas en medio líquido.....	83

RESUMEN

El maíz es uno de los cereales más importantes a nivel mundial. Se han reportado siete especies de *Fusarium* asociados a la pudrición de mazorca, tallo y raíces, de las cuales *F. verticillioides* ha sido la más importante. El objetivo de este estudio fue encontrar nuevas técnicas para evaluar el antagonismo de organismos nativos contra este patógeno. Aislados de *F. verticillioides* (99% de identidad a nivel nucleotídico de la región ITS del ADN ribosomal) previamente identificados mediante herramientas moleculares se emplearon en pruebas de antagonismo en sustrato líquido y de manera preliminar se probaron 11,520 aislados bacterianos, provenientes de la rizosfera de maíz, contra *F. verticillioides*. La actividad antagónica se monitoreó en caldo de papa-dextrosa, en el cual los aislados bacterianos y el hongo crecieron como cultivo duales. La masa fúngica se cuantificó con WGA Alexa Fluor 488. Se seleccionaron 622 aislados a partir de esta prueba empleando como criterio la disminución de al menos el 60% de crecimiento de la biomasa del hongo en presencia de un determinado aislado bacteriano. Los 622 microorganismos seleccionados se analizaron de nuevo contra el patógeno en papa-dextrosa-agar (PDA). A partir de este bioensayo se seleccionaron 42 aislados que mostraron ser antagonistas en PDA. Éstos mostraron un efecto inhibitorio contra *F. verticillioides* y los porcentajes de inhibición en estas pruebas fueron mayores al 45%. De los 42 organismos la mayoría pertenecen al género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus*. En pruebas de hemólisis para descartar posibles patógenos al humano se analizaron los 42 obtenidos de las pruebas en PDA y se seleccionaron 14 que mostraron hemólisis tipo alfa (parcial) y gamma (ausencia de lisis). De los 14 aislados, tres mostraron efecto de bioprotección contra *F. verticillioides* en planta de maíz ya sea mediante la producción de quitinasas, auxinas o algún otro mecanismo promotor de crecimiento vegetal.

ABSTRACT

Maize crop is one of the most important worldwide. Seven species of *Fusarium* have been associated to ear, root and stem rot. , from which *F. verticillioides* is the most important. This study aimed to find new biocontrol techniques to control the disease caused by this phytopathogenic fungus in Sinaloa. *Fusarium verticillioides* (99% identity at the nucleotide level in the ITS rDNA region) isolates were used to monitor 11,520 isolates corresponding to a germplasm bank using a massive antagonism assay in liquid medium for their antagonist ability against this pathogen. The antagonistic activity was monitored on PDB media, in which the phytopathogenic fungi and the bacterial isolates were grown as dual cultures. Fungal biomass was quantified using WGA Alexa Fluor 488. 622 isolates were selected for their ability to decrease at least 60% mycelial growth of *F. verticillioides*. To confirm their antagonistic effect in solid medium, PDA 96-well plates were used and 42 isolates were selected under the criterion that they caused over 45% inhibition of fungal growth in solid media. Most of the 42 selected microorganisms belong to the genus *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus*. Hemolysis assays on the 42 selected strains rendered 14 that showed alpha or gamma hemolysis. Three isolates were additionally selected since they exhibited antagonistic potential against *F. verticillioides in planta* either due to their ability to produce chitinases, auxins or other mechanisms of plant growth promotion.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales más importantes del mundo, pues suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales; constituye también la materia prima básica en la industria del almidón, aceites, proteínas, bebidas alcohólicas, endulzantes y colorantes alimenticios. Además, recientemente se ha empezado a utilizar el etanol obtenido de maíz, como combustible. El Estado de Sinaloa cuenta con una superficie agrícola de 1, 469, 443 has, que representan el 25% de su superficie. El cultivo más importante en el estado tanto por su rentabilidad como por su superficie sembrada, es el maíz (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/2009>). En los ciclos agrícolas 2008-2009 se sembraron 566,356 ha, con una producción de 5, 200, 000 toneladas aproximadamente y su valor representa ~14, 000 millones de pesos (MDP) (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/2009>). En el mismo ciclo 2008-2009 se reportaron cerca de 29, 700 has siniestradas por distintos problemas y aunque no se tiene el dato con certeza una proporción de éstas fueron afectadas por diversas enfermedades entre las que se encuentran aquellas relacionadas al hongo *Fusarium*.

El escenario más favorable en el biocontrol, es el empleo de microorganismos nativos de la misma región, ya que estos han co-evolucionado con las plantas y otros organismos, lo cual les confiere ventajas de adaptación y mayores posibilidades de ser establecidas con éxito.

Debido a la incidencia de *Fusarium* spp. en los suelos de Sinaloa en los últimos dos ciclos de cultivo, en el presente trabajo se empleó un banco de 11, 520 microorganismos aislados de la rizosfera de maíz para determinar su grado de antagonismo de antagonismo contra *Fusarium* empleando una novedosa técnica de escrutinio para encontrar aquellos microorganismos con capacidad antagónica a *Fusarium* y caracterizarlos a nivel *in vitro* e *in planta*. El objetivo del trabajo es encontrar nuevas técnicas de biocontrol para implementar estrategias de manejo de la enfermedad en el futuro y así controlar el problema que causa el hongo *Fusarium* spp. en el maíz en Sinaloa.

ANTECEDENTES

2.1 Rizosfera: interacciones planta-microorganismo

La rizosfera es un sistema ecológico inmediato a la raíz, en el cual la población microbiana crece condicionada por la presencia de las raíces de las plantas. Éstas tienen muy variadas funciones ya que son responsables del anclaje de las plantas al suelo, del aporte de agua y nutrientes para su metabolismo y también del intercambio de varias sustancias con el meristemo aéreo en el crecimiento (Honorato, 2000).

En la rizosfera se generan una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes. Estas interacciones pueden resultar benéficas o dañinas a las plantas (Honorato, 2000). En la rizosfera existe una amplia gama de compuestos orgánicos, tales como exudados de raíces de bajo peso molecular, secreciones, mucílagos (Morel *et al.*, 1986) y lisados celulares (Bowen, 1980). Estos compuestos propician que las raíces actúen como una fuente de carbono orgánico, para los microorganismos que crecen en la rizosfera; por ello la densidad de las poblaciones de microorganismos es considerablemente más alta en la rizosfera que en el suelo lejano a la raíz (Marschner, 1999).

Durante la formación de la rizosfera, los microorganismos que allí se desarrollan interactúan entre ellos mismos y con la raíz de la planta, así como con los constituyentes físicos y químicos del suelo. La comunicación entre los componentes biológicos, ocurre principalmente vía señales químicas o bioquímicas, aunque posiblemente también se lleva a cabo a través de interacciones físicas. Este intercambio de señales está modulado por las características propias del suelo y las condiciones ambientales predominantes en el ecosistema (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

Los microorganismos que colonizan la rizosfera se pueden clasificar de acuerdo a los efectos que tienen sobre las plantas y a la manera en que interactúan con las raíces; algunos microorganismos son patógenos de las plantas mientras que otros tienen efectos benéficos sobre éstas (Mantelin y Touraine, 2004; Matiru y Dakora, 2004). En la rizosfera, las rizobacterias comúnmente se agrupan en micro-colonias.

Las rizobacterias se benefician al tomar las sustancias secretadas por las plantas, además de ejercer efectos positivos, directos o indirectos; en algunos casos puede ocasionar una estimulación en el crecimiento (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). En éste grupo de rizobacterias se incluyen algunos géneros como: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, y *Azotobacter*, entre otros (Kennedy *et al.*, 2004). Bacterias de éstos géneros se han utilizado con éxito para el control de diferentes especies de *Fusarium* tanto, en la parte aérea de la planta como en el suelo (Kerry, 2000).

1.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) son bacterias de vida libre que colonizan la rizosfera y benefician el crecimiento de las raíces. Se han identificado bacterias de diferentes géneros como promotoras de crecimiento vegetal pero principalmente predominan los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Las RPCV ejercen un efecto directo sobre el crecimiento de las plantas mediante la producción de fitohormonas (Vessey *et al.* 2003), solubilizando fosfatos inorgánicos (Gyaneshwar *et al.*, 2002), o bien incrementando la toma de hierro mediante la producción y liberación sideróforos en la solución de suelo (Buyer *et al.*, 1993; Raaijmakers *et al.*, 1995). Algunas RPCVs tienen efecto indirecto sobre las plantas, al inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos que afectan el crecimiento o el desarrollo de las raíces; actúan sobre ellos mediante mecanismos como la antibiosis, parasitismo, competencia por nutrientes o espacio en la rizosfera o rizoplano o la activación de los mecanismos de defensa de las plantas.

2.3 Mecanismos directos promotores del crecimiento vegetal

2.3.1 Fitohormonas

Las fitohormonas producidas por las bacterias promotoras del crecimiento dentro de la zona de las raíces estimulan la densidad y la longitud de los pelos radicales. El incremento en el área de las raíces mejora la absorción de agua y nutrientes en un gran volumen de suelo (Volkmar y Bremar, 1998). Vessey *et al.* (2009) aportaron pruebas de que diferentes cepas de RPCVs ejercen actividad promotora de crecimiento, debido a la influencia de fitohormonas.

El ácido indolacético es una fitohormona de tipo auxina producida por las bacterias promotoras del crecimiento. El tratamiento con bacterias productoras de auxinas aumenta el crecimiento de las plantas (Vessey, 2003). La promoción del crecimiento de plántulas de pino inoculadas con la bacteria *Paenibacillus polymyxa* L6 se debe al aumento en los niveles de auxinas en las raíces, causados por la producción de estos compuestos por la bacteria (Bent *et al.*, 2001). Pocas bacterias promotoras de crecimiento se han reportado que producen citoquininas y giberelinas (Gutiérrez-Manero *et al.*, 2001). Las bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas* spp. producen citoquininas y giberelinas, además de ácido indolacético (Gaudin *et al.*, 1994).

2.3.2 Solubilización de fosfatos

El fósforo es el segundo macro nutriente más importante requerido por las plantas para su desarrollo. La mayor parte del fósforo se encuentra en una forma insoluble, incluso en suelos ricos en este elemento, como fosfatos de aluminio y hierro en suelos ácidos, y en forma de fosfatos de calcio en suelos alcalinos. Solo una pequeña porción (0.1%) está disponible para las plantas (Stevenson y Cole, 1999).

Las bacterias que solubilizan fosfatos secretan ácidos orgánicos y fosfatasa para convertir los fosfatos insolubles en iones de fosfato monobásico (H_2PO_4^-) y fosfato dibásico (HPO_4^{2-}); este proceso de solubilización del fosfato mineral, permite un aumento en la disponibilidad y toma de fósforo para las plantas (Gyaneshwar *et al.*, 2002).

Las bacterias que son capaces de solubilizar fosfatos son ubicuas (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* y *Pseudomonas* spp. son consideradas como eficaces. Estas bacterias se encuentran comúnmente en la rizosfera de algunas plantas de cultivo y algunos ejemplos de estas asociaciones son *Azotobacter chroococcum* (Kumar & Narula, 1999) y *Bacillus circulans* en trigo (Singh & Kapoor, 1998), *Enterobacter agglomerans* en tomate (Kim *et al.*, 1998b) y *P. chlororaphis* ó *P. putida* con soya (Cattelan *et al.*, 1999).

Los ácidos orgánicos como el citrato, lactato y succinato, secretados por las bacterias, contribuyen a la solubilización de fosfatos en la rizosfera. El más importante, dentro de los ácidos orgánicos que solubilizan fosfato inorgánico, es el ácido 2-ceto-glucónico (Gyaneshwar *et al.*, 1999).

2.3.3 Aumento en la toma de hierro

El hierro es un micronutriente de plantas que sirve como cofactor de muchas enzimas. Una gran cantidad de hierro en el suelo se encuentra en forma insoluble de hidróxido férrico, por lo tanto el hierro actúa como un factor limitante para el crecimiento de la planta aún en suelos ricos en hierro. Varios microorganismos del suelo producen sideróforos, compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular que se unen al hierro con alta afinidad y ayudan a su absorción. Es posible que los microorganismos de la rizosfera usen sideróforos, siempre y cuando tengan las proteínas de absorción adecuadas que los reconozcan (Raaijmakers *et al.*, 1995).

Existe evidencia que un gran número de especies de plantas pueden absorber complejos bacterianos Fe^{2+} + sideróforos, y este proceso es vital para las plantas en la absorción de hierro (Wang *et al.*, 1993; Masalha *et al.*, 2000). Algunas especies de *Pseudomonas* son eficientes productores de sideróforos dentro de las RPCVs. Este género produce pseudobactina, pioquelina, pioverdina y quinolobactina. Las proteínas receptoras del exterior de la membrana complementarias a estos sideróforos ya han sido bien determinadas (David *et al.*, 2005).

Los sideróforos producidos por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de inhibir a patógenos de raíces, esto se logra bajando la disponibilidad por estos compuestos quelantes de hierro en la rizosfera. *Pseudomonas fluorescens* inhibe el crecimiento de *Fusarium culmorum* mediante la secreción de sideróforos queladores de hierro (Kurek & Jaroszuk-Scisel, 2003). Una mutante de *P. putida* que tiene una sobre expresión de sideróforos, fue más efectiva que el tipo silvestre para controlar la marchitez causada por *Fusarium* en tomate (Vandenburgh & Gonzalez, 1984), En contraste un mutante de *Pseudomonas aeruginosa* deficiente para producir sideróforos, perdió su capacidad para controlar la misma enfermedad (Buysens *et al.*, 1994).

2.3.4 Compuestos volátiles

Algunas bacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante compuestos volátiles. Por ejemplo, Ryu *et al.* (2003) en experimentos in vitro, demostraron que los compuestos volátiles producidos por *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* estimularon el crecimiento e incrementaron el área foliar de *Arabidopsis thaliana*. Los compuestos como 3-hydroxy-2-butanona (acetoína) y 2,3-butanediol, fueron producidos por estas dos cepas bacterianas, mientras que aquellas que fueron incapaces de sintetizarlos no afectaron el crecimiento vegetal (Ryu *et al.*, 2003).

Ryu *et al.*, (2004), encontraron que al exponer plantas de *A. thaliana* a compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* observaron una reducción en la severidad de la pudrición suave causada por la bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. El nivel de protección tuvo una relación directa con la producción de compuestos orgánicos volátiles de *B. subtilis*.

2.4 Mecanismos indirectos promotores del crecimiento vegetal

Diversas RPCVs antagonizan directamente a patógenos que afectan las raíces de las plantas a través de uno o más mecanismos, como la producción de compuestos volátiles o no volátiles, sideróforos, y enzimas; además de otros metabolitos secundarios como el ácido cianhídrico (HCN) (Haas y Keel, 2003).

2.4.1 Antibiosis

Los antibióticos más comunes producidos por las diferentes bacterias antagonistas incluyen al amonio, butirolactonas, 2,4-diacetil fluoroglucinol (DAPG), kanosamina, oligomicina A, oomicina A, ácido fenacin-1-carboxílico, pioluteorina, pirrolnitrina, viscosinamida, xantobacina y zwitermicina A (Whipps, 2001). Muchos de estos antibióticos tienen un amplio espectro de acción contra patógenos, y el DAGP fue el más potente y más ampliamente estudiado (Raaijmakers *et al.*, 2002).

El papel que cada uno de los antibióticos tiene para suprimir a los patógenos de las, ha sido claramente establecido mediante análisis de mutaciones y genética molecular. Por ejemplo, mutantes de *P. fluorescens* con una sobreexpresión de DAGP ofrece una mejor protección contra las enfermedades causadas por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y la marchitez bacteriana del tomate causada por *Ralstonia solanacearum* (Hongyou *et al.* 2005).

Ciertas bacterias producen antibióticos volátiles como el ácido cianhídrico (HCN), el cual inhibe la citocromo oxidasa de muchos organismos. Estas bacterias

poseen una citocromo oxidasa alterna, relativamente insensible al HCN. Mutantes de *P. fluorescens* cepa CHA0 deficientes en la producción de HCN fueron menos efectivas para el control de *Gaumannomyces graminis* var *tritici* y la pudrición de raíces de tabaco causada por *Thielaviopsis basicola*. Al complementar estas cepas con el gen *hcn*⁺ mediante técnicas moleculares, se le restauró su actividad de biocontrol (Voisard, 1989).

2.4.2 Competencia

Las RPCVs compiten con los microorganismos nocivos y patógenos por los limitados nutrientes disponibles en los exudados de las raíces y colonizar los nichos adecuados. Las poblaciones de bacterias establecidas en las raíces de las plantas pueden afectar la disponibilidad de nutrientes para el patógeno y la subsecuente colonización de las raíces. Este mecanismo es utilizado por *Pseudomonas fluorescens* debido a su versatilidad nutricional y a la alta tasa de crecimiento en la rizosfera (Walsh *et al.*, 2001).

2.4.3 Parasitismo

El parasitismo de los hongos patógenos por las bacterias, se lleva a cabo mediante la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos. Las quitinasas, son las enzimas hidrolíticas más importantes, ya que la quitina, polímero lineal de β -(1-4)-N-acetilglucosamina, es un componente importante de pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos. Las quitinasas purificadas de *Bacillus subtilis* AF1 (Manjula *et al.*, 2004), *Serratia marcescens* (Ordentlich *et al.*, 1998; Kishore *et al.*, 2005) y *S. plymuthica* (Frankowski *et al.*, 2001) son consideradas como antifúngicos eficaces.

Otro grupo importante de enzimas hidrolíticas son las glucanasas, las cuales degradan a los β -1,3-glucanos de la pared celular del hongo. Las bacterias que producen la β -1,3-glucanasa, como *P. cepacia* pueden inhibir el desarrollo de varios

hongos fitopatógenos, incluyendo *Rhizoctonia solani*, *S. rolfsii* y *Pythium ultimum* (Fridlender *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la acción combinada de las quitinasas con las β -1,3-glucanasas puede resultar más efectiva para controlar fitopatógenos fúngicos (Tanaka y Watanabe, 1995).

2.5 El cultivo del maíz en Sinaloa

En Sinaloa, en la última década la producción de maíz aumentó de 2, 818,000 toneladas cosechadas en 2001, a 5, 368, 000 toneladas en 2008; con rendimientos en la productividad superiores a la media nacional. Sinaloa se ubica como el principal Estado productor del grano.

En Sinaloa, durante el ciclo otoño-invierno de 1990-1991, se sembró una superficie de 121, 000 ha. En el ciclo 2008-2009, el área sembrada fue de 566, 000 hectáreas, con rendimientos promedio de 9.8 toneladas por hectárea llegando a obtener hasta 15 ton/ha en algunos lotes; la producción total fue de 5, 236, 000 toneladas. En el mismo ciclo se reportaron cerca de 29, 716 ha siniestradas por distintos factores; se estima que una alta proporción de éstas fueron afectadas por enfermedades relacionadas con el hongo *Fusarium*.

2.6 *Fusarium verticillioides*

Entre las enfermedades del maíz más importantes están las pudriciones de mazorcas y tallos. A nivel mundial se han reportado como agentes causales de estas pudriciones, a los hongos transmitidos por semilla: *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* (White, 2000). Morales-Rodríguez (2007) reportó a siete especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la mazorca en los Valles Altos de México y resaltan a *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, como la más importante en México y en otras partes del mundo causando la pudrición de la mazorca y del tallo (Munkvold y Desjardins, 1997a).

F. verticillioides es el responsable de importantes pérdidas económicas a nivel mundial desde su aparición en los campos de maíz. La infección del maíz por el hongo puede ocurrir sistémicamente a través de la semilla, tallo y raíces, causando la pudrición de toda la planta (Nelson, 1992). Además, este hongo produce un grupo de micotoxinas llamadas fumonisinas, las cuales contaminan el maíz y los productos obtenidos de este cereal. El consumo de estas micotoxinas causa efectos nocivos en los animales y en la salud humana (Shephard *et al.*, 1996).

García-Pérez y Velarde analizaron varios lotes de maíz en la parte centro-sur de estado de Sinaloa, con síntomas de pudrición en plántulas y mazorcas de diferentes híbridos en el Valle de Culiacán. Obtuvieron 165 cepas monospóricas de *Fusarium*, a partir de tallos de plántulas, de las cuales 140 se identificaron molecularmente como *Fusarium oxysporum*. También obtuvieron 92 cepas monospóricas de mazorca las cuales fueron identificadas como *Fusarium verticillioides* (Comunicación personal con García-Pérez y Velarde).

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg (sinónimo: *F. moniliforme* Sheldon; teleomorfo *Gibberella moniliformis*). Esta especie pertenece a la sección Liseola, específicamente al complejo de *G. fujikuroi* (Sawada) Wollenw, la cual está subdividida en nueve especies: *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. circinatum* y *F. konzum*. Es un patógeno que se encuentra ampliamente distribuido en las zonas productoras de maíz en el mundo (Leslie y Summerell, 2006); también se ha aislado de cultivos como el trigo, arroz, avena y sorgo (Bacon y Nelson, 1994). Es capaz de causar pudrición en tallos y mazorcas, también puede contaminar las semillas de cultivos como el trigo, arroz, avena y sorgo.

Durante el proceso de invasión a la planta, el hongo puede sintetizar fumonisinas, una familia de micotoxinas, que frecuentemente contaminan al maíz y están asociadas a un gran número de enfermedades en animales, incluyendo el cáncer (Howard *et al.*, 2001).

El ciclo biológico de *F. verticillioides* es complejo ya que este hongo es un patógeno no obligado que carece de un hospedero específico. Sus distintas fases de vida están conformadas por un estado saprofitico y otro parasítico. Durante la primera etapa, *F. verticillioides* obtiene los nutrientes de los tejidos vegetales muertos, produciendo estructuras infectivas como lo son los macroconidios y los microconidios (Figura 1). Los microconidios en *F. verticillioides* consisten células aisladas, mientras que los macroconidios son células grandes, septadas y menos abundantes (Sutton *et al.*, 1998). En su estado parasítico, después de la extensiva colonización intracelular, destruye el tejido del cual se alimenta, liberando altas concentraciones de fumonisinas (Luna-Olvera, 1998; Oren *et al.*, 2003).

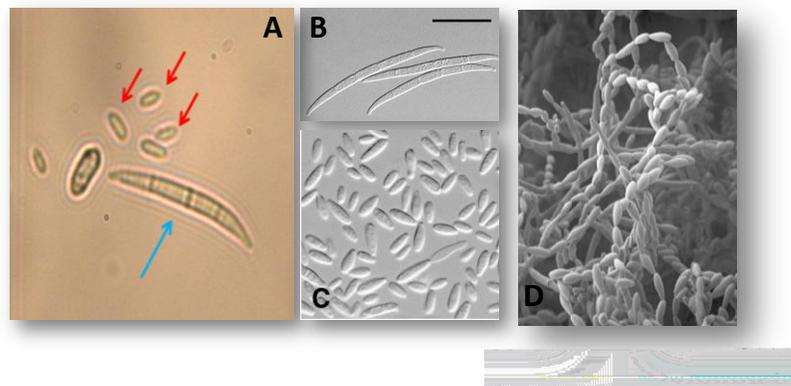


Figura 1. Estructuras infectivas del hongo *F. verticillioides*. A) Las flechas rojas indican los microconidios y la flecha azul indica un macroconidio (400X). Fotografía de Figueroa-López. B) macroconidios, C) microconidios. Barra de escala = 25 μ m Fotografías B y C obtenidas de Leslie y Summerell, 2006, D) Microconidios en cadena característica de *Fusarium verticillioides*, Fotografía obtenida de Duncan y Richard, 2010.

La muerte de las plantas de maíz no es común durante el estado parasítico, pero causa pérdidas económicas. Este fitopatógeno, además de sobrevivir en restos orgánicos de cultivos anteriores (Cotton y Munkvold, 1998), también se transmite a través de semillas (Bacon *et al.*, 1992). En el suelo, *F. verticillioides* regularmente no produce clamidosporas, sino hifas de pared engrosadas que aparentemente prolongan su persistencia (Nelson, 1983).

