



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



Efectividad de bacterias nodulares y de la rizósfera
en el control biológico del hongo fitopatógeno
Macrophomina phaseolina en el cultivo de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.).

TESIS

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

PRESENTA

YOLANI DE JESÚS BOJÓRQUEZ ARMENTA

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO ENERO DE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 09 de diciembre del año 2019, el que suscribe Yolani De Jesús Bojórquez Armenta alumna del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente, con número de registro A180508, adscrito al CIIDIR Unidad Sinaloa, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Drs. Juan Carlos Martínez Álvarez y Guadalupe Arlene Mora Romero, y cede los derechos del trabajo titulado “Efectividades bacterias nodulares y de la rizósfera en el control biológico del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)”, 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 directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones yolaniba09@gmail.com; jcmartinezal@ipn.mx y arlenemora@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Yolani De Jesús Bojórquez Armenta



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

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



Ciudad de México, a 11 de mayo del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión Ordinaria No. 5 celebrada el día 03 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Bojórquez Armenta Yolani de Jesús
Apellido paterno Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

A	1	8	0	5	0	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría
en Recursos Naturales y
Medio Ambiente

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Efectividad de bacterias nodulares y de la rizosfera en el control biológico del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Obtención de colecciones de bacterias presentes en nódulos y en la rizosfera del frijol (*Phaseolus vulgaris*) para evaluar el potencial de antagonismo *in vitro* e *in planta* de las mismas contra el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Se identificará molecularmente los aislados que presenten potencial inhibitorio contra el patógeno y, finalmente, se analizará la expresión de los genes *PvLOX2*, *PvLOX6*, *PvMYC2*, *PvPDF1.2*, *PvMMPK3* y *PvMMPK4*, que están relacionados con las rutas de defensa a patógeno en planta

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez y Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-Unidad Sinaloa que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

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. Juan Carlos Martínez Álvarez
Aspirante

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Presidente del Colegio

Yolani De Jesús Bojórquez
Armenta

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal
CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: para examinar la tesis titulada: por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Bojórquez	Apellido Materno:	Armenta	Nombre (s):	Yolani De Jesús
-------------------	-----------	-------------------	---------	-------------	-----------------




Número de registro:

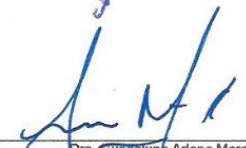
Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes:

Satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

Comisión Revisora de Tesis

 _____ Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez Director de Tesis 12418-EA-17 Profesor Colegiado	 _____ Dra. Melina López Meyer 13298-EF-18 Profesor Colegiado	 _____ Dra. Claudia Castro-Martínez 12304-EC-16 Profesor Colegiado
---	---	--

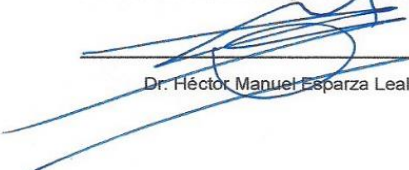


Dra. Guadalupe Ariene Mora Romero
2º Director de Tesis
Profesor Investigador de Tiempo Completo UAdeO



Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez
Profesor Investigador de Tiempo Completo UAdeO

Presidente del Colegio de Profesores



Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioenergéticos en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez y la Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero. Para la realización de este proyecto se recibió financiamiento por parte del proyecto SIP20196294. La autora de este trabajo agradece al CIIDIR Sinaloa por su apoyo en infraestructura para la realización de la presente investigación, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) e IPN por el apoyo económico brindado a través de su sistema de becas.

DEDICATORIA

A mis padres **Yolanda Armenta** y **Jesús Bojórquez**.

Como muestra de amor y profundo agradecimiento por todo el sacrificio, apoyo y esfuerzo empleado en mi formación. Gracias papás por brindarme la oportunidad de cumplir otra más de mis grandes metas, tengan siempre presente, que cada logro mío, también es de ustedes.

Con cariño y admiración para mis grandes amores.