2.7 Control biológico de *Fusarium* con bacterias

En la agricultura moderna, se intenta lograr la sostenibilidad de la productividad agrícola. El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos impactan significativamente la sostenibilidad de la agricultura. La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos, han reducido la biodiversidad en los agrosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta, entre otros efectos nocivos, como son la incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Este y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas biológicas de manejo de plagas y enfermedades (Zavaleta, 1999).

En México se han orientado estudios hacia la búsqueda de resistencia de los híbridos a enfermedades como la pudrición de mazorca causada por *Fusarium* y *Diplodia*. Algunos genotipos de maíz al ser evaluados en distintas condiciones climáticas en regiones diferentes del país, presentan rendimientos variables, así como un comportamiento diferente en lo que respecta a la respuesta a la enfermedad. Durante este proceso se identificó un híbrido de cruce simple, que tiene resistencia a pudrición de mazorca causada por los hongos de los géneros *Diplodia* y *Fusarium*; dicho material fue competitivo en el rendimiento con los híbridos comerciales. Se enfatizó que la variabilidad de los patógenos en cada región es determinante para la selección de híbridos resistentes (Betanzos *et al.*, 2009).

En la actualidad, se busca implementar técnicas de control de biológico enfermedades, ó de organismos-plaga, para diferentes cultivos a nivel regional. El control biológico de plantas puede ser una alternativa promisoría para el manejo de plagas y enfermedades; a demás de limitar el uso de pesticidas sintéticos (Nagórska *et al.*, 2007). Se han reportado que algunas bacterias, tienen un efecto indirecto en las raíces de las plantas, al secretar metabolitos como lo son los antibióticos,

sideróforos y ácido cianhídrico, que inhiben el desarrollo de organismos fitopatógenos (Glick, 1995; Myoungsu *et al.*, 2005).

Se han realizado estudios para implementar algún método que ayude a los agricultores a combatir el problema de la fusariosis en el cultivo del maíz, pues durante los últimos años las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se han incrementado. La fusariosis es una enfermedad que afecta no sólo al maíz sino también a cultivos como trigo, sorgo, frijol, soya, algodón, tomate, cacahuate, plátano, pimiento verde y algunos forrajes (Bacon y Hinton, 1996; Luna-Olvera, 1998).

Al evaluar la efectividad biológica *in vitro* de bacterias como *P. fluorescens* y *Burkholderia* sp. contra *F. verticillioides* *in vitro*, se determinó inhibieron de 38-68% el crecimiento del fitopatógeno. En pruebas *in vivo* estas bacterias disminuyeron los síntomas de la enfermedad 67-88 % cuando las plantas de maíz se inocularon con estas bacterias y posteriormente se sembraron en suelo infestado con el hongo (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2008).

Bacillus amyloliquefaciens y *Microbacterium oleovorans* son bacterias que inhiben el crecimiento de *F. verticillioides*, además de disminuir la concentración de fumonisinas en los granos del maíz (Pereira *et al.*, 2007). En estudios *in vitro*, *Azotobacter armeniacus* y *Arthrobacter globiformis* inhibieron en 80 a 100% y 71 a 80% al mismo hongo, respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 2004). Se ha informado que *B. subtilis* también, inhibe el desarrollo *in vitro* de *F. verticillioides* en 28-78% y reduce la producción de fumonisinas entre 29 y 50% (Cavaglieri *et al.*, 2005).

2.8 Bancos de germoplasma

Se ha recurrido al tratamiento de semillas de maíz con los fungicidas captan y pentacloruro de nitrobenzeno (PCNB) para el control de *F. verticillioides*; sin embargo, se ha demostrado que el uso de éstos no es la mejor alternativa, a causa de los daños

que ocasionan sus residuos a la salud humana y por la contaminación que ocasionan al suelo (Kerry, 2000).

Actualmente, el control biológico es utilizado para diferentes cultivos de la región. Los microorganismos disponibles comercialmente para este fin, provienen de otras regiones; lo cual puede causar que la efectividad del producto no sea la esperada. En diversos estudios se ha comprobado que los microorganismos nativos de un suelo de determinada región, por estar adaptados a las condiciones edafológicas y climáticas, y por haber coevolucionado con los organismos de suelos de dicha zona, tienen mayor probabilidad de establecerse y tener éxito en el control biológico (Van der Heijden *et al.*, 1998).

Por otra parte, en México y en particular en Sinaloa, la información sobre la distribución cuantitativa y cualitativa de los microorganismos de la rizosfera es muy escasa, debido a que se han hecho pocos estudios de identificación taxonómica a nivel microorganismo. Nuestro grupo ha explorado la diversidad de microorganismos presentes en la rizosfera del cultivo del tomate (Cordero-Ramírez, 2008; Cordero-Ramírez *et al.*, 2011) y muy recientemente en maíz (Cordero-Ramírez, tesis de doctorado en proceso) a partir de este último estudio, se generó un banco de microorganismos nativos de los suelos de Sinaloa, con fines de descubrir microorganismos asociados a la rizosfera de maíz, con potencial antagonista a *F. verticillioides*.

Entre los beneficios que se pueden obtener al establecer este tipo de bancos, destaca el hecho de conformar una reserva de microorganismos con potencial antagonista contra fitopatógenos específicos. Un ejemplo reciente es el trabajo de Cordero-Ramírez (2008) en el cual se detectaron diez aislados con potencial antagonista contra el hongo *F. oxysporum f. sp. radialis-lycopersici* (Forl) *in vitro*; de estos se seleccionaron tres aislados que inhibieron a Forl en pruebas *in planta*, en placas de Petri (Cordero-Ramírez, 2008).

2.9 Construcción y naturaleza del banco de germoplasma bacteriano de rizosfera de maíz a emplear en la presente tesis

El presente trabajo parte de la creación de un banco de germoplasma de microorganismos de la rizosfera del maíz. El trabajo fue parte de la tesis doctoral del M.C. Jesús Damián Cordero Ramírez (2009-2011). Para elaborar el banco de germoplasma se tomaron muestras de suelo de la rizosfera de maíz en cultivos distribuidos en Sinaloa.

Para coleccionar las muestras de suelo se buscaron lotes que presentaron síntomas de la enfermedad en maíz causada por *Fusarium sp.* Se tomó un total de diez muestras por cada punto de muestreo, cinco plantas con sintomáticas y cinco plantas asintomáticas. Estas muestras se combinaron para constituir una sola muestra compuesta conteniendo la rizosfera de cinco plantas para cada condición por lote, en total 10 muestras compuestas (Tabla 1).

Tabla 1. Puntos de muestreo y localización del sitio donde se colectaron las muestras, por medio de sistema de posicionamiento global (GPS). Tomado de Cordero-Ramírez (Tesis Doctoral en proceso).

Punto	Serrano		Alhuey		18 de diciembre		Casa Blanca		La Trinidad	
	N	W	N	W	N	W	N	W	N	W
1	Sana 1		Sana 1		Sana 1		Sana 1		Sana 1	
	25°29.351'	108°13.017'	25°22.049'	108°08.742'	25°17.204'	108°08.103'	25°25.796'	108°25.561'	25°43.114'	108°29.115'
2	Sana 2		Sana 2		Sana 2		Sana 2		Sana 2	
	25°29.349'	108°13.018'	25°22.053'	108°08.737'	25°17.203'	108°08.103'	25°25.793'	108°25.558'	25°43.121'	108°29.117'
3	Sana 3		Sana 3		Sana 3		Sana 3		Sana 3	
	25°29.349'	108°13.018'	25°22.053'	108°08.738'	25°17.205'	108°08.098'	25°25.789'	108°25.561'	25°43.121'	108°29.115'
4	Sana 4		Sana 4		Sana 4		Sana 4		Sana 4	
	25°29.342'	108°13.016'	25°22.069'	108°08.733'	25°17.209'	108°08.96'	25°25.791'	108°25.561'	25°43.121'	108°29.116'
5	Sana 5		Sana 5		Sana 5		Sana 5		Sana 5	
	25°29.338'	108°13.017'	25°22.071'	108°08.727'	25°17.209'	108°08.93'	25°25.791'	108°25.561'	25°43.113'	108°29.121'
6	Enferma 1		Enferma 1		Enferma 1		Enferma 1		Enferma 1	
	25°29.352'	108°13.015'	25°22.056'	108°08.724'	25°17.204'	108°08.103'	25°25.796'	108°25.566'	25°43.110'	108°29.114'
7	Enferma 2		Enferma 2		Enferma 2		Enferma 2		Enferma 2	
	25°29.348'	108°13.014'	25°22.048'	108°08.722'	25°17.203'	108°08.101'	25°25.794'	108°25.560'	25°43.119'	108°29.115'
8	Enferma 3		Enferma 3		Enferma 3		Enferma 3		Enferma 3	
	25°29.347'	108°13.013'	25°22.045'	108°08.722'	25°17.206'	108°08.098'	25°25.791'	108°25.561'	25°43.119'	108°29.117'
9	Enterma 4		Enterma 4		Enterma 4		Enterma 4		Enterma 4	
	25°29.344'	108°13.012'	25°22.045'	108°08.720'	25°17.209'	108°08.093'	25°25.787'	108°25.556'	25°43.125'	108°29.122'
10	Enferma 5		Enferma 5		Enferma 5		Enferma 5		Enferma 5	
	25°29.344'	108°13.012'	25°22.046'	108°08.718'	25°17.214'	108°08.089'	25°25.787'	108°25.559'	25°43.115'	108°29.120'

El suelo tamizado se utilizó para hacer diluciones seriales en los diferentes medios de cultivo que se emplearon para aislar la mayor diversidad de microorganismos posibles.

Con las muestras compuestas se elaboraron diez sub-bancos: cinco sub-bancos con microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas donde no se observó sintomatología y cinco con microorganismos aislados de la rizosfera de plantas sintomáticas. De cada uno de los sub-bancos, se tomaron 1,152 microorganismos del suelo para elaborar el banco de microorganismos que está conformado por 11,520 microorganismos aislados y purificados a partir de colonias individuales. Los diferentes medios de cultivo que se utilizaron fueron para favorecer ciertos grupos de microorganismos LB (Luria-Bertani) para *Bacillus*, MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para bacterias ácido lácticas, agar para el aislamiento de

actinomicetos (AIA) y agar B de King para *Pseudomonas*, con el propósito de obtener la mayor diversidad posible de microorganismo cultivables.

Es a partir de este banco que se plantea en el presente trabajo de tesis seleccionar entre los 11,520 microorganismos aislados aquellos potenciales antagonistas al hongo fitopatógeno *F. verticillioides*.

2. JUSTIFICACIÓN

El Estado de Sinaloa es una región agrícola, que cuenta con aproximadamente 1, 400, 000 ha de tierras de cultivo; área que representan aproximadamente el 25% de la superficie total del estado. El maíz tiene gran demanda en nuestro país y del volumen anual consumido, se importa aproximadamente 10-20%. En 2008-2009 se obtuvieron alrededor de 5, 236, 000 ton en el ciclo de siembra otoño-invierno del 2008-2009 (<http://www.siap.sagarpa.gob.mx>).

En la última década la superficie de maíz se ha incrementado sustancialmente por ser un cultivo rentable económicamente, lo que ha propiciado el monocultivo. Esta práctica nociva ha favorecido el establecimiento de especies de patógenos oportunistas como *Fusarium* spp. Este hongo es responsable de la pudrición de tallos, una de las principales enfermedades que amenaza este cultivo.

En la actualidad, los agentes bioprotectores se emplean para el control de enfermedades en cultivos de importancia agrícola, en muchos casos en forma empírica. Sin embargo, su eficacia no es la esperada debido en su gran medida a que los microorganismos empleados no son nativos de la región donde se utilizan. Por lo anterior, el presente estudio se dirigió hacia la búsqueda de microorganismos nativos de Sinaloa y a la su evaluación de su efectividad biológica en el control de la pudrición de tallos.

Por otra parte, en la búsqueda de aislados de microorganismos antagónicos, con potencial de desarrollo y posterior uso comercial en el control biológico, una de las principales limitaciones es la escasez de técnicas de escrutinio, que sean rápidas y confiables. La técnica de cultivos duales, es una de las más utilizadas. Sin embargo, presenta las siguientes desventajas: la necesidad de espacio para realizar los bioensayos en cajas Petri, debido a la cantidad de microorganismos a estudiar, así como también, el espacio para colocar el experimento y la duración del bioensayo. En contraste con los ensayos en medio líquido el espacio para realizar 96

bioensayos se reduce considerablemente, siendo más eficiente y realizar 384 bioensayos al día.

De esta manera se planteó esta técnica, y no solo puede utilizarse para analizar este hongo, sino que también puede adaptarse para otros patógenos fúngicos; teniendo una rápida respuesta para obtener microorganismos antagonistas contra enfermedades que ataquen otros cultivos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Realizar un escrutinio masivo automatizado de la totalidad de microorganismos del banco de germoplasma de la rizosfera de maíz (11, 520 aislados) para detectar antagonistas potenciales a *Fusarium verticillioides* y probar su efectividad biológica *in vitro* e *in planta*.

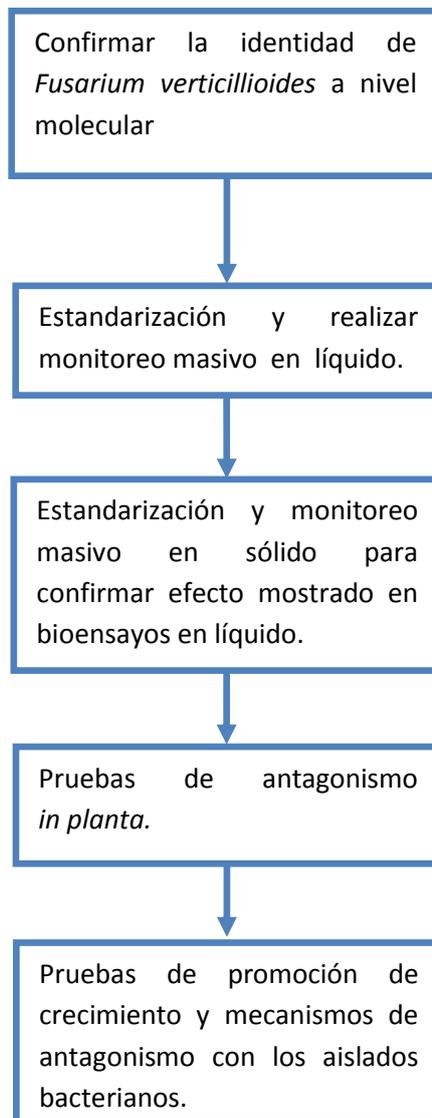
4.2 Objetivos específicos.

1. Identificar molecularmente de los aislados patogénicos de *Fusarium* a emplear en el presente trabajo.
2. Desarrollar la metodología de monitoreo masivo en medio líquido para los microorganismos del banco de germoplasma en cuanto a su capacidad bioprotectora contra el ataque de *Fusarium in vitro*.
3. Estandarización de la metodología de monitoreo masivo en medio sólido para los microorganismos del banco de germoplasma en cuanto a su capacidad bioprotectora contra el ataque de *Fusarium* y corroborar su antagonismo *in vitro*.
4. Realizar pruebas de hemólisis para descartar a los microorganismos de la rizosfera de maíz con características hemolíticas.
5. Realizar pruebas de antagonismo *in planta* con semillas desinfectadas de maíz blanco cv. cebú con aislados bacterianos obtenidos de las pruebas de antagonismo *in vitro*.
6. Realizar pruebas de compatibilidad entre aislados bacterianos potencialmente antagonistas.

7. Analizar posibles mecanismos de promoción del crecimiento y antagonismo de los aislados bacterianos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Esquema general de trabajo



5.2 Identificación Molecular de los aislados de *Fusarium verticillioides*.

Se realizó la extracción de DNA genómico de tres aislados patogénicos de *Fusarium*, por medio del kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (siguiendo las recomendaciones del proveedor) y con la ayuda de la plataforma automatizada QIAcube (Qiagen). El ADN genómico se empleó para la identificación molecular posterior, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones se prepararon de la siguiente manera: 1.25 µl de Buffer 10X proporcionado con la enzima; 0.5 µl de cada oligonucleótido (10 µM); 1 µl de dNTPs (100 µM); 0.5 µl de cloruro de magnesio (50 mM); 0.125 µl de la enzima Taq polimerasa Invitrogen (5 U/µl) y utilizando 1 µl de DNA genómico como templado, llevando a un volumen final de 12.5 µl con agua ultrapura.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar la región intergénica del DNA ribosomal (White *et al.*, 1990) (Figura 2) tuvieron la siguiente secuencia: ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

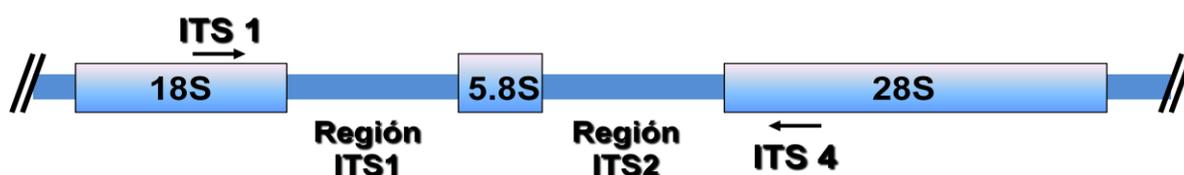


Figura 2. Posición relativa de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región del DNA ribosomal.

Las condiciones para los ciclos térmicos de PCR fueron, un primer paso de 1 minuto a 95°C; 45 segundos de desnaturalización a 95°C; 1 minuto de anillamiento a 68°C y 1 minuto de elongación a 72°C. Estos pasos se repitieron por 35 ciclos, y para finalizar un paso a 4°C por 5min y posteriormente almacenar la reacción a -20°C hasta su uso. Con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 se obtuvo un fragmento del ADN ribosomal de 700pb. Posteriormente, los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA, Cat. No. 28106). El ADN se cuantificó empleando un lector multimodal para

placas de 96 pozos (Beckman, Cat. No. DTX-880) por fluorimetría siguiendo las recomendaciones del proveedor del Quant-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, EUA, Cat. No. Q32854). Las muestras de ADN amplificado se secaron en un horno a 45°C durante toda la noche y se enviaron a secuenciar de manera unidireccional al Cinvestav, Irapuato, empleando un equipo ABI Prism 3100.. Una vez obtenida la secuencia se efectuaron comparaciones en el banco de genes (GENBAK) empleando el software BLASTN y el algoritmo Megablast.

5.3 Material Biológico:

5.3.1 *Fusarium verticillioides*

Se realizaron siembras de hongo en medio de cultivo PDA, y se incubaron a 25°C durante 7 días, posteriormente se realizaron lavados de las hifas del hongo para obtener los conidios los cuales se re suspendieron en agua destilada estéril. En los experimentos se utilizó una suspensión de conidios, debido a que son las estructuras de origen asexual de *F. verticillioides* mas abundantes en la naturaleza. Se realizó un conteo de microconidios con una cámara de Neubauer para estimar la concentración por mililitro y ajustar la concentración 1×10^5 para los experimentos.

5.3.2 Microorganismos del banco

Los microorganismos que se utilizaron pertenecen a la colección científica CIIDIR-003 que contiene 11, 520 aislados bacterianos.

Los microorganismos fueron descongelados y usados en los experimentos de la siguiente manera tal como se muestra en la Figura 3:

- A) Se colocaron 500 μ L de medio de cultivo de papa-dextrosa en una placa de 96 pozos de 2 ml empleando una pipeta repetidora automática con una punta estéril de 50 ml.
- B) Se tomó la placa del banco de germoplasma a -70°C con los microorganismos que se iban a descongelar.

- C) Se usó un set de 96 puntas de 200 μ l para realizar un raspado de cada uno de los aislados tomando un poco de hielo de cada aislado; se mantuvo sujetas las puntas para evitar contaminación entre los aislados, esto se logró usando una gradilla de una caja de puntas de 200 μ l, como se muestra en la figura 3C.
- D) Se verificó visualmente la presencia de residuos de hielo en cada una de las puntas para depositarlos en los pozos en las placas de 2ml con medio de cultivo en caldo de papa-dextrosa donde se reactivaron y usarlos en los bioensayos de antagonismo.

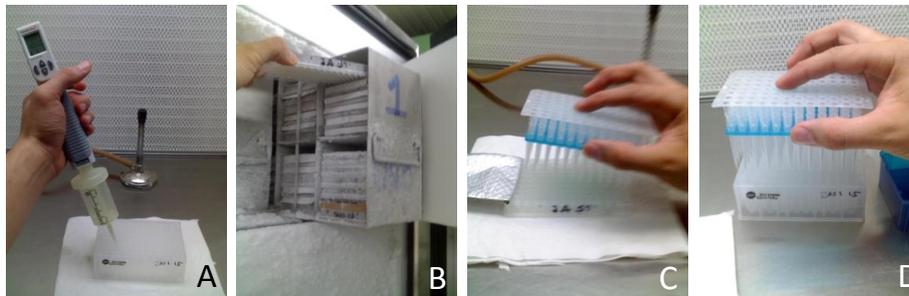


Figura 3. Procedimiento para descongelar los microorganismos del banco. A) Colocación de caldo de papa-dextrosa; B) Tomar los microorganismos del banco; C) Hacer el raspado de los microorganismos con set de puntas; D) colocar el raspado del microorganismo en el medio de cultivo .

5.4 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido

Con el fin de estudiar aquellos microorganismos con potencial antagonista a *Fusarium*, se estandarizó una técnica de monitoreo en medio líquido, evaluando el crecimiento del hongo de manera relativa.

Para estandarizar la técnica, se realizó una curva de crecimiento del hongo y así establecer la cantidad de tejido fúngico requerida para utilizar en el experimento. De igual manera se realizó otro ensayo para determinar la cantidad necesaria de WGA para medir el tejido fúngico.

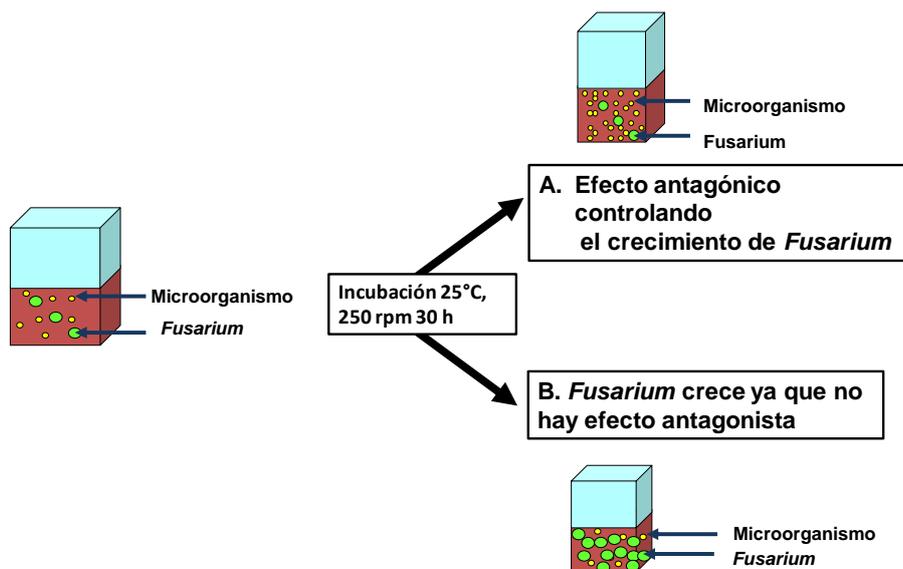


Figura 6. Principio en el cual se basan las pruebas de antagonismo en medio líquido (Esquema proporcionado por Maldonado-Mendoza).