AGRADECIMIENTOS

- ▶ Al CIIDIR-IPN Sinaloa, por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de maestría.
- ▶ A mis directores de tesis por su gran asesoría durante este trayecto. Gracias Dr. Juan Carlos Martínez y Dra. Arlene Mora por su paciencia, confianza, amistad y, sobre todo, por su excelente orientación en mi formación académica. Agradezco cada palabra de motivación brindada en mis malos momentos y sus oportunos consejos para mi superación profesional. No pude haber sido más afortunada al contar con asesores como ustedes.
- ▶ A mi comité tutorial y revisor por sus valiosas sugerencias y contribución a mi formación en el programa de posgrado, Dra. Melina López Meyer, Dra. Claudia Castro y Dr. Jesús Damián Cordero.
- ▶ A los laboratorios de Interacción Microorganismo-Planta y Ecología Molecular de la Rizósfera, dirigidos por los doctores Melina e Ignacio Maldonado y a todo su equipo de trabajo por su apoyo y colaboración en el presente estudio.
- ▶ A mis compañeros del Laboratorio de Bioenergéticos por su ayuda y momentos divertidos compartidos.
- ▶ A todos mis compañeros de maestría, que nos apoyamos, sufrimos y reímos juntos durante nuestras clases y experiencias en el posgrado.
- ▶ A mis pilares de apoyo en la maestría, compañeros de aventuras, momentos de estrés, locuras, tristezas, alegrías y logros, mis amigos, David, Carmen, Eduardo, Ana Karen, Marlenne, Ismael, Arantxa, Maury, Romina, Daniela. Los aprecio mucho chicos, gracias por todo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. El cultivo de frijol; su importancia en México y en Sinaloa.	3
2.2. La rizósfera y las interacciones planta-microorganismo.....	5
2.3. <i>Macrophomina phaseolina</i>	7
2.3.1. Importancia del hongo fitopatógeno <i>M. phaseolina</i> en cultivos de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	9
2.4. Métodos utilizados en el control de enfermedades y daños causados por fitopatógenos.	10
2.5. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en el control biológico de fitopatógenos.	12
2.5.1. Clasificación de PGRP según su mecanismo de acción.	13
2.6. Biocontrol de <i>M. phaseolina</i> mediante el uso de PGPR.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general.	20
4.2. Objetivos específicos.	20
5. HIPÓTESIS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Obtención de muestras	21
6.2. Aislamiento de bacterias nodulares.....	21
6.3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera.....	22
6.4. Prueba de hemólisis.....	22
6.5. Reactivación del patógeno.	23
6.6. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	23
6.7. Pruebas para la detección de posibles mecanismos de actividad antagónica. 24	
6.7.1. Posibles mecanismos de antagonismo <i>in vitro</i>	24
6.8. Pruebas para la detección de posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.....	26
6.8.1. Capacidad de solubilización de fosfatos.....	26
6.8.2. Producción de sideróforos.	27
6.8.3. Producción de ácido indolacético (AIA).	27

6.9.	Formulación líquida de aislados rizosféricos y nodulares.	28
6.9.1.	Establecimiento de consorcios microbianos.	28
6.9.2.	Formulación.	29
6.9.3.	Prueba de viabilidad post formulación.	29
6.9.4.	Vida de anaquel de la formulación.	30
6.9.5.	Pruebas de eficacia <i>in vitro</i> del formulado en el control de <i>M. phaseolina</i> . 30	
6.10.	Pruebas de antagonismo <i>in planta</i>	30
6.10.1.	Estandarización de la metodología para la producción de inóculo bacteriano.	30
6.10.2.	Estandarización de la metodología para la producción de inóculo fúngico. 31	
6.10.3.	Escala de patogenicidad de <i>Macrophomina phaseolina</i> en plantas de frijol. 33	
6.10.4.	Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i>	33
6.11.	Identificación molecular de los aislados bacterianos seleccionados.	35
6.12.	Identificación molecular del aislado de <i>Macrophomina phaseolina</i>	37
7.1.	Colección de bacterias nodulares y de la rizósfera de plantas de frijol.	38
7.2.	Bioensayo de antagonismo <i>in vitro</i> de aislados bacterianos contra <i>M. phaseolina</i>	39
7.3.	Mecanismos de antagonismo <i>in vitro</i>	40
7.4.	Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.	43
7.4.1.	Solubilización de fosfato.	43
7.4.2.	Producción de sideróforos.	43
7.4.3.	Producción de ácido indol acético.	44
7.5.	Formulación líquida de aislados bacterianos.	45
7.5.1.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de la formulación en el control de <i>M. phaseolina</i>	48
7.6.	Pruebas de antagonismo <i>in planta</i>	49
7.6.1.	Producción de inóculo bacteriano para pruebas <i>in planta</i>	49
7.6.2.	Escala de severidad de <i>M. phaseolina</i> en plantas de frijol.	54
7.6.3.	Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i> de aislados bacterianos contra <i>M. phaseolina</i>	58
7.7.	Identificación molecular de los aislados bacterianos.	63
7.8.	Identificación molecular del hongo <i>M. phaseolina</i>	64
8.	DISCUSIONES	65

8.1.	Colección microbiana de aislados rizósfericos y nodulares.	65
8.2.	Efecto antagónico <i>in vitro</i> de la colección microbiana.	67
8.3.	Mecanismos de antagonismo in vitro y pruebas bioquímicas.	68
8.4.	Efecto antagónico en la interacción tripartita Planta-Bacteria-M. phaseolina. 70	
8.5.	Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos y nodulares..	74
8.6.	Identificación molecular de la cepa de <i>M. phaseolina</i>	75
9.	CONCLUSIONES	77
10.	PERSPECTIVAS	78
11.	BIBLIOGRAFÍA	79
12.	ANEXOS	98

GLOSARIO

Actinobacteria. Procariotas de mayor valor económico y biotecnológico y son responsables de la producción de metabolitos secundarios bioactivos , especialmente antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores y enzimas.

Antagonismo. Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos, como la acción de los antibióticos frente a las bacterias.
Antibiosis

Antibiótico. Toxinas de bajo peso molecular producidas por la comunidad bacteriana que pueden matar y / o envenenar a otros microbios.

Biocontrol. Método ecológico y eficaz para reducir o mitigar las plagas y los efectos de las plagas y enfermedades mediante el uso de enemigos naturales.

Bioelicitador. Metabolito secundario producido por las plantas como respuesta fisiológica y morfológica a factores microbianos, físicos o químicos.

Biofungicida. Producto o sustancia a base de organismos vivos o de sus metabolitos utilizada para inhibir el crecimiento de hongos.

Biosurfactante. Compuestos anfifílicos que pueden causar citólisis al interactuar con las membranas de microorganismos dañinos.

Compuesto volátil. Compuesto orgánico volátil que puede ser producido por microorganismos en su metabolismo primario o secundario.

Conidio. Espora que se origina de una hifa especial (conidióforo) por la formación de un tabique delimitador.

Consorcio microbiano. Asociación natural de dos o más especies que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás.

Criopreservación. Método donde se utilizan bajas temperaturas con el fin de preservar las estructuras intactas de las células vivas.

Curva de crecimiento. Representación del logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo.

Endófitos. Bacterias u hongos que viven dentro de una planta, dentro de espacios intercelulares o haces vasculares sin dañar al huésped y a menudo lo benefician.

Endospora. Estructura latente, resistente y no reproductiva producida por ciertas bacterias.

Enfermedad. Deterioro del estado normal de una planta que interrumpe o modifica sus funciones vitales.

Etiológico. Que causa o es la fuente de algo.

Filiforme. Que tiene forma o apariencia de hilo.

Fitohormonas. Pequeñas moléculas orgánicas o sustancias que influyen en los procesos fisiológicos de las plantas a concentraciones muy bajas.

Fitopatógeno Organismo que causa enfermedad en una planta.

Flavonoides. Grupo de sustancias naturales con estructuras fenólicas variables.

Fusiforme. De forma de huso.

Halotolerante. Tolerancia al estrés iónico, o la capacidad de un organismo para crecer a concentraciones de sal superiores a las requeridas para el crecimiento.

Hemolísis. Evento que provoca la liberación de hemoglobina en la sangre debido a la lisis de los glóbulos rojos.

Hifa. Tipo de célula filamentosa ramificada que conforma el micelio de un hongo.

Hospedero. Organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de parásito, un comensal o un mutualista.

Incidencia. Número de unidades de plantas que están (visiblemente) enfermas, generalmente en relación con el número total evaluado

Inóculo. Cantidad de material que contiene microorganismos utilizada para iniciar un cultivo.

Lipopéptido. Compuestos tensioactivos de péptidos y ácidos grasos.

Metabolito secundario.

Micelio. Talo de los hongos, formado comúnmente de filamentos muyramificados y que constituye el aparato de nutrición de estos seres vivos.

Microesclerocio. Estructura de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos.

Nativo. Especie que se encuentra en cierto ecosistema debido a procesos naturales, como la distribución natural y la evolución.