A partir de los aislados del banco de germoplasma se realizaron los bioensayos *in vitro* automatizados de acuerdo a como se describe a continuación:

1. Se utilizó una concentración de 1×10^5 microconidios de una cepa de *Fusarium*, caracterizada como altamente patagénica (comunicación personal Rubén Félix Gastélum, Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, 2009), en cada pozo de la placa de 96 con capacidad de 2 ml se colocó 500µL de caldo de cultivo de papa-dextrosa para realizar el bioensayo.
2. Se tomó una muestra de microorganismos del banco de germoplasma congelados a -70°C en placas para PCR con solapa (skirted) de 0.2 ml; como se indica en la figura 3 y se inocula el medio de cultivo con el microorganismo del banco y posteriormente se colocó el hongo y se incubaron durante 30 hr a 25°C con agitación a 250 rpm.
3. Posteriormente, se centrifugaron las placas con 96 bioensayos a 5, 900 rpm por 5 min, empleando una centrífuga Beckman (modelo J-30I) y un rotor tipo canastilla (JS 5.9) y se eliminó el sobrenadante. Los siguientes pasos de manejo de líquidos fueron ejecutados con la plataforma robótica Qiagility de Qiagen.

4. La pastilla se re-suspendió y se lavó tres veces en 0.5 ml de solución de buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 para eliminar el exceso de medio y dejar solo la pastilla de hongo y bacteria.
5. Posteriormente, se re-suspendió en 0.5 ml de buffer PBS y se agregó el anticuerpo de la aglutinina de germen de trigo WGA (wheat germ agglutinin) el cual se une específicamente a las paredes de quitina del hongo. Se colocaron por cada pozo 0.5 μ l de anticuerpo a una concentración de 1 μ g/ μ L. Este anticuerpo se encuentra químicamente acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor 488 nm, cuya fluorescencia puede ser cuantificada empleando un lector multimodal (DTX-880 de Beckman).
6. La placa se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y se enjuagó con 0.5 ml de buffer de fosfatos para eliminar todo el fluoróforo no acoplado al hongo. Se repitió el paso de centrifugación y finalmente la pastilla se re-suspendió en un volumen de 0.2 ml de buffer de fosfatos para evaluar su fluorescencia en el lector multimodal.
7. La fluorescencia se evaluó con respecto a los controles conteniendo el hongo cultivado solo como control. La disminución en la fluorescencia con respecto al control se empleó como un indicativo del efecto antagonista de los aislados sobre el crecimiento del hongo.
8. Se estimaron de manera relativa las unidades de fluorescencia del control sin antagonista, se calculó el porcentaje de inhibición de *Fusarium* en cada uno de los bioensayos y se seleccionaron los microorganismos que causaron una disminución de al menos el 60% de crecimiento del fitopatógeno.

Para evaluar el porcentaje de crecimiento fúngico en el bioensayo en medio líquido se utilizó la siguiente fórmula: % de Crecimiento = $F_{TE} / F_{CTL} \times 100$ donde F_{TE} es la fluorescencia total en el bioensayo y F_{CTL} es la fluorescencia en el control sin organismo antagónico. El porcentaje de inhibición se calculó restando a 100 el % de crecimiento. Se empleó como criterio de selección un mínimo del 60% de inhibición de producción de biomasa de *Fusarium*, por el microorganismo antagonista.

5.5 Estandarización de monitoreo de antagonismo en medio sólido.

Los ensayos en la fase sólida tuvieron el mismo fundamento que los realizados de manera convencional en placas Petri (Figura 4). Con la ventaja que se realizaron 96 ensayos por placa en menor tiempo de preparación. En cada pozo con PDA, se colocó una bacteria y 1×10^3 microconidios de *F. verticillioides*. Como control se inoculó el patógeno solo. Posteriormente se incubaron en el laboratorio, 48 hr a 25°C en papa-dextrosa-agar (Figura 4).

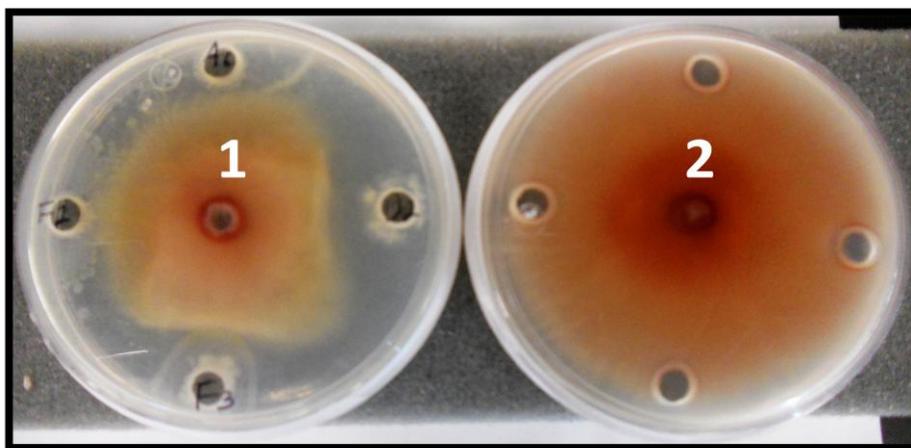


Figura 4. Ensayo convencional utilizando para probar antagonismo de bacterias contra *F. verticillioides* en placas Petri con PDA; 1) Bioensayo enfrentando a *F. verticillioides* con cuatro aislados bacterianos donde se observa halo de inhibición en dos de ellos; 2) crecimiento micelial de hongo sin antagonistas.

Para montar el bioensayo de antagonismo en papa-dextrosa-agar a cada columna de pozos del lado izquierdo se trazó una línea la cual se tomó de guía para colocar el inóculo de *F. verticillioides*, y una al lado derecho del mismo pozo otra línea la cual se tomó de referencia para colocar las bacterias a enfrentar contra el hongo (Figura 5). Este bioensayo se colocó por triplicado. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: donde el diámetro total del pozo y el halo son los milímetros que inhibió la bacteria.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Halo (mm)}}{\text{Máximo de inhibición (mm)}} \times 100$$

Solo se seleccionaron los microorganismos que mostraron inhibición en las tres réplicas de al menos el 45% en el bioensayo en papa-dextrosa-agar.

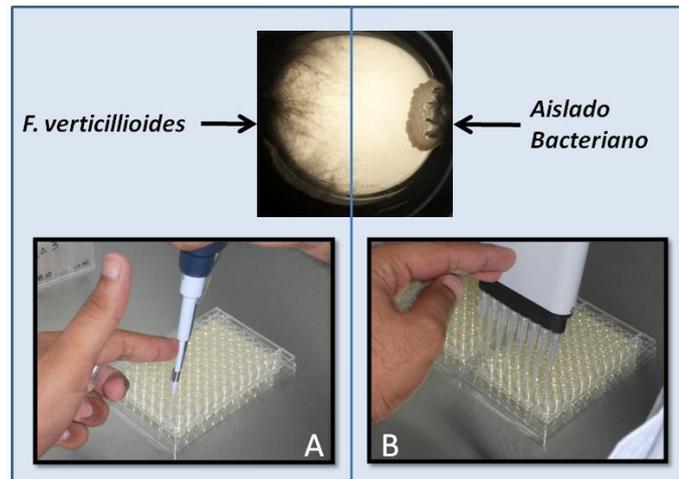


Figura 5. Método de inoculación. A) Inoculación con *Fusarium verticillioides* en ensayos en medio sólido, del lado izquierdo de los pozos; B) Inoculación de los aislados bacterianos del lado derecho de los pozos en las pruebas en placas multi celdas con papa-dextrosa-agar (PDA).

5.6 Pruebas de hemólisis como criterio para la selección de cepas con mayor potencial antagonista.

Uno de los métodos para seleccionar o clasificar microorganismos es la prueba de hemólisis, ésta se basa en el efecto de una proteína llamada hemolisina, que ejerce una acción lítica sobre los glóbulos rojos contenidos en medio agar sangre (Herlax *et al.*, 2002). Esta prueba se realiza con el fin de descartar aquellos aislados antagonistas que puedan tener un factor de patogenicidad para el humano. Este ensayo se llevo a cabo en placas de agar sangre, en las que se realizó una perforación con un horador. En las perforaciones se colocó 150 μ l de medio cultivo sobrenadante donde se crecieron los aislados bacterianos durante 24 h. Las placas de agar sangre se incuban durante 24 h a 37°C.

Los criterios de la prueba de hemólisis son los siguientes:

- a) Se denomina hemólisis alfa (α -hemólisis) cuando se presenta un obscurecimiento verdoso en el medio de cultivo donde se encuentran las colonias y se denomina también hemólisis parcial.
- b) Hemólisis beta (β -hemólisis) se caracteriza por el desarrollo de un halo claro en el medio agar sangre, y también se denomina hemólisis total, por el efecto de la lisis total de los eritrocitos.
- c) Si el microorganismo no presenta ningún tipo de aclaramiento del medio de cultivo se le denomina hemólisis gamma (γ -hemólisis) o no hemolítico (Forbes *et al.*, 2002).

Se seleccionaron únicamente los aislados con hemólisis gamma o alfa para continuar en la siguiente prueba de antagonismo *in planta*.

5.7 Pruebas de antagonismo *in planta*.

Para este experimento, se utilizaron semillas de maíz blanco (variedad Cebú de Asgrow), las cuales se desinfectaron previo a los bioensayos. El proceso de desinfección consistió en colocar las semillas en hipoclorito de sodio al 0.75 % por 20 min, a una temperatura de 52°C y lavarlas tres veces con H₂O destilada estéril, empleando un tiempo de 5 min cada lavado. Esta técnica de tratamiento termo-químico se desarrolló en el laboratorio del Dr. Rubén Félix Gastélum. Posteriormente, para verificar que las semillas se encuentran libres de *Fusarium*, estas se siembran en medio selectivo para *Fusarium* (Komada, 1975).

Los aislados que resultaron alfa y gamma hemolíticos que se usaron para las pruebas en plántulas, se sometieron previamente a cinéticas de crecimiento, para conocer el tiempo de incubación que los microorganismos necesitan para entrar a la fase estacionaria. En esta fase la mayoría de los microorganismos bacterianos producen los metabolitos secundarios encargados de inhibir el crecimiento del patógeno.

A los valores de absorbancia se les convirtió a logaritmo natural para observar mejor el crecimiento bacteriano en la etapa de acondicionamiento que presentan las bacterias antes de entrar a la fase exponencial.

Para las pruebas in planta, los aislados bacterianos se seleccionaron con base en su efecto antagonista en medio líquido y sólido. Los microorganismos escogidos se descongelaron del banco de germoplasma y se sembraron en placas de medio de cultivo sólido (LB) y se incubaron a 25°C por 24 h. Enseguida con la ayuda de un palillo estéril las cepas bacterianas se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio líquido LB y se dejaron en agitación a 25°C y agitación constante 200 rpm por 24 h. Las bacterias se recuperaron en forma de pastilla, centrifugación a 9, 000 g por 5 min empleando una centrifuga Beckman. La pastilla fue resuspendida en 50 ml de H₂O destilada estéril en tubos tipo Falcon. Cada aislado se creció y se utilizó un inóculo con 1×10^6 unidades formadoras de colonias. Las semillas de maíz fueron embebidas en esta suspensión bacteriana con aproximadamente 153×10^6 ufc durante 20 min, y posteriormente se colocaron en cajas tipo magenta con 3 semillas por unidad experimental y a los dos días se inoculó el sustrato (arena estéril) con aproximadamente 1×10^5 conidios por gramo de suelo de *F. verticillioides*. Las plantas se incubaron a 16 h luz a 25°C y 8 h oscuridad, a 20°C. En total se establecieron 14 tratamientos, con tres repeticiones, en un diseño completamente al azar.

El experimento duró de 45 a 60 días, se estimó volumen radical de las plántulas y nivel de severidad mediante una escala reportada por Wang *et al.*, (2000). Los datos se convirtieron a porcentaje de severidad, mediante la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943). Los datos originales se normalizaron utilizando el logaritmo natural y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y para la comparación múltiple entre medias se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0.05$); utilizando el paquete estadístico SAS.

5.8. Posibles mecanismos de actividad antagónica contra patógenos

5.8.1 Producción de quitinasas

Las bacterias se desarrollaron en medio de cultivo agar LB durante 24 hr a 25°C, posteriormente se transfirieron a agar quitina coloidal.

La quitina coloidal se preparó con 3 g de quitina en polvo (Sigma) en 40 ml de HCl concentrado con agitación constante durante 6 horas. Después se agregaron 200ml de etanol absoluto a 4° C y se mantuvo en agitación a 25°C durante toda la noche. Se centrifugó a 10000 rpm durante 20min. Se lavó la quitina con agua destilada estéril, hasta que el pH se mantuvo neutro. Después se centrifugó a 10, 000 rpm por 20 min y se verificó que el pH se mantuviera neutro. Se colectó la quitina con una espátula después de centrifugar y se eliminó el sobrenadante; se liofilizó y posteriormente se mantuvo a 4° C hasta su uso. El agar quitina coloidal se preparó con (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.1g, NaCl 1g, MgSO₄·7H₂O 0.01 g, extracto de levadura 0.05 g, quitina coloidal 0.5 g y agar 1.5 g, en 50 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121° C por 20 min y posteriormente se dispensó en placas Petri.

5.8.2 Solubilización de fosfatos

El ensayo para determinar la solubilización de fosfatos por las bacterias antagonistas, se realizó en el medio de cultivo Agar Pikovskaya (Rao and Sinha, 1962). Cada aislado se estrió en el medio Pikovskaya y se incubó durante 72 h a 25°C. La formación de un halo claro en el medio de cultivo alrededor de la colonia, indica una reacción positiva para la solubilización de fosfatos para ese aislado.

5.8.3 Producción de ácido indolacético

Se descongelaron los aislados y se crecieron por 24 h a 25°C en medio de cultivo líquido; se centrifugó a 10, 000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Se tomaron 100 µl de sobrenadante y se hizo reaccionar con 100 µl del reactivo de Salkowsky. Este reactivo se preparó con 0.53 g de FeCl₃, 21.9 ml de H₂SO₄ Q.P. y se aforó a 50 ml. La reacción se llevó a cabo en placas en formato de 96 de 0.2

ml con una relación 1:1 (v/v). La aparición de un color rojizo indica producción de ácido indolacético.

5.9 Pruebas de compatibilidad entre aislados

Los aislados gamma hemolíticos se transfirieron al medio LB agar y se incubaron durante 24h a 25°C; enseguida se realizaron cultivos duales en placa Petri para determinar si existe compatibilidad y poder considerar la posibilidad de utilizarlos en mezclas, con el fin de tratar de aumentar la eficacia del inóculo bacteriano en la prevención de la enfermedad.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación molecular de los aislados patogénicos de *Fusarium verticillioides*

En el presente estudio se utilizaron tres aislados de *Fusarium* a partir de plantas con síntomas de pudrición de raíz y tallo y sus características morfológicas los ubicaron como *F. verticillioides*. Para los tres aislados patogénicos analizados por secuenciación se obtuvo un porcentaje de identidad entre 99 y 100% con *Gibberella moniliformis*, confirmando así que pertenecen al grupo filogenético donde se encuentra *Fusarium verticillioides* (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis con el software BLAST-N de las secuencias de los aislados patogénicos que se usaron en este trabajo.

Aislado	Accesion	Descripción	identidad
P-01	GU982311.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	99%
P-02	GU982311.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	99%
P-03	GU982311.1	<i>Gibberella moniliformis</i>	100%

6.2 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido

6.2.1 Estandarización de la cantidad de WGA Alexa Fluor 488 nm (wheat germ agglutinin) a emplear en el ensayo de antagonismo en medio líquido

Para hacer las mediciones del tejido fúngico se hicieron pruebas a diferente concentración de WGA-Alexa Fluor 488 nm para establecer la cantidad mínima necesaria a utilizar en los experimentos. Se evaluaron cinco concentraciones de WGA (0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.25 µg) y cuatro cantidades de conidios (1×10^3 ; 1×10^4 ; 1×10^5 y 1×10^6) de *F. verticillioides*.

Se observó una tendencia de aumento en las unidades de fluorescencia (UF) al utilizar las concentraciones de 0.5 y 1 µg de WGA, lo que no sucedió con

las de 0.1 y 0.25 μg (Figura 7). Sin embargo, estas dos últimas concentraciones de WGA, fueron consistentes cuando se utilizó un nivel inferior a 1×10^4 conidios pero no fueron suficientes para discernir entre concentraciones superiores a 1×10^4 , probablemente por agotamiento del WGA. Al usar 1.25 μg de WGA hubo un notorio aumento en las unidades de fluorescencia, para las diferentes concentraciones de conidios del hongo, probablemente debido a que estas concentraciones resultan excesivas y esto repercute en la medición. A causa de lo anterior, posiblemente los lavados realizados para retirar el WGA residual, no sean suficientes para eliminar material que no logró acoplarse al hongo. Se observó también que la concentración de 1×10^3 conidios tiene valores de fluorescencia similares al medirlos con 0.1, 0.25, 0.5 y 1 μg de WGA; esto indica que desde 0.1 μg hasta 1 μg permite detectar pequeña cantidad de tejido que genera el hongo (1×10^3 conidios) después de las 48 h que de incubación.

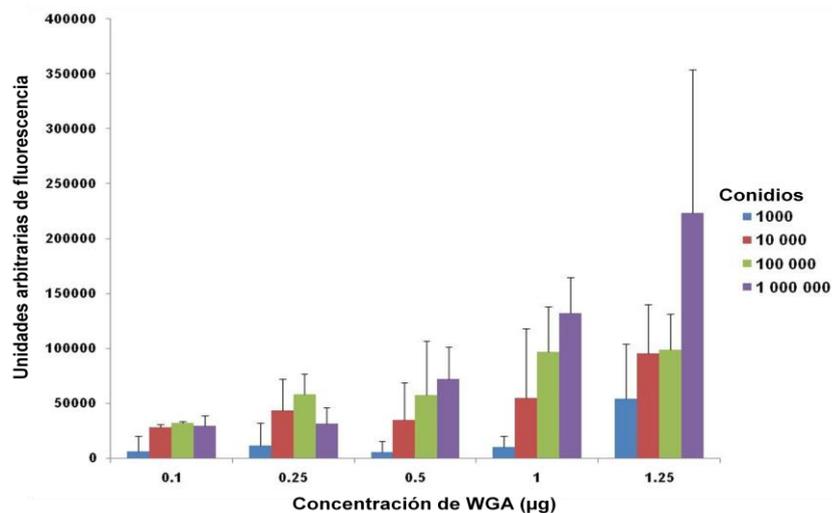


Figura 7. Evaluación de diferentes concentraciones de WGA.

En base a este análisis, se estableció que la concentración de 1 μg de WGA es la óptima, para discernir entre las diferentes cantidades de tejido fúngico en el experimento. Por otro lado, el uso de una cantidad excesiva de fluoróforo puede ocasionar un aumento en la fluorescencia debido a los residuos que puedan quedar al momento de hacer las lecturas.

6.2.2 Determinación de la cantidad óptima de tejido fúngico a emplear para el ensayo en medio líquido

Posteriormente se realizó una cinética de crecimiento del hongo para observar el comportamiento del tejido fúngico y establecer los tiempos de duración del experimento. En este ensayo se utilizaron tres diferentes concentraciones de conidios 1×10^4 ; 1×10^5 y 1×10^6 . En la Figura 8 se muestra el crecimiento exponencial que tiene *F. verticillioides* al cultivarlo en medio líquido, fue evidente que la utilización de 1×10^5 y 1×10^6 conidios generan una biomasa fúngica similar después de 36 h de incubación. La concentración de 1×10^4 microconidios produjo menos tejido fúngico durante las primeras 36 h y se incrementa hasta las 48 h, produciendo una fluorescencia similar a la de 1×10^5 conidios. A las 72 h se observa un decremento en las unidades de fluorescencia en las concentraciones de 1×10^4 y 1×10^6 de conidios, lo cual se esperaba continuara el aumento en biomasa y por ende en fluorescencia. Este comportamiento atípico se le atribuye a las dificultades técnicas que presenta el tejido fúngico para ser manipulado, debido a la gran cantidad de éste en las celdas de 2 ml, a las 72 h de incubación provocando que nos e forme una pastilla solida al centrifugarlo; en consecuencia, se origina pérdida de material al transferirlo de la placa multicelda de 2 ml a la placa multicelda óptica, para la lectura de fluorescencia.

Ante los problemas de manipulación del material fúngico, que se presentaron después de 36 h de incubación, se utilizaron 1×10^5 conidios con una incubación menor a las 36 h, ya que esta concentración genera la misma cantidad de tejido fúngico que 1×10^6 conidios, y fue la que presentó menos dificultades en su manipulación.

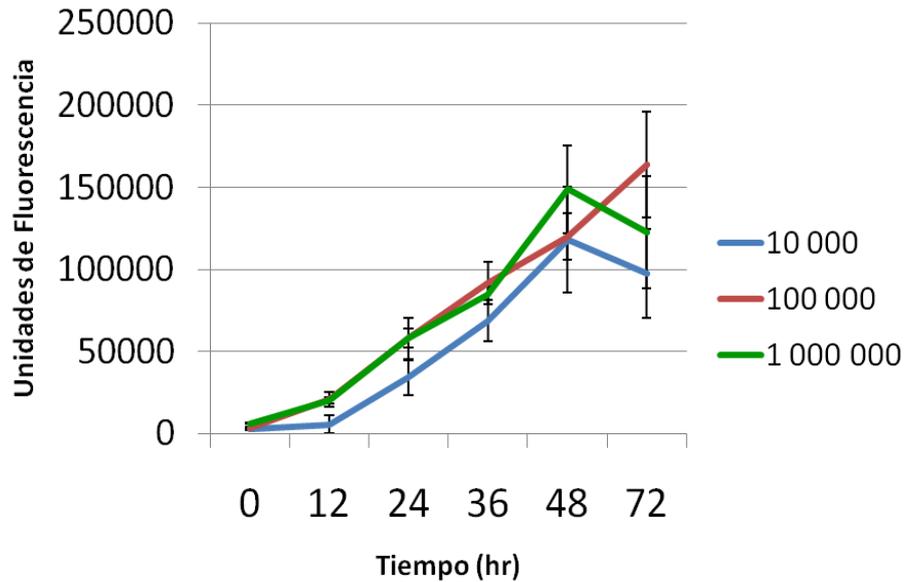


Figura 8. Cinética de crecimiento de *F. verticillioides* en medio de cultivo líquido.

6.2.3 Selección de aislados bacterianos con potencial antagonico mediante un escrutinio masivo de 11, 520 aislados

Se analizaron 11, 520 microorganismos del banco de germoplasma con la metodología en fase líquida. Una vez que se determinó la cantidad de conidios y la concentración de WGA a utilizar, se estableció que los aislados que mostraran un efecto inhibitorio del crecimiento fúngico igual o mayor a 60% serían seleccionados para continuar el escrutinio de antagonismo. Se seleccionaron 622 bacterias que presentaron porcentajes de inhibición de 60 % a 95 % (Ver Anexo 1). Posteriormente éstas fueron probadas *in vitro* en cultivos duales en medio de cultivo sólido para confirmar su capacidad antagonica a *F. verticillioides*.

Los géneros de microorganismos con capacidad antagonista en el ensayo masivo en medio líquido se muestran en la Tabla 3, siendo el género *Bacillus* el más abundante representado por 333 organismos, seguido por *Enterobacter* con 38, *Pseudomonas* con 22, *Lysinibacillus* con 13. También se encontraron miembros de los géneros *Anaerobranca*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas*. De los 622 microorganismos se encuentran 191 que aún no han sido identificados molecularmente, ya sea porque su secuencia no es similar a las registradas en el Genbank; o bien porque se presentó algún problema durante el proceso de

purificación de ADN, PCR o limpieza del producto de PCR obtenido, o no se obtuvo una secuencia de suficiente calidad para ser procesada. Estos 622 microorganismos fueron empleados para generar un sub-banco que contiene únicamente a estos aislados seleccionados para su subsiguiente uso en la confirmación de esta actividad antagonista observada en medio líquido o en ensayos en medio sólido. Este sub-banco se preparó por triplicado y las copias se conservan a -70°C en diferentes ultra congeladores del CIIDIR-Sinaloa.