Necrosis. Degeneración de un tejido por muerte de sus células.

Nódulo. Órgano inducido en la mayoría de las especies de plantas leguminosas por bacterias simbióticas que fijan el N₂.

Oomiceto. Protista filamentos y unicelular que se parece morfológicamente a los hongos.

Patogénesis. Origen y desarrollo de las enfermedades.

Patogenicidad. Capacidad absoluta de un agente infeccioso para causar enfermedad o daño en un huésped.

PGPR. Bacteria promotora de crecimiento vegetal (Plant Growth Promotion Rhizobacteria)

Picnidio. Cuerpo fructífero asexual, esférico o en forma de botella, que en su interior contiene conidióforos y conidios.

Quelante. Compuesto químico cuya estructura permite la unión de sus dos o más átomos donadores (o sitios) al mismo ion metálico simultáneamente y producen uno o más anillos.

Resistencia sistémica adquirida. Mecanismo de defensa inducida que confiere protección duradera contra un amplio espectro de microorganismos.

Resistencia sistémica inducida. Mecanismos en el que se genera un estado de mayor capacidad defensiva en una planta estimulada por inductores de origen biótico y no biótico.

Rizobacteria. Bacteria asociada a la raíz de plantas.

Rizoplano. Zona directamente adyacente a la raíz, incluida la epidermis y el mucílago de la raíz.

Rizósfera. Área alrededor de la raíz de una planta que está habitada por una población única de microorganismos influenciados por los químicos liberados por las raíces de la planta.

Severidad. Estimación visual en la cual se establecen grados de infección en una determinada planta, sobre la base de la cantidad de tejido vegetal enfermo.

Sideróforo. Metabolito secundario producido por diferentes organismos para eliminar el hierro de su entorno, haciendo que este elemento esencial esté disponible para la célula.

Signo. Es la expresión visible (a simple vista o bajo lupa con un máximo de 10 aumentos) del patógeno.

Simbiosis. Asociación estrecha entre dos o más organismos, donde existe un beneficio mutuo.

Síntoma. Manifestación reveladora de una enfermedad.

Solubilización. Proceso de preparación de una solución isotrópica termodinámicamente estable de una sustancia (normalmente insoluble o escasamente soluble en un disolvente dado) mediante la incorporación de uno o más componentes anfifílicos adicionales

Toxina. Sustancia venenosa de origen microbiano, vegetal o químico sintético que reacciona con componentes celulares específicos para matar células, alterar el crecimiento o desarrollo o destruir el organismo.

Viabilidad. Capacidad de continuar existiendo o desarrollarse como un ser vivo
Vida de anaquel.

Xenobiótico. Sustancias extrañas o productos químicos exógenos que el cuerpo no reconoce.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y signos de <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	8
Figura 2. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> mediante cultivo dual bacteria-hongo....	40
Figura 3. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>M. phaseolina</i> mediante compuestos volátiles en placa dividida.....	42
Figura 4. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>M. phaseolina</i> mediante compuestos volátiles en cámara sellada..	42
Figura 5. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>M. phaseolina</i> mediante compuestos no volátiles..	43
Figura 6. Pruebas de solubilización de fosfatos.	44
Figura 7. Prueba de producción de sideróforos.....	44
Figura 8. Producción de AIA en escala colorimétrica.	45
Figura 9. Concentraciones de AIA producidas por los aislados bacterianos.	45
Figura 10. Ensayo de compatibilidad de los aislados.....	46
Figura 11. Vida de anaquel de las formulaciones.....	48
Figura 12. Eficacia <i>in vitro</i> de las formulaciones en el control de <i>M. phaseolina</i>	49
Figura 13. Curvas de crecimiento de los aislados BN20 (A) , BA97 (B) , BN17 (C) y BN1 (D)	51
Figura 14. Curvas de crecimiento de los aislados BR20 (A) , BA93 (B) , BN4 (C) y BA100 (D)	52
Figura 15. Estructuras de <i>M. phaseolina</i>	53
Figura 16. Bioensayo de patogenicidad de <i>M. phaseolina</i>	54
Figura 17. Resultados de escala de severidad de <i>M. phaseolina</i> en plantas de frijol.	55
Figura 18. Nivel 0 de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	56
Figura 19. Nivel 1 de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	56
Figura 20. Nivel 2 de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	56
Figura 21. Nivel 3 de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	57
Figura 22. Nivel 4 de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	57
Figura 23. Nivel de Escala de Severidad <i>M. phaseolina</i> en frijol.....	57
Figura 24. Bioensayo de antagonismo <i>in planta</i>	59