Tabla 3. Géneros representativos de los 622 microorganismos seleccionados como potenciales antagonistas en las pruebas de medio líquido. N/I = no identificado

Géneros	No de microorganismos
<i>Acinetobacter</i> spp.	4
<i>Agrobacterium</i> sp.	3
<i>Anaerobranca</i> sp.	1
<i>Aquaspirillum</i> sp.	1
<i>Arthrobacter</i> spp.	3
<i>Bacillus</i> spp.	333
<i>Enterobacter</i> spp.	38
<i>Klebsiella</i> sp.	2
<i>Lysinibacillus</i> spp.	13
N/I	191
<i>Paenibacillus</i> spp.	4
<i>Pantoea</i> spp.	3
<i>Pseudomonas</i> spp.	22
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	4

6.3 Estandarización técnica del monitoreo en medio sólido en placas en formato de 96 pozos.

Del primer análisis masivo se seleccionaron 622 aislados que mostraron una capacidad de inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* hasta en un 100%. Se propuso realizar bioensayos de antagonismo en papa-dextrosa-agar para comprobar el efecto inhibitorio de los aislados antagónicos observado en líquido. Para esto se emplearon placas con formato de 96.

Los bioensayos en sólido se realizaron para confirmar el efecto inhibitorio obtenido en las pruebas en líquido. Estos siguen el mismo principio que los ensayos de antagonismo convencionales en placas Petri, pero utilizan menos espacio y tiempo para ejecutarlo ya que es posible retar 96 potenciales antagonistas contra el hongo en una sola placa multicelda.

Se llevó a cabo esta metodología para monitorear el efecto antagonista de los 622 aislados seleccionados en las pruebas de medio líquido. En la figura 9 se muestran fotografías de algunos de los bioensayos realizados. Se observó el efecto inhibitorio ejercido por los diferentes aislados antagonistas sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides* comparado con el control sin antagonista.

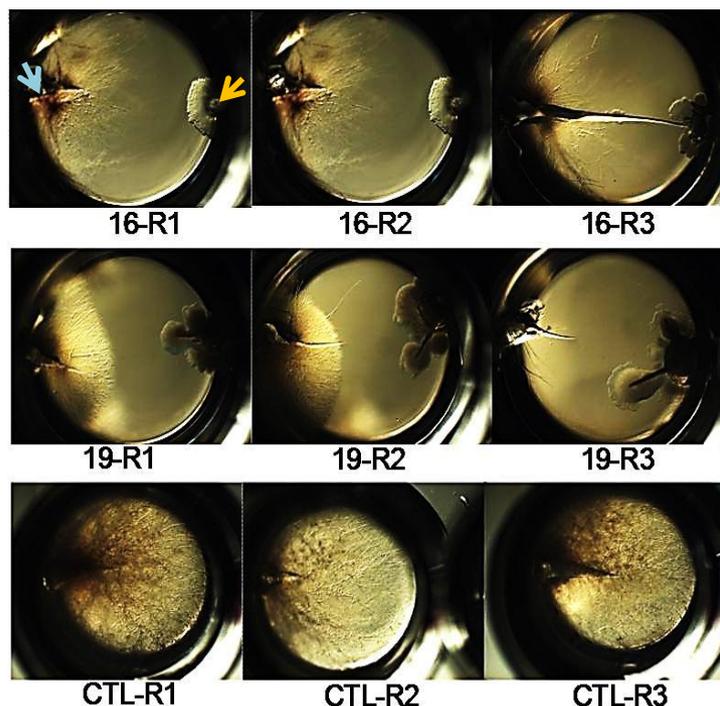


Figura 9. Microorganismos antagonistas probados en medio sólido (placa 3) que constituyen el sub-banco de los 622 antagonistas seleccionados en medio líquido. Flecha azul indica la posición del hongo; flecha amarilla indica la posición de la bacteria.

De los 622 aislados bacterianos incluidos en esta metodología 42 de ellos mostraron antagonismo contra *F. verticillioides* (Tabla 4). Se presentaron porcentajes de inhibición de 45 a 85 % en las pruebas en medio sólido (Tabla 4) y la mayoría de los organismos que presentaron antagonismo pertenecen al género *Bacillus*.

6.4 Pruebas de hemólisis en sangre humana como criterio para la selección de aislados inocuos y con potencial antagonista

A los 42 aislados antagonistas se les realizaron pruebas de hemólisis para descartar aquellas que pudieran tener algún efecto patogénico en el humano. Los resultados se muestran en la Tabla 4, seis cepas de bacterias mostraron halos alfa hemolíticos, 28 aislados fueron beta hemolíticos y ocho fueron gamma hemolíticos (Figura 10). Para subsiguientes pruebas en plántula se seleccionaron los aislados bacterianos B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, B12, B13, B22, B24, B25 y B35 que fueron alfa y gamma hemolíticas.

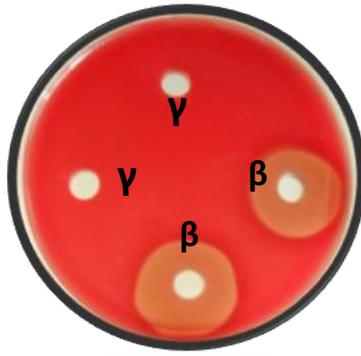


Figura 10. Prueba de hemólisis con cuatro aislados bacterianos cultivados en agar sangre, en la que dos están mostraron beta hemólisis (β) y dos gamma hemólisis (γ).

Tabla 4. Antagonistas que ejercieron una mayor inhibición de *Fusarium verticillioides* en las pruebas con medio líquido y sólido. N/D= No identificado molecularmente.

	AISLADOS IDENTIFICADOS MOLECULARMENTE	% INHIBICIÓN LIQUIDO	% INHIBICIÓN SOLIDO	HEMÓLISIS
B1	N/D	87	60	β
B2	<i>Bacillus megaterium</i> cepa HDYM-24	88	66	α
B3	<i>Pseudomonas putida</i> cepa AFB 3	84	67	α
B4	<i>Bacillus megaterium</i> cepa T11-11	89	71	γ
B5	<i>Bacillus megaterium</i> cepa E5	91	66	α
B6	<i>Bacillus subtilis</i> cepa TXc1-2	66	73	β
B7	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	74	71	α
B8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> cepa P5.3	62	85	γ
B9	<i>Bacillus cereus</i> cepa MZ-30	62	70	γ
B10	<i>Bacillus cereus</i> cepa CNE 11	83	57	β
B11	N/D	84	56	β
B12	<i>Bacillus megaterium</i> cepa Y18-01 16S	79	49	α
B13	<i>Bacillus subtilis</i> cepa GHt1-7	86	63	α
B14	<i>Bacillus cereus</i> cepa THt1-8	81	62	β
B15	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	80	63	β
B16	N/D	81	69	β
B17	N/D	82	67	β
B18	N/D	85	82	β
B19	N/D	71	72	β
B20	<i>Bacillus thuringiensis</i> aislado PGBw1	85	72	β
B21	N/D	82	64	β
B22	N/D	74	68	γ
B23	<i>Bacillus megaterium</i> cepa E5	64	63	γ
B24	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	72	73	γ
B25	<i>Bacillus cereus</i> cepa MB-9	93	52	γ
B26	<i>Bacillus sp.</i> cepa DU118(2010)	74	58	β
B27	N/D	75	47	β
B28	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	79	52	β
B29	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa Y4-36	72	63	β
B30	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	83	60	β
B31	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	75	49	β
B32	N/D	90	45	β
B33	<i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	76	60	β
B34	N/D	86	64	β
B35	N/D	76	73	γ
B36	N/D	85	70	β
B37	N/D	80	76	β
B38	N/D	81	69	β
B39	N/D	86	71	β
B40	N/D	95	69	β
B41	<i>Bacillus cereus</i>	89	77	β
B42	Clona de Bacteria no cultivable nby410f01c1	60	49	β

6.5 Pruebas de antagonismo a nivel *in planta*

6.5.1 Desinfestación de las semillas de maíz

Se alcanza en promedio un 83 % de germinación y menos del 4 % de contaminación con *Fusarium* (Figura 11).

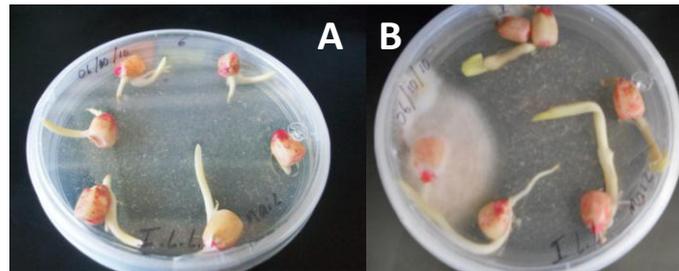


Figura 11. Semillas en germinación colocadas en medio de Komada selectivo para *Fusarium*. A) Germinación de las semillas después de recibir el tratamiento térmico con hipoclorito de sodio, B) contaminación de una semilla con *Fusarium* después de recibir el tratamiento térmico.

6.5.2 Cinéticas de crecimiento de los aislados bacterianos

En la Figura 12A, se muestra el comportamiento de los aislados 2, 4, 7, 22, 23, 24 y 35, se observa que el aislado 4 tuvo un crecimiento exponencial a las 6 h de incubación y entró a la fase estacionaria o latencia a las 20 h. El comportamiento del aislado 2, 7 y 35 son muy similares y pasan la fase estacionaria hasta las 24 h de incubación. De la misma manera que los aislados 23 y 24 siguen el mismo patrón de crecimiento. El aislado 22 mostró una etapa de acondicionamiento que duró 24 h, aquí inició su fase exponencial la cual duró solo 8 h para entrar a las 32 h a la fase de latencia. En la Figura 12B se muestran las curvas de crecimiento de los aislados 3, 5, 8, 9, 12, 13 y 25. El aislado 13 mostró un crecimiento más rápido que el resto de los aislados, iniciando con su fase exponencial a las 4 h de incubación. Los aislados 5 y 11 tienen el mismo patrón de crecimiento iniciando su fase exponencial a las 20 h como el resto de los aislados y alcanzando su fase estacionaria a las 24 h. Los aislados 3, 8, 9 y 25 tienen la fase de acondicionamiento más lenta que el resto e inician su fase

exponencial a las 20 h, pero alcanzan rápidamente la fase estacionaria igualando el crecimiento de las otras tres cepas.

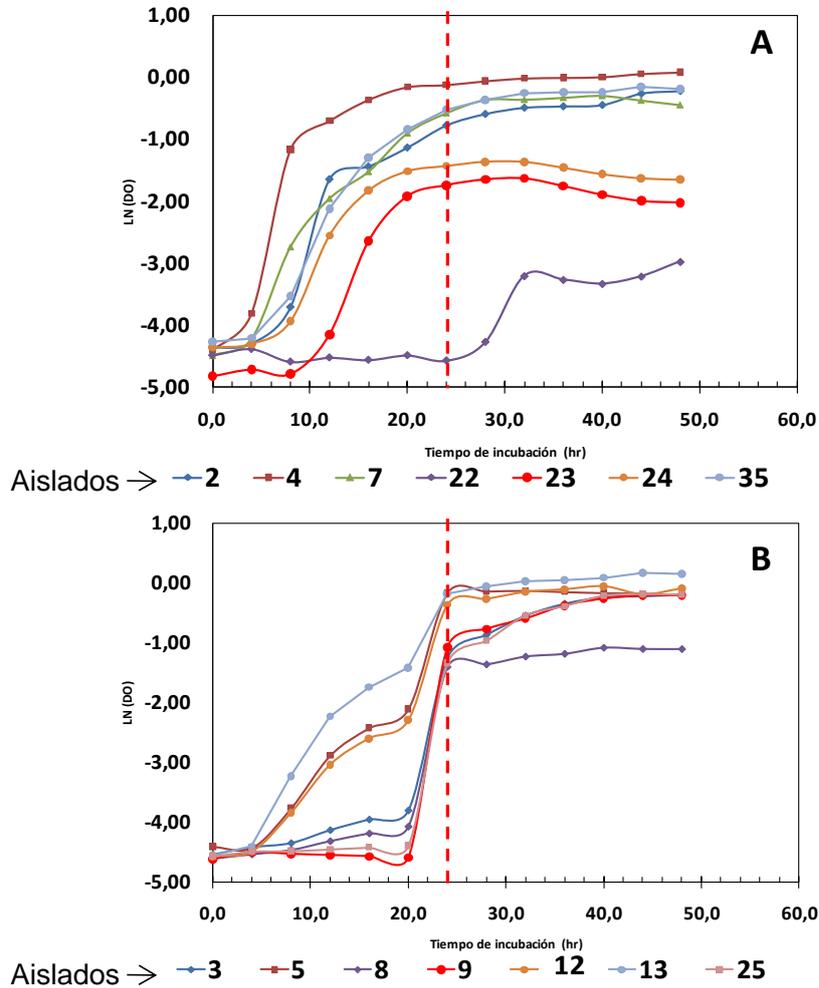


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de los 14 aislados bacterianos alfa (A) y gamma (B) hemolíticos.

Trece de los aislados seleccionados para aplicar en planta entran a la fase de latencia a las 24 h, a excepto el aislado 22 el cual la alcanza hasta las 32 h.

6.5.3 Bioensayos de bioprotección en plántulas de maíz

Las bacterias con mayor potencial antagonista en las pruebas de medio líquido y medio sólido, y que presentaron una hemólisis tipo gamma y alfa, fueron seleccionadas para las pruebas en plántula.

Los aislados probados en planta contra *F. verticillioides* no presentaron diferencia significativa en la variable volumen radical, en comparación con el control de las plantas inoculadas con *F. verticillioides*; a excepción del aislado 13 (*B. subtilis*), el cual mostró un incremento en el volumen radical de la planta. Este aislado produjo un volumen radical de 2.3 cm³ comparado con el control sin bacteria que fue de 0.9 cm³. El aislado 25 presentó también una tendencia de incremento con 1.6 cm³, pero aún así no existe una diferencia significativa con el control. Los aislados 3, 4, 5, 7, 12, 23, 24, 25, 35 aún cuando muestran un valor de volumen radical por encima del control sin bacteria (P+F= Planta + *Fusarium*), no mostraron diferencia significativa. Las bacterias que no funcionaron como bioprotectores fueron la 2, 8 y 9 presentando medias menores a la encontrada en el control con la planta sin bacteria (Figura 13).

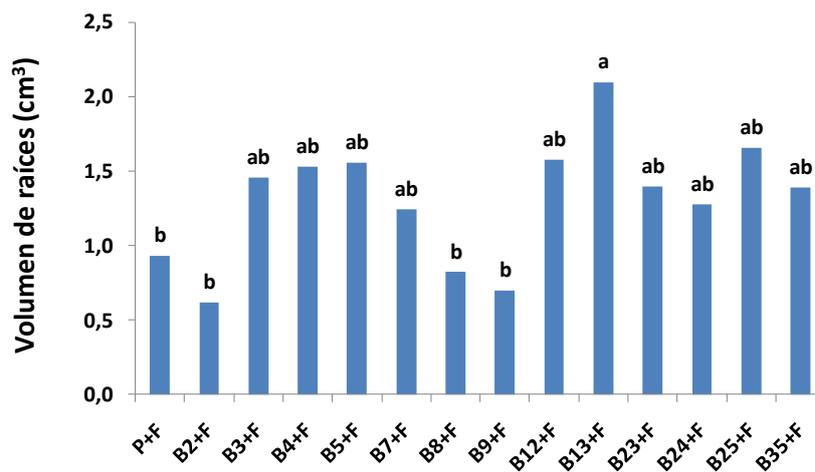


Figura 13. Grafico para volumen radical expresado en centímetros cúbicos. P+F= Planta mas el tratamiento con FV, B#+F=Aislado bacteriano mas el tratamiento con FV.

De los 14 aislados bacterianos ensayados, las cepas B5, B13 y B25 redujeron en forma significativa la severidad de la pudrición por *F. verticillioides* en plántulas de maíz ($p=0.05$) (Figura 14). Hubo diferencias significativas en estos tratamientos y aquellos representados por el testigo, mismo que consistió en plantas inoculadas por el patógeno pero sin organismo antagónico. Resaltó el hecho de que en las plantas inoculadas con la combinación del aislado B2 y *F. verticillioides*, la severidad no fue diferente estadísticamente al testigo sin antagonista. En el resto de las combinaciones patógeno-antagonista no hubo

diferencias significativas en los niveles de severidad, mismo que variaron de 65 a 85%; pero si la hubo en respecto al testigo sin protección con antagonista y la severidad fue de 45% (Figura 14).

Con respecto a la severidad de la enfermedad en la panta los aislados 5, 13, 23, 24 y 25 registraron severidades menores al control con porcentajes de 47, 62, 69, 69 y 53% (Figura 14). Los aislados 3, 4, 7, 12, y 35 presentaron porcentajes de 78 a 71%. Los aislados 2, 8, 9 y 35 fueron los que mostraron un menor efecto de bioprotección sobre la planta, desde el 100 hasta 80%. Sólo los aislados 5, 13 y 25 fueron los únicos que mostraron diferencias significativas con respecto al control de la planta tratado con *Fusarium*.

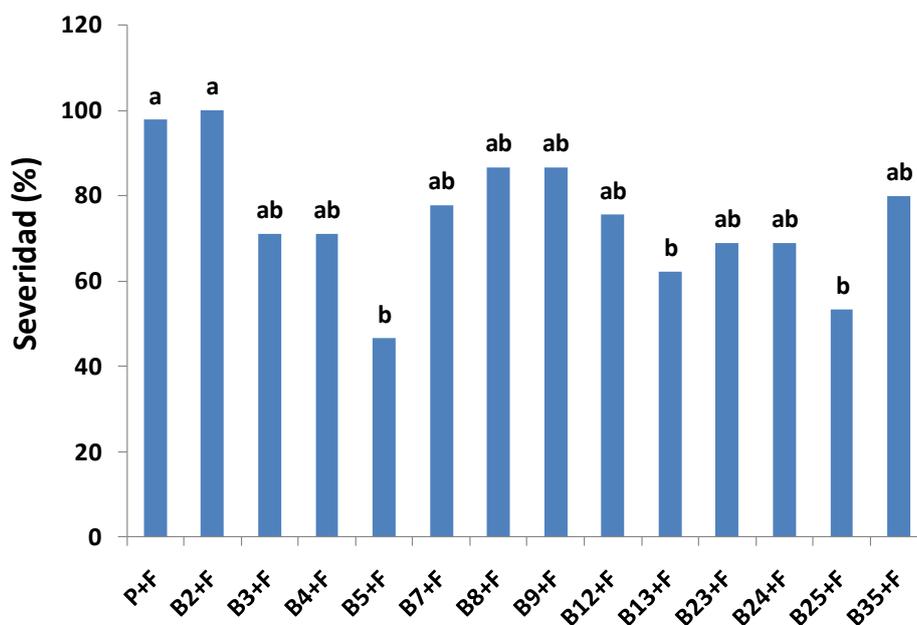


Figura 14. Severidad en por ciento de los tratamientos. P+F= Planta mas el tratamiento con FV, B#+F=Aislado bacteriano en combinación con FV.

En la figura 15 se observa el efecto que ejercen las bacterias antagonicas sobre las plántulas de maíz. El volumen de raíz en las plantas testigo fue de 3.2 cm³. No hubo diferencias significativas ($p=0.05$) de dicho volumen con respecto al que presentaron las plantas cuyo sustratos contenían los aislados, B3, B12, B13, B24 Y B25 donde los volúmenes variaron de 2.3 a 2.9 cm³. En el resto de los

tratamientos mientras el volumen varió de 2.3 a 1.2 cm³ con diferencias entre ellos, contrastando el aislado B8, el cual cuso una disminución significativa del volumen de raíz en las plantas.

Los aislados *P. putida* (B3), *B. megaterium* (B12), *B. subtilis* (B13), *B. cereus* (B24) y *B. cereus* (B25) no tienen diferencia significativa con el control donde se colocó agua sin bacteria. Estos aislados fueron los que indujeron más volumen radical sobre la planta. En contraste con los aislados *B. megaterium* (B4), *B. megaterium* (B5), *B. megaterium* (B7), *P. polymyxa* (B8), *Bacillus megaterium* (B23) y el aislado 35 que aún no ha sido identificado molecularmente; no mostraron un efecto de incremento en el volumen radical, mostrando diferencia significativa con el control con agua. En especial el aislado *P. polymyxa* (8) fue el que tuvo un efecto negativo sobre la planta y se percibe por el decremento en el volumen radical presentado.

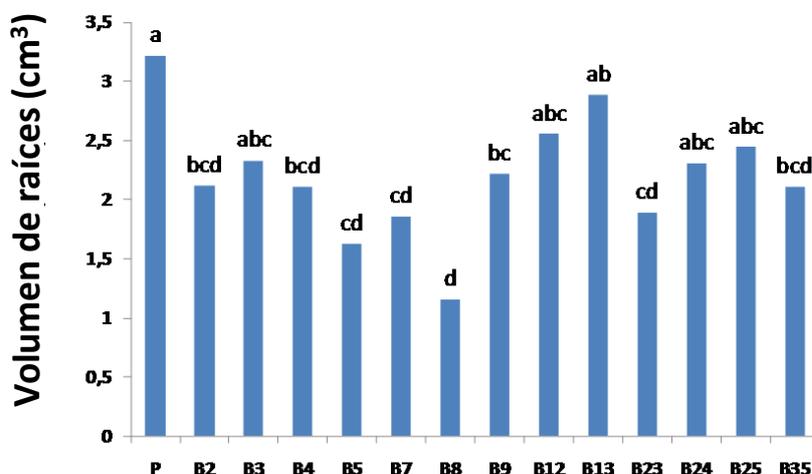


Figura 15. Volumen radical expresado en centímetros cúbicos, efecto de los aislados sobre las plantas. . P= Planta control con agua, B#=Bacteria antagonica más el numero del aislado.

6.6 Mecanismos de interacción con la planta y de actividad antagonica contra patógenos de los aislados antagonistas

Los aislados más eficaces en las pruebas de escrutinio realizadas anteriormente se analizaron para determinar el posible mecanismo de interacción del aislado con la planta y el mecanismo de antagonismo contra *F. verticillioides*. En este

estudio se realizaron tres pruebas: solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas (ácido indolacético) y actividad de quitinasa.

En la Tabla 5 se muestra los catorce aislados probados en planta, los aislados *B. megaterium* (4, 5, 12, 23), *B. subtilis* (13) y *Paenibacillus polymyxa* (8), tienen la capacidad para solubilizar fosfato. El aislado 8 de *P. polymyxa* es capaz de producir ácido indolacético y con el potencial para promover crecimiento vegetal (BPCV). Un aislado de *B. subtilis* (B13), uno de *B. megaterium* (B23) y dos de *B. cereus* (B24 y B25) poseen además actividad de quitinasa.

Tabla 5. Aislados bacterianos con sus porcentajes de inhibición, tipo de hemólisis y su posible mecanismo antagonista y promotor de crecimiento .

AISLADOS IDENTIFICADOS MOLECULARMENTE	% INHIBICIÓN LIQUIDO	% INHIBICIÓN SOLIDO	HEMÓLISIS	PO4	AUXINAS	QUITINASAS
B7 <i>Bacillus megaterium</i> cepa DSM319	74	71	α			
B3 <i>Pseudomonas putida</i> cepa AFB 3	84	67	α			
B2 <i>Bacillus megaterium</i> cepa HDYM-24	88	66	α			
B5 <i>Bacillus megaterium</i> cepa E5	91	66	α	+		
B13 <i>Bacillus subtilis</i> cepa GHT1-7	86	63	α	+		+
B12 <i>Bacillus megaterium</i> cepa Y18-01	79	49	α	+		
B8 <i>Paenibacillus polymyxa</i> cepa P5.3	62	85	γ	+	+	
B24 <i>Bacillus cereus</i> cepa BAC-B2	72	73	γ			+
B35 N/D	76	73	γ			
B4 <i>Bacillus megaterium</i> cepa T11-11	89	71	γ	+		
B9 <i>Bacillus cereus</i> cepa MZ-30	62	70	γ			
B22 N/D	74	68	γ			
B23 <i>Bacillus megaterium</i> cepa E5	64	63	γ	+		+
B25 <i>Bacillus cereus</i> cepa MB-9	93	52	γ			+

6.6.1 Solubilización de fosfatos

Los catorce mejores aislados seleccionados con las pruebas anteriores, fueron analizados para conocer la capacidad de solubilizar fosfatos, para lo cual las bacterias se cultivaron en un medio de cultivo con fosfato insoluble.