Figura 25. Longitud foliar del bioensayo tripartita.....	61
Figura 26. Longitud radical del bioensayo tripartita.. ..	61
Figura 27. Peso fresco foliar del bioensayo tripartita.....	61
Figura 28. Peso fresco radical del bioensayo tripartita.	62
Figura 29. Peso seco radical del bioensayo tripartita.	62
Figura 30. Peso seco foliar del bioensayo tripartita.	63
Figura 31. Relación filogenética entre los aislados bacterianos.	63
Figura 32. Árbol filogenético basado en las zonas 18S y 28S del ADN ribosomal del aislado fúngico Mp.	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	4
Cuadro 2. Bioensayo de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>M. phaseolina</i>	40
Cuadro 3. Mecanismos de antagonismo <i>in vitro</i> de los aislados BA97, BN17, BN20 y BR20.	41
Cuadro 4. Vida de anaquel de las formulaciones en diferentes condiciones de almacenamiento.	47
Cuadro 5. Actividad antagónica de las formulaciones a <i>M. phaseolina in vitro</i>	49
Cuadro 6. Curvas de crecimiento de aislados bacterianos.	50
Cuadro 7. Bioensayo de patogenicidad del inóculo de <i>M. phaseolina</i>	54
Cuadro 8. Agrupación de niveles de escala por tratamiento con <i>M. phaseolina</i>	59
Cuadro 9. Mecanismos de antagonismo <i>in vitro</i> y pruebas bioquímicas para la promoción vegetal.	69

RESUMEN

El frijol es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial. El hongo *Macrophomina phaseolina* es el agente causal de la pudrición carbonosa en este cultivo, el cual afecta a nivel de raíz, tallo y hojas en todas las etapas fenológicas de la planta. Debido a la naturaleza del hongo para formar estructuras de resistencia y ser altamente patogénico, el control químico no resulta una opción factible en el manejo de la enfermedad, por lo que el manejo integrado asociado al uso de técnicas de control biológico es una alternativa sustentable. El objetivo de este estudio fue aislar bacterias rizosféricas y de nódulos de frijol y analizar su potencial antagonista *in vitro* e *in planta* en el control biológico de *M. phaseolina*. Se obtuvo una colección de 39 aislados no hemolíticos, de los cuales 8 se identificaron como bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y presentaron potencial de antagonismo *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* con porcentajes de inhibición mayores a 50 %. Los aislados BN20 y BA97 inhibieron el crecimiento micelial en un 80 y 85 %. Se identificó que los aislados obtenidos emplean la producción de compuestos volátiles como mecanismo de antagonismo, mediante el establecimiento de pruebas en placa dividida. Los aislados BA97, BN20, BN17 y BR20 fueron capaces de inhibir al patógeno con porcentajes de 75, 62.5, 55 y 37.5 %, respectivamente. En lo relacionado a la promoción de crecimiento, los aislados no presentaron capacidad para producir sideróforos y solubilizar fosfatos, sin embargo, sí presentaron la capacidad de producir ácido indol acético en concentraciones de 11.31 a 22.07 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Por otra parte, para analizar el efecto sinérgico de los dos mejores microorganismos antagónicos, se realizaron formulados con las bacterias BN20 y BA97, en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración, donde se obtuvo efecto antagónico del hongo por parte de los formulados a los 7 y 21 días, con porcentajes de 55 y 52.5 (-4 °C) y 74 y 72 % (temperatura ambiente). En cuanto al efecto antagónico *in planta*, el aislado BN20 fue el que mostró mayor capacidad de reducir la severidad de la enfermedad en la interacción tripartita planta-bacteria-patógeno, con un índice de enfermedad del 34.28 %, ejerciendo un efecto de biocontrol del 55.50 %.