EL medio de cultivo Pikovskaya agar los aislados B4, B5, B8, B12, B13 y B23 mostraron un halo claro lo cual indica que tienen la capacidad de solubilización de fosfato (Figura 16, Tabla 5). El aislado 35, no presentó halo alrededor de las colonias por lo que no se considera como un solubilizador de fosfato tricálcico insoluble.

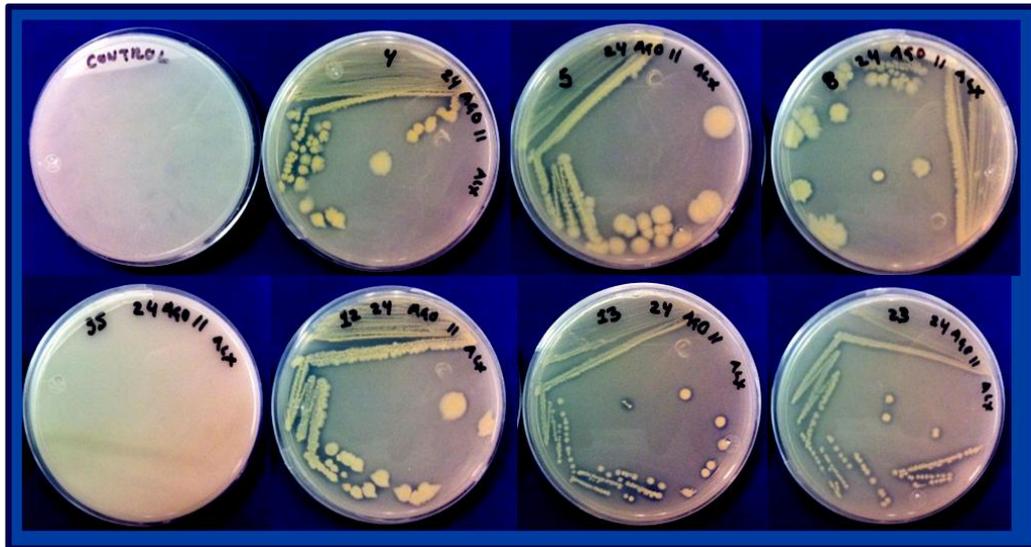


Figura 16. Aislados que mostraron capacidad de solubilizar fosfato *in vitro*. Se muestran halos claros alrededor de las colonias de seis de los aislados en el medio para fosfatos. Se muestra un control del medio sin aislado y el aislado 35 que no tiene capacidad de solubilización del fosfato.

6.6.2 Producción de auxinas

El aislado B8 fue el único, de los 14 aislados seleccionados, que tiene la capacidad de producir ácido indolacético, de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de Salkowsky (Tabla 5).

6.6.3 Producción de quitinasas

Los únicos aislados que produjeron quitinasas fueron *B. subtilis* (B13), *B. megaterium* (B23), *B. cereus* (B24) y *B. megaterium* (B25). En la Figura 17 se observa la formación de un halo claro alrededor de las colonias, a excepción del aislado 2 (placa Petri superior izquierda Figura 17), donde no se observa que

haya formación de halo. El halo se debe a que los aislados son capaces de producir de degradar la quitina coloidal agregada al medio de cultivo.

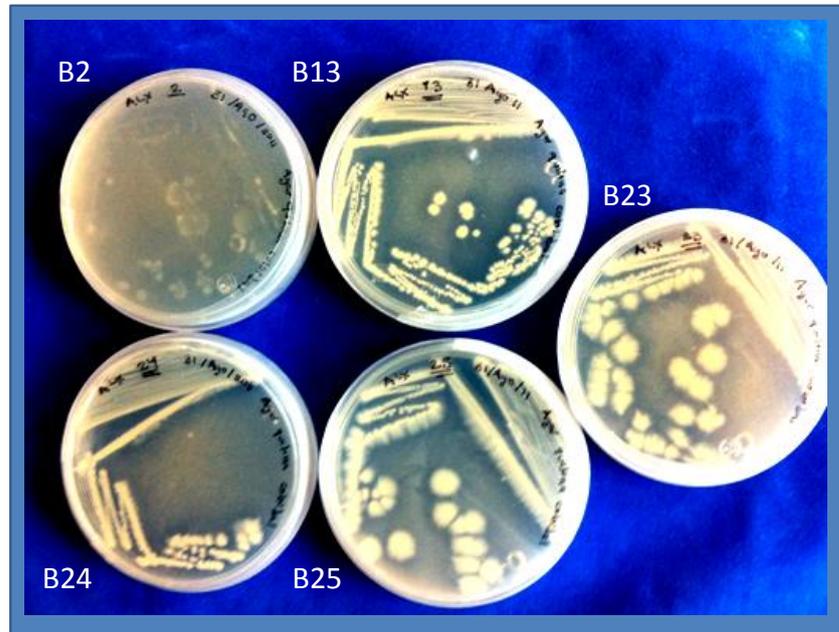


Figura 17. Aislados con capacidad de producir quitinasas en Agar quitina coloidal.

6.7 Pruebas de compatibilidad entre los aislados bacterianos

En la Figura 18 se observa que algunos aislados no se desarrollan cuando crecen en presencia de otro en la misma placa Petri. Por otra parte algunos aislados son capaces de desarrollarse cuando están creciendo junto a otro. En este caso, el aislado B4 que puede desarrollarse o ser compatible en su crecimiento con el B8, B9 y B23. A su vez también el aislado B22 es compatible con el B9, mientras que B24 es compatible con el B9, B22 y B23.

	B4	B8	B9	B22	B23	B24	B25	B35
B4	■	▨	▨	□	▨	□	□	□
B8	▨	■	□	□	□	□	□	□
B9	▨	□	■	▨	□	▨	□	□
B22	□	□	▨	■	□	▨	□	□
B23	▨	□	□	□	■	▨	□	□
B24	□	□	▨	▨	▨	■	□	□
B25	□	□	□	□	□	□	■	□
B35	□	□	□	□	□	□	□	■

 Compatibles
 No compatibles

Figura 18. Compatibilidad de crecimiento entre aislados bacterianos antagónicos con características gamma hemolíticas

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Identificación de los aislados patogénicos de *Fusarium*

Los tres aislados patogénicos de *Fusarium* fueron analizados molecularmente para identificarlos a nivel de la especie, ya que la identificación tradicional mediante claves taxonómicas es complicado, debido a que existen otras especies como *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, pertenecientes al complejo de especies *G. fujikuroi*, las cuales son muy semejantes morfológicamente a *F. verticillioides*, varían solo en la formación de cadenas de microconidios y polifialides (Nirenberg y O'Donnell 1998).

F. verticillioides y *F. proliferatum* son muy similares a nivel morfológico y frecuentemente infectan a maíz simultáneamente. Los análisis de PCR con los primer ITS es suficiente para identificar molecularmente a *F. verticillioides*, ya que la variación que existe dentro de la secuencia ITS, es suficiente para discriminar entre estas dos especies (Visentin, 2009). Los aislados patogénicos utilizados en esta ocasión presentaron una identidad con *Gibberella moniliformis* de 99 y 100%, confirmando que pertenecen al grupo filogenético de *F. verticillioides*.

7.2 Monitoreo masivo de microorganismos en medio líquido

El desarrollo de técnicas para la búsqueda de antagonistas que ejerzan un efecto inhibitorio contra patógenos de plantas se ha enfocado al control de enfermedades en cultivos de interés como es el maíz (Cavaglieri, 2004; 2005; Chang, 2009). Dentro de las enfermedades en este cultivo se encuentran: la pudrición de la mazorca, tallo y raíces (Kedera 1992; Munkvold *et al.*, 1997b). El presente estudio se llevó a cabo a partir de un banco de germoplasma de microorganismos nativos del valle de Guasave, Sinaloa. Ante las complicaciones que presenta hacer estudios de antagonismo en grandes cantidades de microorganismos, se desarrolló una novedosa estrategia de monitoreo en medio de cultivo líquido. Esta técnica permitió realizar un bioensayo de antagonismo con un gran número de especímenes

utilizando poco espacio y una gran eficiencia, permitiendo analizar lotes de 384 aislados cada dos días (4 placas de 96 pozos).

Para evaluar el efecto inhibitorio sobre el tejido fúngico, este se cuantificó de manera relativa utilizando una aglutinina de germen de trigo acoplada a un fluoróforo (WGA-488: Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 488®), el cual se une específicamente a la pared del hongo. Esto permite la detección de fluorescencia relativa como un parámetro para cuantificar biomasa fúngica relativa a un control sin aislado bacteriano. Por lo tanto, al realizar los ensayos de antagonismo en medio líquido se puede observar un efecto inhibitorio del desarrollo fúngico debido a la acción de algún(os) mecanismo(s) que tenga el aislado bacteriano para evitar la proliferación del mismo (Figura 6A). En el caso contrario, se observará un crecimiento del hongo sin que haya algún efecto antagonista (Figura 6B).

Los microorganismos antagonistas secretan en el medio diversos compuestos que actúan sobre los hongos fitopatógenos, en los que afectan germinación de las esporas y/o la elongación y crecimiento de las hifas. Estos efectos se deben a la acción de enzimas quitinasas y antibióticos como la zwittermicina A y la kanozamina, sustancias características del género *Bacillus* (Chang 2009; He *et al.*, 2004). En los ensayos en medio líquido se colocan en contacto directo la posible bacteria antagonista y al hongo, lo que permite observar el efecto de diferentes mecanismos que emplee el antagonista, cuando interacciona directamente con el hongo. Estos mecanismos pueden ser: a) La competencia por nutrientes, puesto que los hongos patógenos requieren de nutrientes exógenos, como carbono y hierro para germinar, penetrar e infectar el tejido (Michel, 2006); b) El efecto de la producción de antibióticos (He *et al.*, 1994, Thomashow y Weller 1988) c) La inhibición de la germinación de esporas por diferentes compuestos (Rosales y Mew, 1997); d) o la degradación directa de las paredes del hongo por la actividad quitinolítica de las enzimas producidas por estas bacterias (Chernin *et al.* 1995).

Los géneros más frecuentes identificados como posibles antagonistas a *F. verticillioides* con el bioensayo en medio líquido (Anexo 1) fueron los siguientes:

a) *Acinetobacter* es un género de bacterias capaces de producir compuestos anti fúngicos como las quitinasas y las β , 1-3 glucanasas. Se ha reportado que especies de éste género pueden inhibir y disminuir las enfermedades en plantas, causadas por hongos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium graminearum* (Maryline, et al 2007). *Acinetobacter lwoffii* puede inhibir el desarrollo de *Botrytis cinerea* así como también reducir la enfermedad en vid (*Vitis vinifera*) en un rango de 67-78 % (Maryline, et al. 2007). En el presente estudio se encontró que *A. calcoaceticus*, *A. rhizosphaerae* y *A. lwoffii* inhibieron a *F. verticillioides* en 89, 81 y 92 %, respectivamente (Anexo 1). Esta inhibición puede deberse a la liberación de metabolitos como quitinasas y sideróforos (Gopalakrishnan et al., 2011).

b) *Anaerobranca* es un género que aún no se encuentra bien descrito en cuanto a su capacidad antagónica contra patógenos de plantas. La especie *A. californiensis* mostró un porcentaje de inhibición de 87 % en ensayos en cultivo líquido en este estudio (Anexo 1). No existen reportes en la literatura de ensayos de antagonismo utilizando esta bacteria en contra de algún agente fitopatógeno. La especie *A. californiensis* se describe como una bacteria que puede desarrollarse en condiciones de alcalinidad, temperaturas extremas y puede comportarse como un anaerobio fermentativo. Algunos autores reportan sus características morfológicas y descriptivas para diferenciarla de otras especies, pero no existen reportes acerca de algún efecto antagónico (Gorlenko et al., 2004).

c) *Arthrobacter globiformis*, al igual que en otros trabajos mostró un alto porcentaje de inhibición en líquido entre 74 y 92 % contra *F. verticillioides* (Anexo 1). Esta bacteria puede ser encontrada en sitios cercanos a las raíces. Bacterias de este género pueden inhibir y desplazar a numerosos patógenos (Lambert et al. 1987). Esta especie demostró ser un candidato potencial para utilizar, como una opción en

el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos debido a los altos porcentajes reportados en este estudio y en otros trabajos (Cavaglieri, 2005).

d) El género *Bacillus* fue el que más microorganismos tuvo dentro de los 622 que mostraron antagonismo. Este género ha sido muy estudiado debido a que presentan una amplia gama de mecanismos para inhibir el crecimiento de patógenos (Weller, 1988). *Bacillus* spp pueden producir quitinasas capaces de degradar la pared celular del hongo patógeno (Shali, *et al.* 2010, Bottone y Peluso 2003; Munimbazi y Bullerman 1998). En este estudio las especies más abundantes fueron *B. arbutinivorans*, *B. aryabhattai*, *B. badius*, *B. cereus*, *B. flexus*, *B. fusiformis*, *B. licheniformis*, *B. marisflavi*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. En las pruebas en medio líquido, estas especies inhibieron el crecimiento del patógeno de 53 a 99%, efectos que posiblemente se deben al menos en parte, a la rápida difusión del compuesto anti fúngico secretado por las bacterias en el medio (Anexo 1). En una prueba comparativa entre medio de cultivo líquido y medio sólido, se demostró que en el primero hay una difusión más rápida del metabolito bacteriano. Se sabe que existen una amplia gama de compuestos, que pueden ser utilizados por estos organismos, para detener el crecimiento de los patógenos (Chang *et al.*, 2009).

e) El género *Enterobacter* fue el segundo en abundancia dentro de los 622 organismos estudiados (Tabla 3). Este género se encuentra ampliamente distribuido y ha demostrado ser un agente potencial para el biocontrol de *Fusarium* (Sneh *et al.* 1984). El biocontrol de *F. moniliforme* es importante debido a los daños que este causa en maíz, y puede ser un endófito asintomático y producir varias toxinas que contaminen el maíz (Hinton y Bacon, 1995). Existen evidencias acerca de la actividad antagónica que pueden ejercer especies de *Enterobacter*, como *E. cloacae*, entre las que destaca inhibir la germinación de los esporangios del hongo *Pythium ultimum* (Van Dijk, 1998); también ejerce un efecto antagónico contra *Macrophomina phaseolina* (Gopalakrishnan, 2011). Esta inhibición puede ser atribuida a diferentes mecanismos de defensa como la producción de sideróforos, o compuestos anti

fúngicos; también puede producir compuestos solubilizadores de fosfatos, o bien auxinas que promueven crecimiento radical. En el presente estudio en medio líquido *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei* y *E. ludwigii* mostraron un efecto inhibitorio contra *F. verticillioides* de 64-93 % del crecimiento radial de la colonia del hongo (Anexo 1). Como se mencionó anteriormente, posiblemente la bacteria secreta algún metabolito anti fúngico y de esta manera podría alterar el desarrollo del patógeno en el medio líquido.

f) Entre los organismos antagonicos a *F. verticillioides*, también se encontraron dos aislados pertenecientes al género *Klebsiella*, específicamente *K. pneumoniae*, de acuerdo con los análisis moleculares realizados por Cordero-Ramírez (Tesis de doctorado en preparación). Estas dos especies mostraron antagonismo de 82 y 89 % contra *F. verticillioides*, lo cual puede deberse a la producción de poligalacturonasas que actúan sobre la pectina; esta última es un constituyente importante de la pared celular de algunas bacterias, hongo y levaduras (Anexo 1) (Chatterjee *et al.* 1978). Se ha demostrado que estas especies pueden solubilizar fosfatos y actuar como bacteria no simbiótica fijadora de nitrógeno (Lynch, 1990).

g) El género *Lysinibacillus* estuvo representado por 13 aislados dentro del grupo de los 622 mejores antagonistas en las pruebas de medio líquido, y los porcentajes de inhibición que exhibieron fueron de 62 a 82 % (Anexo 1). La especie más representativa fue *L. fusiformis*, misma que puede producir metabolitos secundarios como ácido indolacético, ácido salicílico, y sideróforos; también tiene la capacidad de producir compuestos solubilizadores de fosfatos y fijación de nitrógeno. Otra capacidad que tiene es la de producir quitinasas, las cuales son capaces de degradar la quitina de la pared celular de los hongos (Trivedi, 2011).

h) El género *Peanibacillus* fue recientemente incorporado en la taxonomía de los Firmicutes para agrupar a los *Bacillus* del grupo 3 (Ash 1993). Este género en especial *P. polymyxa* puede fijar nitrógeno (Heulin *et al.* 1994), solubilizar fosfatos (Singh, 1993); producir antibióticos (Rosado, 1993), quitinasas (Mavingui y Hulin

1994) y enzimas hidrolíticas (Nielsen y Sorensen, 1997). Estas dos últimas características, les confieren la capacidad de controlar a *F. verticillioides*; si bien existen otros tipos de compuestos como las fusaricidinas, las cuales tiene actividad anti fúngica sobre patógenos de plantas, tales como *F. oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae* y *Penicillium thomii* (Kajimura y Kaneda, 1996 y 1997). Los porcentajes de inhibición de *P. polymyxa* contra *F. verticillioides* variaron de 62 a 83 % en los ensayos en medio de cultivo líquido (Anexo 1).

i) Los organismos del género *Pantoea* poseen atributos potenciales para el biocontrol (Babalola, 2010). Maisura y colaboradores (2008) demostraron que *P. dispersa* reduce significativamente la infección causada por *F. udum* en *Cytisus cajan* *in vitro*, invernadero y campo. *P. dispersa* mostró ser una bacteria micolítica con potencial para emplearse como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos. En este estudio, tres aislados de *P. dispersa* mostraron inhibición de 78 a 83 % contra *F. verticillioides* (Anexo 1). En este estudio se demostró que esta especie puede producir compuestos anti fúngicos por lo que puede utilizarse para el control de *F. verticillioides*. Las especies de este género pueden ejercer efecto sobre patógenos, mediante diversos mecanismos tales como antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, resistencia inducida, competencia por nutrientes y por espacio. No siempre cuando hay un efecto antagonista participa un solo mecanismo de acción responsable del biocontrol, sino que por lo regular, están implicados más de uno (Janisiewicz y Korsten, 2002).

j) Las especies del género *Pseudomonas* se han estudiado ampliamente y se conoce que pueden sintetizar enzimas líticas, antibióticos, solubilizar fosfatos, producir ácido cianhídrico, ácido salicílico y sideróforos (Nagarajkumar, *et al.* 2004). Las especies de *Pseudomonas* estudiadas en este trabajo mostraron inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* de 60 a 93 % (Anexo 1). Los mecanismos de antagonismo posiblemente implicados son la producción de enzimas líticas como la β -1-3 glucanasa, la cual puede inhibir el crecimiento de diversos hongos

fitopatógenos como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Pythium ultimum* (Gorlach-lira y Stefaniak, 2009; Meena *et al.* 2001).

7.3 Monitoreo masivo en medio sólido

En los bioensayos de antagonismo en placas Petri (Figura 4), se enfrentan durante un período aproximado de siete días, y se mide el halo de inhibición (Hernández-Rodríguez, 2008), Esta técnica es muy empleada por que el efecto del microorganismo es muy visible. En base a este conocimiento se montó un ensayo en medio sólido para confirmar el efecto antagonista de los 622 aislados previamente seleccionados en el ensayo líquido, pero empleando placas en formato de 96 pozos. En nuestro bioensayo, el empleo de placas en formato de 96 pozos nos permitió el análisis de los 622 aislados previamente seleccionados en medio líquido; pero en este caso de forma rápida, masiva y eficiente. Para este análisis, las placas en formato de 96 pozos, donde cada pozo tiene un diámetro aproximado de 8 mm, nos confieren dos ventajas principales: a) disminución del tiempo de duración del experimento y b) disminución del espacio necesario para realizar los 96 bioensayos de antagonismo de manera simultánea. El tiempo de duración del experimento se redujo a solo 48 h comparado con los ensayos en placas Petri donde el hongo tarda en cubrir toda la placa en un tiempo aproximado de 7 días.

En la Figura 9, se observa que los aislados inhibieron el crecimiento del hongo, como resultado de la secreción de compuestos antifúngicos por las células bacterianas, mismos que son responsables de la zona de inhibición (Shali *et al.*, 2010). De las pruebas realizadas en medio sólido con los 622 aislados se seleccionaron los 42 que demostraron inhibición del crecimiento del hongo en líquido como en sólido (Tabla 3).

En otros estudios, se ha demostrado que el uso de microorganismos aislados de raíces y suelo de algún cultivo específico se encuentra mejor adaptado a las condiciones del mismo y puede ser utilizado de mejor manera como agente de control (Cavaglieri, 2004; Kerry, 2000). Por lo anterior se han desarrollado técnicas

para búsqueda de microorganismos como agentes de biocontrol. Como se muestra en la Tabla 3, los diferentes aislados que se seleccionaron tienen niveles de inhibición del 62 al 95 % en medio líquido y mientras que en medio sólido fueron 45-85%. Se encontraron 14 aislados pertenecientes al género *Bacillus* con potencial actividad antagonista, mismas que se pueden expresar mediante la estimulación de diferentes mecanismos de defensa contra el patógeno (Janisiewicz y Korsten, 2002). *Bacillus* spp puede producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Cavaglieri *et al.*, 2004), observándose una reducción en el desarrollo micelial de *F. verticillioides* como se muestra en la Figura 9. La reducción de la producción de biomasa fúngica obtenida en este trabajo, coincide con el estudio de Cavaglieri *et al.*, (2005) donde probaron 10 cepas de *Bacillus* con efecto antagónico contra *F. verticillioides* causado por antibiosis con porcentajes de inhibición de 28 a 78 %.

Los 42 microorganismos (Tabla 4) seleccionados en su mayoría pertenecen al género *Bacillus*; once de estos se identificaron como *Bacillus cereus*, seis *Bacillus megaterium* y dos *Bacillus thuringiensis*. Los porcentajes de inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* por estas tres especies de *Bacillus* fueron del 62 al 77 % en pruebas sobre placas de papa-dextrosa-agar. Los efectos de inhibición observados en este estudio y trabajos previos, señalan la acción de complejos de enzimas y compuestos químicos secretados por las bacterias. Chang y colaboradores (2009) evidencian que *B. cereus* exuda proteasas antifúngicas. En estudios más recientes se ha demostrado que *B. pumilus* produce quitinasas al realizar ensayos *in vitro* contra patógenos de trigo, como lo es *F. graminearum*, donde se reporta una inhibición fuerte al exponer el hongo a la actividad enzimática en medios de cultivo duales contra *F. graminearum* (Shali *et al.*, 2010). Existen varios reportes acerca de la actividad de biocontrol, de especies de *Bacillus* contra hongos fitopatógenos (Arias *et al.*, 1999; Wen, 2009). La selección de microorganismos antagonistas se ha utilizado para hacer del control biológico una alternativa práctica en el control de fitopatógenos (Shali *et al.*, 2010).

En medio de cultivo sólido, también se encontró un aislado de *Paenibacillus polymyxa* con porcentajes de inhibición a *F. verticillioides* de 85 %. Esta especie puede ser usada como promotora de crecimiento de plantas debido a la producción de diferentes hormonas como citoquininas, auxinas, etileno, giberelinas; además es capaz de fijar nitrógeno posee actividad antagónica contra patógenos de plantas, como *F. oxysporum*, *Phytophthora palmivora* y *P. aphanidermatum* (Lal, 2009).

Un aislado de *Pseudomonas putida* presentó un porcentaje de inhibición de 67 % contra el patógeno *F. verticillioides* en este estudio. Los 18 microorganismos del grupo de los 42 antagonistas (Tabla 4) aún no han sido identificados molecularmente. Estos microorganismos sin identificar fueron capaces de inhibir el crecimiento en sólido de *F. verticillioides* del 45 al 82 %.

7.4 Pruebas de hemólisis de los aislados bacterianos seleccionados por su potencial antagónico.

Los 42 microorganismos seleccionados en este ensayo (Tabla 4) fueron evaluados para la producción de hemolisinas con el fin de descartar aquellas cepas con posible patogenicidad al humano. Esto es debido a que los microorganismos serán utilizados para controlar una enfermedad en un cultivo de importancia alimenticia como el maíz.

Con esta prueba se seleccionaron aquellos microorganismos que mostraron gamma y alfa hemólisis (Tabla 5). La alfa hemólisis produce una degradación parcial de los eritrocitos de la sangre, mientras que en la gamma hemólisis no causa lisis en los eritrocitos. Se descartaron aquellos que fueron beta hemolíticos donde se observa un lisado total sobre los glóbulos rojos de la sangre. Así que los microorganismos gamma y alfa fueron los que se aplicaron en las pruebas en planta.

7.5 Pruebas en planta

En otros estudios se ha probado la efectividad de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, para controlar patógenos de plantas (Cavaglieri, 2004; Cabaglieri, 2005; Bashan y Bashan, 2002). El presente estudio reveló, que 14 aislados nativos obtenidos de la rizosfera de cultivos de maíz, fueron capaces de inhibir el crecimiento de *F. verticillioides* *in vitro*. En este trabajo, solo tres de estas cepas redujeron la pudrición de tallos en pruebas *in planta*.

La especie *B. megaterium* (B5) demostró ser un potencial agente de biocontrol, de acuerdo a las pruebas realizadas en este estudio. Esta especie redujo significativamente la enfermedad en 53 % con respecto al control. Se tiene el antecedente de que *B. megaterium* también ha demostrado que puede disminuir la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* (Omar *et al.*, 2006).

Bacillus subtilis (B13) fue la única especie que indujo mayor volumen de raíces en plantas inoculadas con *F. verticillioides*. También redujo la enfermedad 38 % con respecto al control (Figura 13 y 14). Se ha demostrado que esta especie puede incrementar el crecimiento de raíces, de la parte aérea y aumentar la germinación de plantas de maíz; también se demostró que tiene característica de ser endofítico. Las propiedades antes mencionadas ayudan a explicar el incremento en el crecimiento y la protección de las plántulas expuestas al suelo infestado con *F. verticillioides* (Bacon, *et al.*, 2001).

Cavaglieri *et al.* (2005) demostraron que *B. subtilis* puede contribuir a prevenir la transmisión vertical de *F. verticillioides* en maíz. Esta especie no sólo puede ser efectiva contra *Fusarium* en maíz, sino que también puede reducir la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* en tomate (Omar *et al.*, 2006), además de ejercer un efecto antagónico contra *M. phaseolina* (Singh *et al.*, 2008).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento está en auge y entre los patógenos que se tratan de contrarrestar está *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, el cual es un factor limitante para la producción de plátano a nivel mundial (Lin *et al.*, 2009).

Compostas enriquecidas con *B. subtilis* redujeron significativamente al mal de Panamá en banano (Zhang *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, las plantas de maíz tratadas con *B. cereus* (B25) presentaron indujo mayor volumen radical, pero sin tener diferencia significativa con el control (Figura 13). Sin embargo este aislado redujo significativamente la pudrición de tallos en 47% (Figura 14). Los resultados anteriores coinciden con un estudio que también demostró, que especies del género *Bacillus* tienen efecto antagónico sobre varios patógenos de plantas (Yu *et al.*, 2002). Muchas especies de *Bacillus* contribuyen a la salud de las plantas de diferentes maneras, lo que ha influido en que se propongan como agentes de biocontrol (Choudhary y Johri, 2009).

Muchos microorganismos secretan uno o más metabolitos secundarios con actividad antibiótica sobre patógenos de plantas (Thomashow *et al.*, 2002). Se han reconocido a varias especies de *Bacillus* capaces de producir antibióticos y otro tipo de compuestos anti fúngicos como lo son las enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, *B. cereus* puede producir antibióticos tales como la zwittermicina (Silo-Suh *et al.*, 1994) y la kanosamina (Milner *et al.*, 1996). La característica de *Bacillus* spp para producir múltiples metabolitos secundarios, posiblemente ayuda a la planta a alejar a los microorganismos que puedan competir por nutrientes, ó aquellos con potencial fitopatógeno (Choudhary y Johri, 2009).

7.6 Mecanismos de interacción de los aislados seleccionados con las plantas de maíz.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal pueden ser encontradas en la rizosfera, en la superficie de las raíces y en asociación con éstas; pueden ser capaces de promover el crecimiento y la nutrición de las plantas de manera directa o indirecta (Ahamad *et al.*, 2008). Muchos mecanismos están implicados en promover el crecimiento de las plantas como se mencionó anteriormente.

7.6.1 Solubilización de fosfatos

Los aislados potencialmente antagónicos hacia *F. verticillioides* y que además fueron capaces de solubilizar fosfato, fueron *B. megaterium* (B5, B12, B4 y B23), *B. subtilis* (B13) y *P. polymyxa* (B8). Se ha reportado que en general, las especies del género *Bacillus* pueden producir ácidos orgánicos o fosfatasas y hacer el fosfato disponible para las plantas (Richardson *et al.*, 2009).

Está reportado que la especie *B. megaterium* puede solubilizar cantidades de fosfato desde 72 a 270 mg/L (Chen *et al.*, 2006). Cuatro de los cinco aislados de *B. megaterium* seleccionados entre los mejores aislados antagonistas a *F. verticillioides* también son solubilizadores de fosfato. Éstos aislados (B4, B5, B12 y B23; Tabla 4), posiblemente estén empleando ácidos orgánicos o enzimas fosfatasas para hacer biodisponible el fosfato tricálcico del medio de cultivo (Goldstein, 1995). Los resultados anteriores sugieren que estas bacterias le proporcionan fosfato disponible a la planta como un beneficio de su interacción en la rizosfera, además de ser potenciales antagonistas a *F. verticillioides*.

7.6.2 Producción de auxinas

De los aislados bacterianos en este estudio, *Paenibacillus polymyxa* (B8) fue el único que produjo ácido indolacético en las pruebas de laboratorio (Tabla 4). Se ha reportado que ésta especie tiene capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante diferentes compuestos como auxinas, citoquininas y etileno; así también puede proteger a la planta de microorganismos patógenos (Lal, 2009).

Es de particular importancia que un organismo con capacidad antagónica a un fitopatógeno, también pueda ser capaz de promover el crecimiento vegetal, mediante un aumento del volumen radical, atribuido a la síntesis de auxinas. La aptitud de *P. polymyxa* para producir auxinas, lo convierte en un aislado interesante, a considerar en estudios posteriores. Sin embargo, al inocular a esta bacteria en plantas de maíz

crecidas en arena, disminuyó significativamente el volumen radical. En estudios previos en el grupo de trabajo se detectó que *P. polymyxa* solo produjo auxinas cuando al medio donde se desarrollo se adicionó con triptófano (un precursor bioquímico en la vía de síntesis de las auxinas). Lo anterior sugiere que probablemente en las condiciones en que se realizo el bioensayo la producción de auxinas de esta bacteria no se presenta. Por lo anterior la capacidad de producir auxinas por la bacteria en estudio, deberá de confirmarse en maceta con suelo no estéril; esto último para analizar el posible efecto de la microbiota acompañante en la disponibilidad de triptófano y así poder activar su actividad auxínica.

7.7. Posibles mecanismos de antagonismo

7.7.1. Producción de quitinasas

Hay estudios que demuestran que *B. cereus* tiene actividad antifúngica debido a la producción de un complejo de enzimas hidrolíticas principalmente quitinasas, quitosanasas y proteasas. El efecto principal que tienen los compuestos antifúngicos sobre los hongos patógenos es la inhibición de la germinación de las esporas y la elongación de las hifas (Chang, 2009).

Bacillus cereus (B24), *B. subtilis* (B13) y *B. megaterium* (B23 y B25) mostraron en este estudio la capacidad de degradar la quitina coloidal que se encuentra en el medio de cultivo. Los resultados anteriores sugieren que dichas bacterias pueden ser potenciales agentes agrobiológicos. *Bacillus subtilis* ha sido estudiado ampliamente y se ha demostrado que puede secretar quitinasas e inhibir la germinación y el desarrollo de las hifas de hongos patógenos como *F. oxysporum*, *R. solani*, *F. moniliforme*, y *Sclerotinia sclerotiorum* (Li et al., 2009). *Bacillus megaterium* también se ha reportado que puede producir este tipo de compuestos como mecanismo de antagonismo (Sabry, 1992).

7.8 Pruebas de compatibilidad

Estas pruebas se realizaron con la finalidad con la finalidad de aumentar la información concerniente a las propiedades de las diferentes bacterias candidatas a utilizar en control biológico. Esto es, si se tiene una bacteria capaz de producir auxinas, pero con bajo potencial de inhibición, esta pudiera combinarse con otra muy agresiva capaz de producir quitinasas o antibióticos. La idea es combinar dos o más aislados para lograr un posible efecto sinérgico, sobre la enfermedad, el patógeno y, ó sobre la nutrición y el crecimiento del vegetal.

8. CONCLUSIONES

1. Se confirmó la identificación de *Fusarium verticillioides*, como agente causal de la pudrición de raíz y tallo del maíz, mediante técnicas moleculares.
2. La selección de organismos antagónicos a *F. verticillioides* en dos fases (líquida y sólida) permite estudiar miles de organismos en corto tiempo y de manera efectiva.
3. Los 42 microorganismos seleccionados de la fase sólida fueron evaluados con las pruebas de hemólisis y se obtuvieron un total de 14 microorganismos que mostraron ser alfa y gamma hemolíticos para evaluar en las pruebas en planta.
4. En las pruebas con plántulas de maíz se evaluaron los 14 aislados resultaron el B5, B13 y B25 como potenciales bioprotectores contra *F. verticillioides* con posibilidades de ser evaluados en invernadero y campo.
5. Los 14 aislados se evaluaron para conocer sobre su actividad promotora de crecimiento, se encontró que el aislado B8 puede producir compuestos tipo auxina; los aislados B13, B23, B24 y B25 pueden producir quitinasas y los aislados B4, B5, B8, B12, B13 y B23 son capaces de solubilizar fosfatos.
6. Con las pruebas de compatibilidad entre aislados se mostró que se pueden hacer siete tipos de mezclas entre aislados bacterianos gamma hemolíticos.

9. PERSPECTIVAS

Al término de este trabajo se logró tener tres microorganismos con potencial antagonista demostrado en las pruebas *in vitro* e *in planta*. Con estos resultados se puede inferir que se puede utilizar estos tres microorganismos para enfocarlos a desarrollar un posible producto para combatir la enfermedad de Fusarium en Sinaloa, con la ventaja que estos microorganismos son nativos de la región y ya se encuentran bien adaptados a las condiciones climáticas.

Con esta metodología se pretende poder atender no sólo problemas que puedan ser causados por *F. verticillioides*, sino también, utilizarla para generar un herramienta que nos permita actuar de manera rápida contra algunas otras enfermedades de interés que estén causando daños económicos en la región con algún otro tipo de patógeno y empleando a los aislados ya seleccionados y caracterizados en cuanto a su potencial antagónico a *F. verticillioides*. Esta estrategia puede ser empleada para otros tipos de patógenos fúngicos, y es una herramienta muy útil para la región ya que cuenta con 11, 520 microorganismos que pueden resultar antagónicos para otros patógenos como se describe anteriormente. Con esta herramienta se puede abordar cualquier problema que esté siendo causado por algún patógeno fúngico en cualquier otro cultivo.

A largo plazo, se pretende un estudio más a fondo de estos microorganismos para un posible producto biotecnológico para aplicarse en el cultivo de maíz y poder contrarrestar la enfermedad.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, F., Ahmad I. and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163:173—181.

Arias, R. S., Sagardoy, M. A., and Van Vuurde, J. W. L. 1999. Spatio-temporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *Journal of Basic Microbiology* 39:283–292.

Ash, C., Priest, F. G., and Collins, M. D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:253–260.

Azcón-Aguilar, C. and Barea, J. M. 1996. *Arbuscular mycorrhizas* and biological control of soil-borne plant pathogens an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*. 6: 57-464.

Babalola, O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32:1559–1570.

Bacon, C. W., Bennett, R. M., Hinton, D. M., and Voss, K. A. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease* 76:144-148.

Bacon, C. W., and Hinton, D. M. 1996. Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a non-obligate pathogen of corn. In “Fumonisin in Food: Advances in experimental medicine and biology”. L. S. Jackson, J. W. DeVries and L. B. Bullerman (eds). Plenum Press. New York, 1-18 p.

Bacon, C. W., and Nelson, P. E. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection* 57:514–21.

Bacon, C. W., Yates I. E., Hinton, D. M., and Filmore, M. 2001. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109: 325-332.

Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C. P., and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47:793-800.

Betanzos, M. E., Ramírez, F. A., Coutiño, E. B., Espinosa, P. N., Sierra, M. M., Zambada, M. A. y Grajales, S. M. 2009. Híbridos de maíz resistentes a pudrición de mazorca en Chiapas y Veracruz, México. *Agricultura Técnica en México* 35:389-398.

Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biological control by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4:343–350.

Bowen, G. D. 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: Ellwood, D.C., Latham, M.J., Hedjer, J.N., Lynch, J.M., Slater, J.M. (eds.) *Contemporary Microbial Ecology*. Academic Press, London. 283-304 p.

Buyer, J. S., Kratzke, M. G., and Sikora, L. J. 1993. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 59:677-681.

Buysens, S., Poppe, J., and Hofte, M. 1994. Role of siderophores in plant growth stimulation and antagonism by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. In: M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen (eds.). *Improving plant productivity with rhizosphere*

bacteria (pp. 139-141). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Adelaide, Australia.

Cattelan, A. J., Hartel, P. G. and Fuhrmann, J. J. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* 63:1670-1680.

Cavaglieri, L., Passone, A. and Etcheverry, M. 2004. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Research in Microbiology* 155:747–754.

Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M. I., Chulze, S., and Etcheverry, M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156:748-754.

Cavaglieri, L., Andres, L., Ibanez, M., and Etcheverry, M. 2005. Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: Effect of maize bacterisation and inoculum density. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:179-187.

Chang, W. T., Hsieh, C. H. and Hsieh, H. S. 2009. Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 25:375–382.

Chatterjee, A. K., Buchanan, G. E., Behrens, M.K. and Starr, M. P. 1978. Synthesis and excretion of polygalacturonic and transeliminase in *Erwinia*, *Yersinia*, and *Klebsiella* species. *Canadian Journal of Microbiology* 25:94–102.

Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A. and Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33–41.

Choudhary, D. K. and Johri, B. N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164:493-513.

Cordero-Ramírez, J. D. 2008. Microorganismos de la rizosfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Guasave, Sinaloa.

Cordero-Ramírez, J. D. 2011. Creación e identificación molecular de un banco de germoplasma de microorganismos de la rizosfera de maíz para el escrutinio de antagonistas a *Fusarium* sp. Tesis de Doctorado en biotecnología (en proceso). Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. Guasave, Sinaloa.

Cotton, T. K. and Munkvold, G. P. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88:550-555.

David, C., Herve, C., Nicolas, F., Isabelle, S. J., Mohamed, A., & Franc. P. 2005. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpyA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6°A resolution. *Journal of Molecular Biology* 347:121-134.

Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology* 176:421-426.

Fridlender, M., Inbar, J., and Chet, I. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1, 3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry* 25:1211-1221.

Forbes, B. A., Sahm, D. F., and Weissfeld, A. S. 2002. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th Ed. Mosby, St. Louis, MO.p.

Gaudin, V., Vrain, D. and Jouanin, L. 1994. Bacterial genes modifying hormonal balance in plant. Plant Physiology and Biology 32:11-29.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41:109–117.

Goldstein, A.H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. Biological Agriculture and Horticulture 12:185–193.

Gopalakrishnan, S., Humayun, P., Kiran, K. B., Kannan, K. G. I., Vidya, S. M., Deepthi, K., and Rupela, O. 2011. Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27:1313–1321.

Gorlach-Lira, K. and Stefania, K. 2009. Antagonistic activity of bacteria isolated from crops cultivated in a rotation system and a monoculture against *Pythium debaryanum* and *Fusarium oxysporum*. Foliar Microbiology 54 5:447–450.

Gutiérrez-Manero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., and Talon, M. 2001. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum 111:206-211.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parek, L. J., and Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245: 83-93.

Gyaneshwar, P., Parekh, L. J., Archana, G., Poole, P. S., Collins, M. D., Hutson, R. A., and Kumar, G. N. 1999. Involvement of a phosphate-starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. FEMS Microbiology Letters 171:223-229.

Haas, D., and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonized *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology 41:117-153.

Hallmann, J., Rodriguez-Kabana, R., and Kloepper, J. W. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. Soil Biology and Biochemistry 31:551-560.

He, H., Silo-Suh, L. A., Handelsman, J. and Clardy, J. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. Tetrahedron Letters 35:2499–2502.

Herlax, V. and Bakas, L. S. 2002. Aplicaciones terapéuticas de toxinas líticas formadoras de poros: potencialidades de α -hemolisina de *Escherichia coli*. Medicina 62:66-72.

Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Acebo-Guerrero, Y., Velázquez-del Valle, M., and Hernández-Lauzardo, A. 2008. Antagonistic activity of cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). Applied Soil Ecology 39:180–186.

Hinton, D. M., and Bacon, C. W. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. Mycopathologia 129:117-125.

Heulin T., Berge O., Mavingui P., Gouzou L., Hebbar K. P. & Balandreau J. 1994. *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N₂-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *European Journal of Soil Biology* 30:35–42.

Hongyou, Z., Hailei, W., Xili, L., Ye, W., Liqun, Z., and Wenhua, T. 2005. Improving biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* through chromosomal integration of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes. *Chinese Science Bulletin* 50:775-781.

Honorato, R. 2000. *Manual de Edafología*. Ed. Alfaomega. México 1^a reimpression. 201-202.

Howard, P. C., Eppley, R. M., Stack, M. E., Warbritton A., Voss K. A., Lorentzen, R. J., Kovach, R. M. and Bucci, T. J. 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feed study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives* 109:277–282.

Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411–441.

Kajimura, Y., and Kaneda, M. 1996. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation, and biological activity. *Journal of Antibiotics* 49:129–135.

Kajimura, Y., and Kaneda, M. 1997. Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 50:220–228.

Kedera, C. J., Leslie, J. F. and Clattin, L. E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 84:603–607.

Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. and Kecskes, M. L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming system: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry* 36:1229-1244.

Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 38:423–441.

Kim, K. Y., Jordan, D. and Krishnan, H. B. 1998. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 159:121-127.

Kishore, G. K., Pande, S. and Podile, A. R. 2005. Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 95:1157-1165.

Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Review of Plant Protection Research* 8:114-125.

Kumar, V. and Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils* 28:301-305.

Kurek, E. and Jaroszuk-Scisel, J. 2003. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control* 26:48-56.

Lal, S. and Tabacchioni, S. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology* 49:2–10.

Lambert, B., Leyns, F., Van Rooyen, L., Gossele, F., Papon, I. and Swings, J. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied Environmental Microbiology* 53 8:1866–1871.

Leslie, F. and Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 274 pp.

Li, J., Yang Q., Zhao, L., Zhang, S., Wang, Y., and Zhao, X. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University Science B*10:264-272.

Luna-Olvera, H. A. 1998. Supresión de *Fusarium moniliforme* por *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza. 57 p.

Lynch, J. M. 1990. Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotechnology Advance* 8:335–346.

Mantelin, S., and Touraine, B., 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* 55:27–34.

Manjula, K., Kishore, G. K. and Podile, A. R. 2004. Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Canadian Journal of Microbiology* 50:737-744.

Marschner, H. 1999. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. London. 2nd Edition. 130-142.

Maryline, M. R., Trolet-Aziz, P., Quantinet, D., Biagiante, S. and Aziz, A. 2007. Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and

stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 118 1:43-57.

Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O. and Mengel, K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils* 30:433-439.

Matiru, V. N. and Dakora, F. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology* 3:1–7.

Mavingui, P. and Heulin, T. 1994. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* 26:801–803.

Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J. 1994. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology* 62:3061–5.

Morales-Rodríguez, I. 2007. Especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la mazorca del maíz en México. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 89 pp.

Morel, J. L., Mench, M. and Guckert, A. 1986. Measurement of Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology of Fertilized Soils* 2:29-34.

Munkvold, G. P. and Desjardins, A. E., 1997a. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81:556–565.

Munkvold, G. P., McGee, D. C. and Showers, W. E. 1997b. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Phytopathology* 97:209–217.

Nagórska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54:495-508.

Nelson, P.E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29–36.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An illustrated Manual for identification. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, USA.128-129 p.

Nielsen, P. and Sorensen, J. 1997. Multi-target and mediumin dependent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 22:183–192.

Omar, I., O'Neill, T. M., and Rosall, S. 2006. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology* 55:92-99.

Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78:84-88.

Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D. and Sharon, A. 2003. Early events in *Fusarium verticillioides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1695-1701.

Pereira, P., Nesci, A., and 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* 42:281-287.

Raaijmakers, J. M., van der Sluis, I., Koster, M., Bakker, P. A. H. M., Welsbeek, P. J., and Schippers B. 1995. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Canadian Journal of Microbiology* 4:126-135.

Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537-547.

Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., and Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.

Rosado, A. S., and Seldin, L. 1993. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal Microbiology Biotechnology* 9:521–528.

Rosales, A. M., and Mew, T. W. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. *Plant Disease* 81:49-52.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., and Pare, P. W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1017-1026.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., and Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100:4927-4932.

Sabry, S. A. 1992. Microbial degradation of shrimp-shell waste. *Journal of Basic Microbiology* 32:107-111.

Shali, A., Ghasemi, S., Ahmadian, G., Ranjbar, G., Dehestani, A., Khalesi, N., Motallebi, E., and Vahed, M. 2010. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Phytoparasitica* 38:141–147.

Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., and Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology* 60:2023–30.

Singh, S., and Kapoor, K. K. 1998. Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biology and Fertility of Soils* 28:139-144.

Singh, H. P. and Singh, T. A. 1993. The interaction of rockphosphate, *Bradyrhizobium*, vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilizing microbes on soybean grown in a sub-Himalayan mollisol. *Mycorrhiza* 4:37–43.

Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., and Maheshwari, D. K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1669–1679.

Sneh, D., Dupler, M., Elad, Y., and Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium* suppressive soil. *Phytopathology* 74:1115-1124.

Stevenson, F. J. and Cole, M. A. 1999. Cycles of soil: Carbon, nitrogen, phosphorous, sulfur, micronutrients. 2nd Edition. Wiley. New York 427 p.

Tanaka, H., and Watanabe, T. 1995. Glucanases and chitinases of *Bacillus circulans* WL-12. Journal of Industrial Microbiology 114:478-483.

Trivedi, P., Spann, T. and Wang, N. 2011. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in florida. Microbial Ecology 62:324–336.

Van Dijk, K. V. and Nelson, E. B. 1998. Inactivation of seed exudates stimulants of *Pythium ultimum* sporangium germination by biocontrol strain of *Enterobacter cloacae* and other seed-associated bacteria. Soil Biology and Biochemistry 29:351-355.

Vandenbergh, P. A. and Gonzalez, C. F. 1984. Method for protecting the growth of plants by employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. U.S. patent No. 4479 936.

Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 225:571-586.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO Journal 8:351-358.

Volkmar, K. M., and Bremer, E. 1998. Effects of seed inoculation with a strain of *Pseudomonas fluorescens* on root growth and activity of wheat in well-watered and drought-stressed glass-fronted rhizotrons. Canadian Journal of Plant Sciences 78:545-551.

Walsh, U. F., Morrissey, J. P., and O’Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Current Opinion in Biotechnology 12:289-295.

Wang, Y., Brown, H. N., Crowley, D. E., and Szaniszló, P. J. 1993. Evidence for direct utilization of a siderophore ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell and Environment* 16:579-585.

Weller, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379–407.

Wen-Teish, C., Cheng-Hong, H., Hung-Sheng, H., and Chinshuh, C. 2009. Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:375-382.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Biology* 52:487-511.

White, G. D. 2000. Compendium of corn diseases. 3rd ed. APS Press. St. Paul, MN. USA. 78 pp.