ABSTRACT

Common bean is one of the most important legumes worldwide. The fungus *Macrophomina phaseolina* is the causal agent of carbon rot in this crop, which affects roots, stem and leaves in all the phenological stages of the plant. Due to the nature of the fungus to form resistance structures and be highly pathogenic, chemical control is not a feasible option in disease management, so integrated management associated with the use of biological control techniques is a sustainable alternative. The aim of this study was to isolate rhizospheric bacteria and bacteria from common bean nodules and analyze their antagonistic potential *in vitro* and *in plant* in the biological control of *M. phaseolina*. A collection of 39 non-hemolytic isolates was obtained, of which 8 were identified as bacteria belonging to the genus *Bacillus* and potential for *in vitro* antagonism against *Macrophomina phaseolina* with inhibition percentages greater than 50%. BN20 and BA97 isolates inhibited mycelial growth by 80 and 85%. It was identified that the isolates use the production of volatile compounds as a mechanism of antagonism, through the establishment of tests on split plate. Isolates BA97, BN20, BN17 and BR20 were pathogen inhibitors with percentages of 75, 62.5, 55 and 37.5%, respectively. With regard to the promotion of growth, the isolates do not have the capacity to produce siderophores and solubilize phosphates, however, they do have the capacity to produce indole acetic acid in compounds of 11.31 to 22.07 μM / mL. On the other hand, to analyze the synergistic effect of the two best antagonistic microorganisms, formulated with the bacteria BN20 and BA97 were analyzed, in storage conditions at room temperature and in refrigeration, where the antagonistic effect of the fungus was achieved by those formulated at 7 and 21 days, with percentages of 55 and 52.5 (-4°C) and 74 and 72% (room temperature). Regarding the antagonistic effect in plant, the BN20 isolate was the one that selected the greatest capacity to reduce the severity of the disease in the tripartite plant-bacteria-pathogen interaction, with a disease rate of 34.28%, exerting a biocontrol effect from 55.50%.

1. INTRODUCCIÓN

La principal actividad económica de Sinaloa es la agricultura. Según SIAP en el 2018, el Estado de Sinaloa cultivó 1 millón 43 mil 631 hectáreas, las cuales produjeron 11 millones 147 mil 584 toneladas de alimentos con un valor de producción de 52, 802, 647 millones de pesos. Entre los principales productos hortícolas que se cultivan en el estado de Sinaloa, se encuentra el frijol. Durante el año agrícola 2018, se cosecharon 96 mil 390 hectáreas de esta leguminosa, de las cuales se obtuvieron más de 170 toneladas, lo cual coloca al estado como el segundo productor de frijol a nivel nacional (SIAP-SAGARPA, 2018).

La producción de frijol se ve reducida por la presencia de diversos patógenos, dentro de los que destacan bacterias como *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, virus (VMC) y diversos hongos (SAGARPA, 2015). Dentro de los hongos del suelo que efectúan impactos negativos en la productividad del frijol en Sinaloa, destaca el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* por su potencial destructivo, causando la pudrición carbonosa del frijol; que afecta a la semilla, plántulas y plantas en desarrollo a nivel de raíz, tallo y hojas (Apodaca-Sánchez, 2006).

La mayoría de las estrategias para el combate de este patógeno se basan en el control preventivo y monitoreo, así como también en el uso de fungicidas que se aplican cuando los primeros signos y síntomas comienzan a ser visibles, pero cuyo efecto no minimiza el crecimiento del patógeno, siendo su aplicación un gasto innecesario para el productor, un riesgo para la microbiota del suelo y para el ambiente en general. Ante esta problemática surge la necesidad de buscar alternativas sustentables, como el control biológico, que brinden una opción en el manejo integrado de enfermedades.

Algunos microorganismos que habitan en la rizósfera pueden ser aislados y utilizados en pro de los sistemas agrícolas, principalmente aquellos que promueven el crecimiento vegetal (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018). Estos microorganismos, asociados a las raíces de las plantas, facilitan el desarrollo de las mismas disminuyendo las dosis

de insumos necesarios para un rendimiento rentable y de calidad (Etesami y Maheshwari, 2018).

La producción de agrobiológicos microbianos, pudiera brindar una solución asequible para el productor y ser beneficioso para el ambiente. En un área agrícola tan productiva, como la zona norte de Sinaloa, es de suma importancia tener conocimiento sobre los microorganismos presentes en el suelo y rizósfera para poder buscar organismos con potencial para ser utilizados en el control de enfermedades. En el presente proyecto de investigación se llevó a cabo el aislamiento y evaluación de aislados de bacterias nativas provenientes de nódulos y rizósfera del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que mostraron potencial inhibitorio *in vitro* e *in planta* contra el patógeno de raíz de frijol *M. phaseolina*.