Yu, G.Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., and Bertagnolli, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology Biochemistry* 34:955–63.

Zhang, N., Wu K., He, X., Shu-Qing, L., Zhen-Hua, Z., Shen, B., Xing-ming, Y., Rui-Fu, Z., Qi-Wei, H., and Qi-Rong, S. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil* 344:87–97.

ANEXO 1. Listado de los posibles antagonistas seleccionados en las pruebas en medio liquido. Pendiente= Falta identificación molecular

PLACA#	POSICIÓN	GENBANK ID.	ACCESIÓN	POSIBLE ANTAGONISTA	#	CELDA SUBANCO	PLACA SUBANCO	% de inhibición
1	A1			Secuencia no encontrada !!!	1	A01	1	87
1	C1			Secuencia no encontrada !!!	2	A02	1	67
1	C12	151935460	EF428248.2	<i>Bacillus megaterium</i> strain HDYM-24	3	A03	1	88
1	D8			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	4	A04	1	95
1	E2			<i>Bacillus bataviensis</i>	5	A05	1	75
1	E8			<i>Bacillus megaterium</i>	6	A06	1	77
1	F7			<i>Pseudomonas putida</i>	7	A07	1	93
1	H1			<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Dissolvens</i> (85%)	8	A08	1	70
1	H10			<i>Enterobacter cloacae</i>	9	A09	1	73
1	H12			<i>Enterobacter cloacae</i>	10	A10	1	72
2	A2			<i>Bacillus megaterium</i>	11	A11	1	91
2	C12			PENDIENTE	12	A12	1	63
2	D1			<i>Bacillus subtilis</i> (98%)	13	B01	1	65
2	F3			<i>Bacillus megaterium</i>	14	B02	1	76
2	F11			<i>Bacillus cereus</i> strain MTCC 9818	15	B03	1	86
2	G11			<i>Bacillus megaterium</i>	16	B04	1	67
3	A6	161172563	EU221370.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2P2	17	B05	1	86
3	B4			<i>Bacillus flexus</i> (98%)	18	B06	1	91
3	B11			<i>Bacillus pumilus</i>	19	B07	1	72
3	C4	295083378	GU971728.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain AFB 3	20	B08	1	84
3	C6			<i>Bacillus subtilis</i>	21	B09	1	90
3	D1			<i>Bacillus flexus</i> strain U8	22	B10	1	77
3	E12			<i>Paenibacillus lautus</i> strain TSWCS3	23	B11	1	83
3	G3	268637399	GU143908.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-04	24	B12	1	78
3	H6			<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F	25	C01	1	76
4	A3			<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10164 16S ribosomal RNA gene	26	C02	1	
5	B2			<i>Bacillus megaterium</i>	27	C03	1	87
5	B4	290463987	GU434361.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain T11-11 16S ribosomal RNA gene	28	C04	1	89
5	B6			<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	29	C05	1	68
5	C2	326698877	JF416939.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain E5 16S ribosomal RNA gene	30	C06	1	91

5	C3			<i>Bacillus pumilus</i>	31	C07	1	84
5	C10	268637401	GU143908.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-04 16S ribosomal RNA gene	32	C08	1	72
5	C11			<i>Bacillus megaterium</i> strain LCR35 16S ribosomal RNA gene	33	C09	1	79
5	E2			<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	34	C10	1	69
5	E11			<i>Enterobacter cloacae</i> (85%)	35	C11	1	76
5	G10	161172563	EU221370.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2P2 16S ribosomal RNA gene	36	C12	1	68
5	G12			<i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene	37	D01	1	68
5	H8			<i>Bacillus subtilis</i> strain TXc1-2 16S ribosomal RNA gene	38	D02	1	66
6	A7	161172553	EU221360.1	<i>Bacillus niacini</i> strain J2S7 16S ribosomal RNA gene	39	D03	1	79
6	A9			<i>Bacillus cereus</i>	40	D04	1	79
6	A11	241897702	FJ976617.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain LCR108 16S ribosomal RNA gene	41	D05	1	75
6	B4	161172563	EU221370.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2P2 16S ribosomal RNA gene	42	D06	1	71
6	C1			<i>Bacillus megaterium</i>	43	D07	1	85
6	C5	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	44	D08	1	81
6	C8			<i>Bacillus cereus</i>	45	D09	1	71
6	D9			<i>Bacillus subtilis</i>	46	D10	1	87
6	E9	292486100	GU826153.1	<i>Bacillus anthracis</i> strain Q23 16S ribosomal RNA gene	47	D11	1	88
6	F5	163644717	EU162021.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate PGBw1 16S ribosomal RNA gene	48	D12	1	69
6	F6	241897702	FJ976617.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain LCR108 16S ribosomal RNA gene	49	E01	1	69
6	F9	269115799	GU167978.1	<i>Bacillus cereus</i> strain NK1 16S ribosomal RNA gene	50	E02	1	88
6	G4			<i>Bacillus flexus</i>	51	E03	1	85
7	A4			<i>Bacillus cereus</i>	52	E04	1	72
7	B1	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	53	E05	1	66
7	B9	258450989	GQ503320.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain AsK08 16S ribosomal RNA gene	54	E06	1	72
7	C3	163017653	EU168417.1	<i>Bacillus cereus</i> strain IBL01439 16S ribosomal RNA gene	55	E07	1	79
7	D2	289470720	GU434216.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain CC7 16S ribosomal RNA gene	56	E08	1	72
7	E3	290463991	GU434365.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain TXc1-2 16S ribosomal RNA gene	57	E09	1	73
7	E4	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	58	E10	1	72
7	F3	294346812	CP001983.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551, complete genome	59	E11	1	75
7	G2	237899423	FJ966221.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain Bio AA3 16S ribosomal RNA gene	60	E12	1	74
7	H2			<i>Bacillus cereus</i>	61	F01	1	79
7	H5	195548111	EU910251.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain EK-31 16S ribosomal RNA gene	62	F02	1	70
7	H9	254305419	GQ273920.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain 3#-5 16S ribosomal RNA gene	63	F03	1	93
9	A4	156255920	EF644413.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain RT2 16S ribosomal RNA gene	64	F04	1	71
9	B3			<i>Enterobacter hormaechei</i>	65	F05	1	72

9	D6			<i>Bacillus megaterium</i>	66	F06	1	81
9	E2			<i>Enterobacter sp. (93%)</i>	67	F07	1	77
9	E5	294799901	CP001982.1	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319, complete genome	68	F08	1	74
9	G6			<i>Bacillus megaterium</i> (96%)	69	F09	1	86
10	D9			<i>Bacillus flexus</i>	70	F10	1	92
10	F12			Secuencia no encontrada !!!	71	F11	1	82
10	H5	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	72	F12	1	82
10	H11			<i>Bacillus cereus</i>	73	G01	1	72
11	A1	149929782	EF639849.1	<i>Bacillus subtilis</i> 16S ribosomal RNA gene	74	G02	1	75
11	D3	291479981	GU568196.1	<i>Bacillus axarquiensis</i> strain LNXM37 16S ribosomal RNA gene	75	G03	1	72
11	D11			Secuencia no encontrada !!!	76	G04	1	75
11	E9			<i>Bacillus oceanisediminis</i>	77	G05	1	71
11	F2			<i>Bacillus flexus</i> (96%)	78	G06	1	92
11	F4	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	79	G07	1	83
11	F10	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	80	G08	1	77
11	G3			<i>Bacillus megaterium</i> (91%)	81	G09	1	72
11	G11			Secuencia no encontrada !!!	82	G10	1	71
11	H9			<i>Bacillus megaterium</i>	83	G11	1	73
12	D8			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	84	G12	1	85
12	G6	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	85	H01	1	61
12	H11	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	86	H02	1	63
13	C12	56681672	AY757300.1	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain P5.3 16S ribosomal RNA gene	87	H03	1	62
13	G9	291192380	GU723509.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain B1M/2 16S ribosomal RNA gene	88	H04	1	55
13	H11	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	89	H05	1	62
13	H12	195548109	EU910249.1	<i>Bacillus firmus</i> strain EK-29 16S ribosomal RNA gene	90	H06	1	53
14	B5			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	91	H07	1	65
14	C11	183673336	EU586795.1	<i>Bacillus cereus</i> strain MZ-30 16S ribosomal RNA gene	92	H08	1	62
14	E4	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	93	H09	1	90
14	G1	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	94	H10	1	92
15	A9	309297085	GU188946.1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain BCHCNZ270B 16S ribosomal RNA gene	95	H11	1	92
15	B1	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	96	H12	1	90
15	B12			<i>Bacillus flexus</i>	97	A01	2	79
15	C1	59624707	AY905691.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain CICC10072 16S ribosomal RNA gene	98	A02	2	82
15	C3	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	99	A03	2	83

15	D12	209865462	FJ263368.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain RC24 16S ribosomal RNA gene	100	A04	2	73
15	E5			Secuencia no encontrada !!!	101	A05	2	85
15	H5	161172561	EU221368.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2S9 16S ribosomal RNA gene	102	A06	2	85
16	A7			<i>Bacillus subtilis</i>	103	A07	2	81
16	D1	281192837	GU191902.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain SB 3129 16S ribosomal RNA gene	104	A08	2	73
16	E11			<i>Pseudomonas lini</i> (99%)	105	A09	2	90
16	F7			<i>Pseudomonas corrugata</i>	106	A10	2	71
17	A1			<i>Pseudomonas lini</i> (99%)	107	A11	2	90
17	C5			<i>Pseudomonas lini</i> (99%)	108	A12	2	88
17	C8			<i>Pseudomonas corrugata</i>	109	B01	2	82
17	E1			<i>Pseudomonas corrugata</i>	110	B02	2	76
17	E2			<i>Pseudomonas corrugata</i>	111	B03	2	70
17	E9	226537000	FJ841976.1	<i>Bacillus cereus</i> strain MTCC 9818 16S ribosomal RNA gene	112	B04	2	90
17	G2			<i>Pseudomonas lini</i> (99%)	113	B05	2	89
17	H1			<i>Pseudomonas corrugata</i>	114	B06	2	82
17	H2	323363383	FR749859.1	<i>Bacillus cereus</i> partial 16S rRNA gene, strain CNE 11	115	B07	2	83
18	C5			<i>Pseudomonas corrugata</i>	116	B08	2	90
18	D4	189170081	EU697391.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain CMG 857 16S ribosomal RNA gene	117	B09	2	70
18	D9			<i>Pseudomonas corrugata</i>	118	B10	2	90
18	F5			<i>Pseudomonas lini</i> (99%)	119	B11	2	90
18	F8	261362502	GQ891098.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain BA15 16S ribosomal RNA gene	120	B12	2	93
19	A6			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	121	C01	2	98
19	B5			Secuencia no encontrada !!!	122	C02	2	84
19	B11	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	123	C03	2	80
19	C2	256265105	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene	124	C04	2	95
19	C12	217039136	FJ461752.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain SH6-1 16S ribosomal RNA gene	125	C05	2	91
19	D2	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	126	C06	2	79
19	E4	292486100	GU826153.1	<i>Bacillus anthracis</i> strain Q23 16S ribosomal RNA gene	127	C07	2	91
19	E6	294346812	CP001983.1	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551, complete genome	128	C08	2	81
19	G1	290782611	GU471747.1	<i>Brevibacillus sp.</i> ZQ2 16S ribosomal RNA gene	129	C09	2	71
20	B6	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	130	C10	2	94
20	B11	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	131	C11	2	86
20	G7	258450989	GQ503320.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Ask08 16S ribosomal RNA gene	132	C12	2	94
20	H1	292486100	GU826153.1	<i>Bacillus anthracis</i> strain Q23 16S ribosomal RNA gene	133	D01	2	73

21	A1			<i>Bacillus thuringiensis</i> (76%)	134	D02	2	63
22	B4	290463988	GU434362.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain THt4-2 16S ribosomal RNA gene	135	D03	2	89
22	C4	259027643	GQ482980.1	<i>Bacillus subtilis</i> culture-collection CCGB:1271 16S ribosomal RNA (rrs) gene	136	D04	2	71
22	E3	312099932	HQ333012.1	<i>Bacillus cereus</i> strain THt1-8 16S ribosomal RNA gene, partial	137	D05	2	81
23	A1			Secuencia no encontrada !!!	138	D06	2	96
23	B1	241897702	FJ976617.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain LCR108 16S ribosomal RNA gene	139	D07	2	95
23	C1	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	140	D08	2	66
23	B2	256265105	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene	141	D09	2	66
23	A12			<i>Bacillus cereus</i> (85%)	142	D10	2	67
23	E2			<i>Bacillus megaterium</i>	143	D11	2	68
23	E3	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	144	D12	2	70
23	C10			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	145	E01	2	85
23	F8	284822126	GU332612.1	<i>Bacillus marisflavi</i> strain AD2-3 16S ribosomal RNA gene	146	E02	2	87
24	A8	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	147	E03	2	74
24	B8			Secuencia no encontrada !!!	148	E04	2	94
24	C7	256265105	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene	149	E05	2	73
24	C10	300834514	HM439506.1	<i>Bacillus cereus</i> strain V34 16S ribosomal RNA gene	150	E06	2	93
24	C11	292486100	GU826153.1	<i>Bacillus anthracis</i> strain Q23 16S ribosomal RNA gene	151	E07	2	89
24	E6	160892362	EU240431.1	<i>Bacillus cereus</i> strain B189 16S ribosomal RNA gene	152	E08	2	67
24	E7	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	153	E09	2	73
24	G5	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	154	E10	2	67
24	G11	294337893	FN666624.1	<i>Lysinibacillus sp.</i> 5.5LF 9P partial 16S rRNA gene, strain 5.5LF 9P	155	E11	2	68
25	A4			<i>Bacillus thuringiensis</i>	156	E12	2	67
25	A6	206581446	EU741100.1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain 13651U 16S ribosomal RNA gene	157	F01	2	85
25	B1	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	158	F02	2	79
25	C1	229560522	FJ906740.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB12-518F 16S ribosomal RNA gene	159	F03	2	85
25	C8			<i>Bacillus badius</i> (98%)	160	F04	2	80
25	E4	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	161	F05	2	70
25	F8			Secuencia no encontrada !!!	162	F06	2	73
25	F11			<i>Bacillus thuringiensis</i> (82%)	163	F07	2	71
25	G2	239618682	GQ122328.1	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> strain R7 16S ribosomal RNA	164	F08	2	74

				gene					
25	H2	294337893	FN666624.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. 5.5LF 9P partial 16S rRNA gene, strain 5.5LF 9P	165	F09	2	69	
25	H10	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	166	F10	2	83	
26	A4	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	167	F11	2	80	
26	A6	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	168	F12	2	80	
26	A7			<i>Bacillus flexus</i> (92%)	169	G01	2	86	
26	B9			Secuencia no encontrada !!!	170	G02	2	67	
26	C1	254682159	GQ284507.1	<i>Lysinibacillus</i> sp. TSSAS2-32 16S ribosomal RNA gene	171	G03	2	77	
26	C6			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	172	G04	2	82	
26	C10			<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (86%)	173	G05	2	71	
26	D6	284822126	GU332612.1	<i>Bacillus marisflavi</i> strain AD2-3 16S ribosomal RNA gene	174	G06	2	85	
26	F1			<i>Bacillus fusiformis</i> (80%)	175	G07	2	98	
26	F7	254939239	FN433012.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> partial 16S rRNA gene, isolate CCM1B	176	G08	2	74	
26	H1	254939239	FN433012.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> partial 16S rRNA gene, isolate CCM1B	177	G09	2	75	
26	H2			<i>Bacillus megaterium</i>	178	G10	2	69	
26	H5			<i>Bacillus oceanisediminis</i>	179	G11	2	89	
27	C11	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	180	G12	2	68	
27	C12			Secuencia no encontrada !!!	181	H01	2	72	
27	D2			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	182	H02	2	95	
28	C3			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	183	H03	2	74	
28	B7	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	184	H04	2	91	
28	C11	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	185	H05	2	80	
28	D6	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	186	H06	2	80	
28	E6	253326849	GQ201998.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> strain AR-10 16S ribosomal RNA gene	187	H07	2	82	
28	F6			Secuencia no encontrada !!!	188	H08	2	73	
29	F1	268637397	GU143904.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T16-06 16S ribosomal RNA gene	189	H09	2	71	
29	E2			Secuencia no encontrada !!!	190	H10	2	91	
29	C8	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	191	H11	2	69	
29	G6	241897702	FJ976617.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain LCR108 16S ribosomal RNA gene	192	H12	2	63	
30	F11			PENDIENTE	193	A01	3	66	
30	B12			PENDIENTE	194	A02	3	66	
32	B1			PENDIENTE	195	A03	3	82	
32	B6			PENDIENTE	196	A04	3	96	
32	B8			PENDIENTE	197	A05	3	90	

32	C1			PENDIENTE	198	A06	3	81
32	C2			PENDIENTE	199	A07	3	84
32	C3			PENDIENTE	200	A08	3	80
32	C10			PENDIENTE	201	A09	3	81
32	D3			PENDIENTE	202	A10	3	79
32	D7			PENDIENTE	203	A11	3	92
32	E7			PENDIENTE	204	A12	3	90
32	F9			PENDIENTE	205	B01	3	84
32	G8			PENDIENTE	206	B02	3	73
32	H7			PENDIENTE	207	B03	3	89
32	H8			PENDIENTE	208	B04	3	71
33	A3	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	209	B05	3	83
33	C3			<i>Bacillus megaterium</i>	210	B06	3	79
33	C4	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	211	B07	3	68
33	D4			<i>Bacillus aryabhatai</i>	212	B08	3	77
33	G2	148833316	EF612765.1	<i>Aquaspirillum itersonii</i> subsp. <i>itersonii</i> strain LMG 4337 16S ribosomal RNA gene	213	B09	3	66
34	F1	283971023	GU297605.1	<i>Bacillus flexus</i> strain U8 16S ribosomal RNA gene	214	B10	3	69
34	F6			<i>Bacillus flexus</i>	215	B11	3	96
34	F7	161172563	EU221370.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2P2 16S ribosomal RNA gene	216	B12	3	70
35	D1			<i>Terribacillus</i> sp. (92%)	217	C01	3	70
35	C6			<i>Terribacillus</i> sp. (92%)	218	C02	3	71
35	E1	229560522	FJ906740.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB12-518F 16S ribosomal RNA gene	219	C03	3	80
35	F2	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	220	C04	3	71
35	F3			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	221	C05	3	78
35	F7			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	222	C06	3	74
35	F8			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	223	C07	3	90
35	G4	110225895	DQ666685.1	<i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene	224	C08	3	88
35	G7	219814575	FJ266316.1	<i>Paenibacillus borealis</i> strain RFNB5 16S ribosomal RNA gene	225	C09	3	80
35	G8			Secuencia no encontrada !!!	226	C10	3	86
35	H1			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	227	C11	3	70
35	H6			<i>Bacillus megaterium</i>	228	C12	3	72
35	H7	151368218	EF667987.1	<i>Bacillus megaterium</i>	229	D01	3	76
36	A8			Secuencia no encontrada !!!	230	D02	3	82
36	B9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	231	D03	3	79

36	B10			<i>Bacillus megaterium</i>	232	D04	3	76
36	B12	256265105	GQ375229.1	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene	233	D05	3	81
36	C8	161172563	EU221370.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain B2P2 16S ribosomal RNA gene	234	D06	3	81
36	C9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	235	D07	3	77
36	D1	110225895	DQ666685.1	<i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene	236	D08	3	70
36	D5	262223527	GU084135.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain DB-1 16S ribosomal RNA gene	237	D09	3	82
36	D6			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	238	D10	3	88
36	D7	295848097	HM027880.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain RKJ 600 16S ribosomal RNA gene	239	D11	3	91
36	D9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	240	D12	3	50
36	E3			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	241	E01	3	72
36	F4	238801029	FJ982656.1	<i>Bacillus cereus</i> strain JBE0002 16S ribosomal RNA gene	242	E02	3	89
36	G2	146269564	EF545137.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BC98 16S ribosomal RNA gene	243	E03	3	92
37	A1			PENDIENTE	244	E04	3	81
37	C7			PENDIENTE	245	E05	3	80
37	C8			PENDIENTE	246	E06	3	97
37	C10			PENDIENTE	247	E07	3	82
37	D1			PENDIENTE	248	E08	3	74
37	D6			PENDIENTE	249	E09	3	83
37	D10			PENDIENTE	250	E10	3	88
37	D12			PENDIENTE	251	E11	3	87
37	E2			PENDIENTE	252	E12	3	91
37	F2			PENDIENTE	253	F01	3	87
37	F3			PENDIENTE	254	F02	3	85
37	F6			PENDIENTE	255	F03	3	71
38	A2			<i>Bacillus megaterium</i>	256	F04	3	86
38	A8			<i>Bacillus thuringiensis</i>	257	F05	3	97
38	D2	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	258	F06	3	99
38	E1	296144730	HM103342.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain ZH22 16S ribosomal RNA gene	259	F07	3	90
38	E5	285206707	GU339236.1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain EH6 16S ribosomal RNA gene	260	F08	3	85
38	E7			<i>Bacillus badius</i> (98%)	261	F09	3	84
38	F8			<i>Bacillus badius</i> (98%)	262	F10	3	84
38	G1			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	263	F11	3	81
38	G6	163644717	EU162021.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate PGBw1 16S ribosomal RNA gene	264	F12	3	85
38	G8			<i>Bacillus megaterium</i>	265	G01	3	86

38	H4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	266	G02	3	91
38	H6	<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	267	G03	3	86
38	H8	<i>Bacillus megaterium</i>	268	G04	3	82
39	A2	PENDIENTE	269	G05	3	85
39	B12	PENDIENTE	270	G06	3	83
39	C5	PENDIENTE	271	G07	3	94
39	C8	PENDIENTE	272	G08	3	92
39	D1	PENDIENTE	273	G09	3	89
39	D5	PENDIENTE	274	G10	3	74
39	D6	PENDIENTE	275	G11	3	73
39	D7	PENDIENTE	276	G12	3	70
39	E2	PENDIENTE	277	H01	3	78
39	F2	PENDIENTE	278	H02	3	79
39	F11	PENDIENTE	279	H03	3	83
39	G1	PENDIENTE	280	H04	3	82
40	A8	PENDIENTE	281	H05	3	74
40	B8	PENDIENTE	282	H06	3	73
40	C2	PENDIENTE	283	H07	3	80
40	C11	PENDIENTE	284	H08	3	71
40	D2	PENDIENTE	285	H09	3	83
40	D8	PENDIENTE	286	H10	3	76
40	D11	PENDIENTE	287	H11	3	75
40	E6	PENDIENTE	288	H12	3	71
40	E12	PENDIENTE	289	A01	4	90
40	F6	PENDIENTE	290	A02	4	74
40	H1	PENDIENTE	291	A03	4	71
40	H12	PENDIENTE	292	A04	4	71
41	A2	PENDIENTE	293	A05	4	91
41	A7	PENDIENTE	294	A06	4	79
41	A11	PENDIENTE	295	A07	4	94
41	A12	PENDIENTE	296	A08	4	84
41	B7	PENDIENTE	297	A09	4	71
41	C1	PENDIENTE	298	A10	4	71
41	C8	PENDIENTE	299	A11	4	81
41	E7	PENDIENTE	300	A12	4	81

41	G4			PENDIENTE	301	B01	4	72
41	H3			PENDIENTE	302	B02	4	88
42	A9	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	303	B03	4	80
42	B1	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	304	B04	4	76
42	B3	163017653	EU168417.1	<i>Bacillus cereus</i> strain IBL01439 16S ribosomal RNA gene	305	B05	4	83
42	B9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	306	B06	4	86
42	B11	296258319	HM047298.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ZJU03 16S ribosomal RNA gene	307	B07	4	85
42	B12	195548108	EU910248.1	<i>Bacillus cereus</i> strain EK-28 16S ribosomal RNA gene	308	B08	4	88
42	C7	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	309	B09	4	79
42	D4			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	310	B10	4	78
42	D11			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	311	B11	4	77
42	E6	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	312	B12	4	83
42	E9			Secuencia no encontrada !!!	313	C01	4	79
42	E12			<i>Bacillus megaterium</i>	314	C02	4	82
42	F1			<i>Bacillus megaterium</i>	315	C03	4	83
42	F4			Secuencia no encontrada !!!	316	C04	4	80
42	G7			<i>Bacillus flexus</i>	317	C05	4	78
42	G8	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	318	C06	4	76
42	G9	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	319	C07	4	79
43	D1			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	320	C08	4	76
43	D10			<i>Bacillus cereus</i>	321	C09	4	63
44	B4	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	322	C10	4	70
44	A11	326698877	JF416939.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain E5 16S ribosomal RNA gene	323	C11	4	64
44	G10	256265102	GQ375226.1	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> strain CICC 10020 16S ribosomal RNA gene	324	C12	4	94
44	H9			<i>Enterobacter cloacae</i> (99%)	325	D01	4	65
45	G7	254939239	FN433012.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> partial 16S rRNA gene, isolate CCM1B	326	D02	4	62
45	G9			<i>Enterobacter cloacae</i> (99%)	327	D03	4	64
46	B7			PENDIENTE	328	D04	4	77
46	H6			PENDIENTE	329	D05	4	62
47	C5	156530451	EU096316.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain 7DY7 16S ribosomal RNA gene	330	D06	4	90
47	D6			<i>Bacillus megaterium</i>	331	D07	4	87
47	B12	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	332	D08	4	81
47	G10	297251363	HM055955.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain MB-13 16S ribosomal RNA gene	333	D09	4	73
48	G4	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	334	D10	4	62

48	F9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	335	D11	4	60
48	H9			<i>Bacillus megaterium</i>	336	D12	4	65
49	F5	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	337	E01	4	68
49	C5	110225895	DQ666685.1	<i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene	338	E02	4	70
49	C8	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	339	E03	4	67
50	C4			<i>Bacillus megaterium</i> (95%)	340	E04	4	61
50	E4	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	341	E05	4	75
50	B7	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	342	E06	4	67
51	D4	18086319	AY064218.1	<i>Anaerobranca californiensis</i> strain Paoha-1 16S ribosomal RNA gene	343	E07	4	87
51	H4	268637395	GU143902.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain T15-10 16S ribosomal RNA gene	344	E08	4	82
52	G9	290463991	GU434365.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain TXc1-2 16S ribosomal RNA gene	345	E09	4	72
52	H6	296144736	HM103348.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain ZH28 16S ribosomal RNA gene	346	E10	4	89
53	D1	285206748	GU339277.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain EH49 16S ribosomal RNA gene	347	E11	4	85
53	F1	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	348	E12	4	86
53	G8			<i>Bacillus megaterium</i>	349	F01	4	79
54	C8			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	350	F02	4	77
55	A5			<i>Bacillus cereus</i>	351	F03	4	70
55	E1	308083497	HM357883.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain D1B 16S ribosomal RNA gene	352	F04	4	73
56	B7	229560522	FJ906740.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB12-518F 16S ribosomal RNA gene	353	F05	4	74
56	A9	268637401	GU143908.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-04 16S ribosomal RNA gene	354	F06	4	78
56	A11	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	355	F07	4	76
56	C11			<i>Bacillus aryabhatai</i>	356	F08	4	74
56	E9			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	357	F09	4	73
57	B1			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	358	F10	4	82
57	C1	110225895	DQ666685.1	<i>Bacillus megaterium</i> 16S ribosomal RNA gene	359	F11	4	74
57	C8	297251363	HM055955.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain MB-13 16S ribosomal RNA gene	360	F12	4	81
57	D1	261362511	GQ891107.1	<i>Bacillus cereus</i> strain SO16 16S ribosomal RNA gene	361	G01	4	75
57	D11	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	362	G02	4	89
57	E11	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	363	G03	4	80
58	D1	295027210	FN667913.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> partial 16S rRNA gene, strain ucsc27	364	G04	4	72
58	B4			<i>Bacillus thuringiensis</i>	365	G05	4	72
58	B8			<i>Bacillus thuringiensis</i>	366	G06	4	73
58	D6	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	367	G07	4	72
58	E6	283855815	GU294132.1	<i>Bacillus cereus</i> strain T16-01 16S ribosomal RNA gene	368	G08	4	72

58	F6	297251363	HM055955.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain MB-13 16S ribosomal RNA gene	369	G09	4	72
58	H6	297251363	HM055955.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain MB-13 16S ribosomal RNA gene	370	G10	4	76
58	E11	151303409	EF620458.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain ISSDS-592 16S ribosomal RNA gene	371	G11	4	76
59	A10	229560525	FJ906742.1	<i>Bacillus flexus</i> strain IK-MB14-518F 16S ribosomal RNA gene	372	G12	4	92
59	D2	297251359	HM055951.1	<i>Bacillus cereus</i> strain MB-9 16S ribosomal RNA gene	373	H01	4	93
59	D5	268637398	GU143905.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Y4-36 16S ribosomal RNA gene	374	H02	4	86
59	D6	219938440	AM293344.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> 16S rRNA gene, strain DAB-Bt6	375	H03	4	89
59	G7	122939073	EF195169.1	<i>Bacillus cereus</i> strain RG-08/06 16S ribosomal RNA gene	376	H04	4	92
59	H6	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	377	H05	4	91
60	B5			PENDIENTE	378	H06	4	88
60	B8			PENDIENTE	379	H07	4	87
60	D1			PENDIENTE	380	H08	4	90
61	A8			<i>Enterobacter asburiae</i>	381	H09	4	90
61	B5	229560522	FJ906740.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB12-518F 16S ribosomal RNA gene	382	H10	4	88
61	C5			<i>Enterobacter hormaechei</i>	383	H11	4	91
61	C11			<i>Enterobacter cloacae</i>	384	H12	4	89
61	D7			<i>Enterobacter hormaechei</i>	385	A01	5	91
61	E4			<i>Enterobacter cloacae</i>	386	A02	5	90
62	A2			<i>Enterobacter cloacae</i>	387	A03	5	93
62	A12			<i>Enterobacter hormaechei</i>	388	A04	5	92
62	G10	156118593	EU073021.1	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate HQ040619-1 16S ribosomal RNA gene	389	A05	5	75
62	G11			<i>Enterobacter asburiae</i>	390	A06	5	93
63	D6			<i>Enterobacter asburiae</i>	391	A07	5	83
63	B10			<i>Enterobacter hormaechei</i>	392	A08	5	84
63	B11			<i>Enterobacter hormaechei</i>	393	A09	5	87
63	G11			<i>Enterobacter hormaechei</i>	394	A10	5	82
64	A8			<i>Bacillus thuringiensis</i>	395	A11	5	82
64	B3			<i>Enterobacter hormaechei</i>	396	A12	5	84
64	C5	299562115	HM131221.1	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain MSA2 16S ribosomal RNA gene	397	B01	5	82
64	H5			<i>Bacillus arbutinivorans</i>	398	B02	5	85
65	B5	206712299	FM212207.1	<i>Enterobacter hormaechei</i> (96%)	399	B03	5	79
65	D2			<i>Enterobacter asburiae</i>	400	B04	5	86
65	H5			<i>Enterobacter asburiae</i>	401	B05	5	87

66	A5	146771458	EF528317.1	<i>Enterobacter aerogenes</i> (99%)	402	B06	5	81
66	D7			<i>Enterobacter hormaechei</i>	403	B07	5	75
67	A5	302334428	HM775375.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PBCC9 16S ribosomal RNA gene	404	B08	5	71
67	B1			<i>Bacillus oceanisediminis</i>	405	B09	5	72
67	B4	229560522	FJ906740.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB12-518F 16S ribosomal RNA gene	406	B10	5	75
67	C8			Secuencia no encontrada !!!	407	B11	5	83
67	G7	161172600	EU221407.1	<i>Arthrobacter globiformis</i> strain A2S3 16S ribosomal RNA gene	408	B12	5	74
68	A4			<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (99%)	409	C01	5	75
68	B10	296044575	HM047302.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain PMR-C 16S ribosomal RNA gene	410	C02	5	77
68	B11	296044575	HM047302.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain PMR-C 16S ribosomal RNA gene	411	C03	5	87
68	C10	220681329	FJ544321.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> strain 81008 16S ribosomal RNA gene	412	C04	5	78
68	D4	326635900	JF694824.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain DL12 16S ribosomal RNA gene	413	C05	5	85
68	E10	300679419	HM439340.1	Uncultured bacterium clone BG31-4 16S ribosomal RNA gene	414	C06	5	87
68	E11			<i>Bacillus altitudinis</i>	415	C07	5	90
68	E12			<i>Agrobacterium rubi</i>	416	C08	5	90
68	G5	229560521	FJ906739.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain IK-MB11-518F 16S ribosomal RNA gene	417	C09	5	79
68	G11			<i>Bacillus cereus</i>	418	C10	5	82
68	G12			<i>Brevibacillus brevis</i>	419	C11	5	79
69	A8			<i>Bacillus drentensis</i>	420	C12	5	81
69	B6	302334428	HM775375.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PBCC9 16S ribosomal RNA gene	421	D01	5	83
69	C2			<i>Bacillus cereus</i>	422	D02	5	74
69	C3			<i>Bacillus cereus</i>	423	D03	5	77
69	C5	295083377	GU971727.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AFB 2 16S ribosomal RNA gene	424	D04	5	92
69	E7			Secuencia no encontrada !!!	425	D05	5	75
69	F1	197114320	EU977802.1	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain 1P03UB 16S ribosomal RNA gene	426	D06	5	82
69	F5	268637400	GU143907.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-01 16S ribosomal RNA gene	427	D07	5	92
69	F9			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (89%)	428	D08	5	79
69	G7	158957531	EU022589.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain KBA3RM1 16S ribosomal RNA gene	429	D09	5	88
70	A1			PENDIENTE	430	D10	5	76
70	A7			PENDIENTE	431	D11	5	77

70	A8			PENDIENTE	432	D12	5	74
70	A12			PENDIENTE	433	E01	5	75
70	B12			PENDIENTE	434	E02	5	73
70	C8			PENDIENTE	435	E03	5	92
71	A3	194460724	EU834541.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain O2-302 16S ribosomal RNA gene	436	E04	5	82
71	C3			<i>Bacillus cereus</i>	437	E05	5	94
71	C9			No existe la secuencia en el archivo !!!	438	E06	5	86
72	B7	296144736	HM103348.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain ZH28 16S ribosomal RNA gene	439	E07	5	76
72	B10			Secuencia no encontrada !!!	440	E08	5	84
72	E6	241897662	FJ976577.1	<i>Arthrobacter globiformis</i> strain LCR68 16S ribosomal RNA gene	441	E09	5	92
72	F6			<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>azorensis</i>	442	E10	5	75
72	F7			<i>Bacillus flexus</i>	443	E11	5	82
72	G5			<i>Bacillus cereus</i>	444	E12	5	89
72	G7			Secuencia no encontrada !!!	445	F01	5	94
73	A7	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	446	F02	5	79
73	A8			Secuencia no encontrada !!!	447	F03	5	89
73	A12			<i>Bacillus thuringiensis</i>	448	F04	5	77
73	C2			Secuencia no encontrada !!!	449	F05	5	76
73	C9			<i>Bacillus oceanisediminis</i>	450	F06	5	83
73	C10	268637398	GU143905.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Y4-36 16S ribosomal RNA gene	451	F07	5	72
73	E10			Secuencia no encontrada !!!	452	F08	5	77
73	E11			No existe la secuencia en el archivo !!!	453	F09	5	80
73	F9			<i>Bacillus oceanisediminis</i>	454	F10	5	76
74	A1			<i>Bacillus cereus</i>	455	F11	5	89
74	A3	304272409	HM752769.1	<i>Bacillus cereus</i> strain IMAUB1022 CS-2010 16S ribosomal RNA gene	456	F12	5	92
74	C9	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	457	G01	5	83
74	E2			<i>Bacillus cereus</i> (99%)	458	G02	5	75
74	F9	114154749	DQ915582.1	<i>Bacillus cereus</i> strain PB03 16S ribosomal RNA gene	459	G03	5	79
74	H2	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	460	G04	5	75
75	A8			PENDIENTE	461	G05	5	80
75	B1			PENDIENTE	462	G06	5	90
75	C6			PENDIENTE	463	G07	5	81
75	C8			PENDIENTE	464	G08	5	79
75	D3			PENDIENTE	465	G09	5	80

75	E5			PENDIENTE	466	G10	5	85
75	F3			PENDIENTE	467	G11	5	80
76	B10			PENDIENTE	468	G12	5	85
76	C1			PENDIENTE	469	H01	5	85
76	C5			PENDIENTE	470	H02	5	85
76	D7			PENDIENTE	471	H03	5	87
76	F1			PENDIENTE	472	H04	5	86
76	F6			PENDIENTE	473	H05	5	87
76	G2			PENDIENTE	474	H06	5	86
77	A12			PENDIENTE	475	H07	5	93
77	D1			PENDIENTE	476	H08	5	79
77	G8			PENDIENTE	477	H09	5	90
78	E1			Secuencia no encontrada !!!	478	H10	5	84
78	F6	161172600	EU221407.1	Arthrobacter globiformis strain A2S3 16S ribosomal RNA gene	479	H11	5	85
79	A4	113196068	DQ884352.1	Bacillus cereus strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	480	H12	5	76
79	C1			Bacillus pumilus	481	A01	6	86
79	C9	297251359	HM055951.1	Bacillus cereus strain MB-9 16S ribosomal RNA gene	482	A02	6	78
79	C11			Bacillus thuringiensis	483	A03	6	74
79	D7			Geobacillus thermodenitrificans	484	A04	6	78
79	F3			Bacillus cereus (82%)	485	A05	6	78
79	F11			Secuencia no encontrada !!!	486	A06	6	82
79	F12			Bacillus bataviensis	487	A07	6	77
79	H2			Bacillus thuringiensis serovar finitimus	488	A08	6	77
80	A5			<i>PENDIENTE</i>	489	A09	6	79
80	C4			<i>PENDIENTE</i>	490	A10	6	81
80	D9			<i>PENDIENTE</i>	491	A11	6	79
80	E2			<i>PENDIENTE</i>	492	A12	6	78
80	E5			<i>PENDIENTE</i>	493	B01	6	85
80	F5			<i>PENDIENTE</i>	494	B02	6	75
80	G1			<i>PENDIENTE</i>	495	B03	6	80
80	H3			<i>PENDIENTE</i>	496	B04	6	78
80	H8			<i>PENDIENTE</i>	497	B05	6	76
81	A7			<i>PENDIENTE</i>	498	B06	6	78
81	A12			<i>PENDIENTE</i>	499	B07	6	81
81	B2			<i>PENDIENTE</i>	500	B08	6	77

81	C3			PENDIENTE	501	B09	6	75
81	C11			PENDIENTE	502	B10	6	75
81	D2			PENDIENTE	503	B11	6	84
81	F5			PENDIENTE	504	B12	6	76
81	F12			PENDIENTE	505	C01	6	83
81	G5			PENDIENTE	506	C02	6	87
81	H6			PENDIENTE	507	C03	6	91
81	H9			PENDIENTE	508	C04	6	84
82	A2			<i>Bacillus cereus</i>	509	C05	6	86
82	B7	300250872	HM345997.1	<i>Bacillus cereus</i> strain DZ-h 16S ribosomal RNA gene	510	C06	6	81
82	C1	261259683	FN555441.1	<i>Bacillus cereus</i> partial 16S rRNA gene, strain C1 ecto 15	511	C07	6	77
82	C9	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	512	C08	6	81
82	E1	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	513	C09	6	95
82	F1	223679639	FJ675342.1	Uncultured bacterium clone LL141-7O6 16S ribosomal RNA gene	514	C10	6	83
82	F3			<i>Bacillus cereus</i>	515	C11	6	79
84	G7			PENDIENTE	516	C12	6	78
85	B12	260842027	GQ903386.1	<i>Bacillus firmus</i> strain XJSL1-7 16S ribosomal RNA gene	517	D01	6	76
85	C10			Secuencia no encontrada !!!	518	D02	6	85
85	D1			Secuencia no encontrada !!!	519	D03	6	77
85	D7			<i>Bacillus cereus</i>	520	D04	6	91
85	E1			<i>Bacillus cereus</i>	521	D05	6	79
86	D7	296044575	HM047302.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain PMR-C 16S ribosomal RNA gene	522	D06	6	78
87	A7			<i>Bacillus cereus</i> (96%)	523	D07	6	76
87	B10			<i>Bacillus cereus</i>	524	D08	6	84
87	G5			<i>Pseudomonas putida</i>	525	D09	6	77
88	C9			Secuencia no encontrada !!!	526	D10	6	86
89	A11			Secuencia no encontrada !!!	527	D11	6	96
89	C9	215983492	EU867370.1	<i>Bacillus asahii</i> strain CCGE2069 16S ribosomal RNA gene	528	D12	6	77
89	D1	34334382	AY364536.1	<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> strain IH9 16S ribosomal RNA gene	529	E01	6	81
89	H11			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (88%)	530	E02	6	89
90	A7			Secuencia no encontrada !!!	531	E03	6	88
90	C1	261259698	FN555456.1	<i>Bacillus cereus</i> partial 16S rRNA gene, strain U1 ecto 9	532	E04	6	90
90	C4			<i>Bacillus thuringiensis</i>	533	E05	6	80
90	C8	261362511	GQ891107.1	<i>Bacillus cereus</i> strain SO16 16S ribosomal RNA gene	534	E06	6	84

90	C9	300244969	HM191249.1	<i>Bacillus sonorensis</i> strain L62 16S ribosomal RNA gene	535	E07	6	85
90	D1			<i>Bacillus cereus</i> (90%)	536	E08	6	85
90	D11			<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>azorensis</i>	537	E09	6	94
90	E7			Secuencia no encontrada !!!	538	E10	6	87
90	E12	261362505	GQ891101.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CAN_3S7 16S ribosomal RNA gene	539	E11	6	91
90	F1	113196068	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	540	E12	6	81
90	F2			<i>Bacillus cereus</i>	541	F01	6	84
90	F11			Secuencia no encontrada !!!	542	F02	6	95
90	F12			<i>Bacillus cereus</i>	543	F03	6	89
90	H11	163017653	EU168417.1	<i>Bacillus cereus</i> strain IBL01439 16S ribosomal RNA gene	544	F04	6	89
91	B4			<i>Pantoea dispersa</i>	545	F05	6	78
91	B9	301131554	HM161869.1	<i>Pantoea dispersa</i> strain 5BJN1 16S ribosomal RNA gene	546	F06	6	83
91	C1			<i>Bacillus licheniformis</i> (86%)	547	F07	6	89
91	E1	301131554	HM161869.1	<i>Pantoea dispersa</i> strain 5BJN1 16S ribosomal RNA gene	548	F08	6	78
91	E4	269115799	GU167978.1	<i>Bacillus cereus</i> strain NK1 16S ribosomal RNA gene	549	F09	6	98
91	G6	268637401	GU143908.1	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y18-04 16S ribosomal RNA gene	550	F10	6	80
92	D2			<i>Bacillus megaterium</i>	551	F11	6	87
92	D5	183230083	EU594560.1	<i>Bacillus flexus</i> strain 4-1 16S ribosomal RNA gene	552	F12	6	86
92	F4			<i>Bacillus megaterium</i>	553	G01	6	93
92	G4			<i>Bacillus megaterium</i>	554	G02	6	87
93	D4	297251359	HM055951.1	<i>Bacillus cereus</i> strain MB-9 16S ribosomal RNA gene	555	G03	6	79
93	D7			Secuencia no encontrada !!!	556	G04	6	82
93	D8			<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	557	G05	6	76
93	A11	297251359	HM055951.1	<i>Bacillus cereus</i> strain MB-9 16S ribosomal RNA gene	558	G06	6	90
94	A6			PENDIENTE	559	G07	6	96
94	B1			PENDIENTE	560	G08	6	88
94	B2			PENDIENTE	561	G09	6	85
94	B3			PENDIENTE	562	G10	6	91
94	B4			PENDIENTE	563	G11	6	88
94	B6			PENDIENTE	564	G12	6	91
94	C1			PENDIENTE	565	H01	6	86
94	C5			PENDIENTE	566	H02	6	92
94	D5			PENDIENTE	567	H03	6	94
94	D9			PENDIENTE	568	H04	6	89
94	D11			PENDIENTE	569	H05	6	89

94	E3		PENDIENTE	570	H06	6	90
94	E4		PENDIENTE	571	H07	6	92
94	G5		PENDIENTE	572	H08	6	90
95	B5		<i>Enterobacter cloacae</i> strain C111	573	H09	6	89
95	B8		<i>Enterobacter cloacae</i>	574	H10	6	87
95	C6	310751488 HQ407286.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain C111	575	H11	6	91
95	E8		<i>Enterobacter cloacae</i>	576	H12	7	84
95	F2		<i>Bacillus subtilis</i>	577	A01	7	85
95	G10		<i>Enterobacter cloacae</i>	578	A02	7	86
96	A3		<i>Enterobacter cloacae</i>	579	A03	7	88
96	A4	310751489 HQ407286.2	<i>Enterobacter cloacae</i> strain C111	580	A04	7	89
96	C4		<i>Enterobacter sp.</i> (99%)	581	A05	7	89
96	D2		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (94%)	582	A06	7	89
96	D4	310751488 HQ407286.1	<i>Enterobacter cloacae</i> strain C111	583	A07	7	88
96	H3		Secuencia no encontrada !!!	584	A08	7	92
96	G9		<i>Bacillus subtilis</i>	585	A09	7	88
97	C5		<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	586	A10	7	88
97	D1		<i>Bacillus cereus</i>	587	A11	7	87
97	F4		Secuencia no encontrada !!!	588	A12	7	90
98	G5		<i>Enterobacter ludwigii</i> (99%)	589	B01	7	90
99	A4		PENDIENTE	590	B02	7	75
99	A7		PENDIENTE	591	B03	7	76
99	A10		PENDIENTE	592	B04	7	74
99	B2		PENDIENTE	593	B05	7	88
99	D8		PENDIENTE	594	B06	7	74
99	E8		PENDIENTE	595	B07	7	59
99	E4		PENDIENTE	596	B08	7	89
99	G5		PENDIENTE	597	B09	7	93
100	D3		PENDIENTE	598	B10	7	93
101	A8		<i>Bacillus cereus</i> (88%)	599	B11	7	66
101	B6		Secuencia no encontrada !!!	600	B12	7	69
101	F4		Secuencia no encontrada !!!	601	C01	7	75
101	F9		Secuencia no encontrada !!!	602	C02	7	79
102	A3	113196068 DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> strain BAC-B2 16S ribosomal RNA gene	603	C03	7	70
102	E1		<i>Bacillus megaterium</i> (99%)	604	C04	7	72

102	E3	290463983	GU434357.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain GHt1-7 16S ribosomal RNA gene	605	C05	7	79
102	F8			<i>Bacillus megaterium</i> (95%)	606	C06	7	60
103	B7			PENDIENTE	607	C07	7	60
103	F1			PENDIENTE	608	C08	7	70
103	G4			PENDIENTE	609	C09	7	60
104	A1			PENDIENTE	610	C10	7	85
104	A2			PENDIENTE	611	C11	7	95
104	A7			PENDIENTE	612	C12	7	70
104	C3			PENDIENTE	613	D01	7	63
104	C11			PENDIENTE	614	D02	7	72
104	G1			PENDIENTE	615	D03	7	81
104	G5			PENDIENTE	616	D04	7	60
105	A6			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99%)	617	D05	7	70
105	B6			<i>Pseudomonas putida</i> (99%)	618	D06	7	60
105	C4	197349214	EU988836.1	Uncultured bacterium clone Phil_g32 16S ribosomal RNA gene	619	D07	7	74
105	D4			Secuencia no encontrada !!!	620	D08	7	60
105	E8	284822137	GU361624.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 098-09 16S ribosomal RNA gene	621	D09	7	81
105	G5			<i>Pseudomonas putida</i> (92%)	622	D10	7	76