2. ANTECEDENTES

2.1. El cultivo de frijol; su importancia en México y en Sinaloa.

La familia de las leguminosas es un grupo de plantas importantes a nivel mundial por ser fuente considerable de proteínas (Carbonaro *et al.*, 2015), así como también por su capacidad de establecer relaciones simbióticas con organismos fijadores de nitrógeno (Pérez-Montaña, *et al.*, 2014). Dentro de estas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*), es una de las especies que más se cultivan en el mundo y cuyo consumo aporta un alto contenido de proteínas, ácido fólico, fibra dietética, minerales y carbohidratos complejos (FAO, 2018).

Taxonómicamente, el frijol común pertenece al reino Plantae y a la familia de las Fabaceas (Cuadro 1) (USDA, 2019). De acuerdo con Fernández y colaboradores (1986), el ciclo biológico de la planta de frijol conlleva dos fases sucesivas: iniciando con la fase vegetativa, que incluye la germinación de la semilla y la formación de hojas, para consecuentemente, dar paso a la fase reproductiva donde existe diferenciación de yemas florales, el desarrollo y maduración de vainas para la formación de semillas.

El frijol es un cultivo adaptado a una gran variedad de hábitats; sin embargo, su crecimiento en los campos se ve afectado por factores bióticos como algunas plagas y enfermedades, y por factores abióticos como el estrés por sequía, así como por la baja disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el suelo. (Schwartz y Pastor Corrales, 1989; Pérez-Moreno, 1995; Rao, 2001; Mayek-Pérez *et al.*, 2002).

Por su parte, México, es considerado como uno de los centros de origen de varios tipos de frijol del género *Phaseolus*, entre ellos, el que más destaca por su valor comercial es *Phaseolus vulgaris* (frijol común) por su amplia adaptación y por el número de variedades mejoradas disponibles. El cultivo de frijol, se cosecha prácticamente en todas las regiones y condiciones climáticas y edafológicas de México. Dentro de los factores que determinan una alta tasa de producción del cultivo, el clima y la disponibilidad de agua son los más destacados, ya que las principales

regiones productoras de esta leguminosa se caracterizan por presentar niveles bajos de precipitación pluvial (Panorama Agroalimentario Frijol, 2016).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Clasificación Taxonómica de <i>Phaseolus vulgaris</i>.	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Género:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

El frijol, representa un cultivo clave en la dieta nacional; se estima que el consumo anual per cápita de esta leguminosa es de 10.2 kg y donde la producción nacional abarca los requerimientos de consumo de los mexicanos aproximadamente en su totalidad. Según estadísticas de SIAP-SAGARPA, en el 2018 se generaron 1.08 millones de toneladas de semillas de frijol, que cubrieron el 89.24% del consumo nacional.

Debido a su importancia económica y social, el frijol es un producto estratégico del desarrollo del sector agrícola del país, factor que lo posiciona como el cuarto cultivo más importante por la superficie sembrada en México, después del maíz, sorgo y el trigo (SIAP-SAGARPA, 2018). Las variedades de frijol más consumidas son mayocoba, peruano, flor de mayo y flor de junio, garbancillo, manzano, negro San Luis, negro Querétaro y pinto. Siendo los principales estados productores: Zacatecas, Durango, Sinaloa, Chihuahua y Chiapas (Panorama Agroalimentario Frijol, 2016).

Sinaloa ocupa el segundo lugar en producción de frijol a nivel nacional. En el año agrícola 2018, se cosecharon 96 mil 390 hectáreas, de las cuales se obtuvo una producción de 173, 991 toneladas, correspondientes al 42.5 % de la producción total del país (SIAP-SAGARPA, 2018).

Frecuentemente, en el alcance de altos niveles de producción y competitividad en el mercado, los cultivos de frijol pueden verse afectados por diversos factores que limitan su productividad, como lo es la presencia de organismos patógenos, la deficiencia nutricional del cultivo, las limitaciones de agua, el uso excesivo de fertilizantes químicos y otros factores abióticos. Las enfermedades que afectan al frijol son causadas por virus, bacterias, nematodos, hongos y oomycetos. Entre éstas se destacan las infecciones por la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*), el mosaico común del frijol (VMC), el tizón del halo (*Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*), la roya (*Uromyces appendiculants var. appendiculatus*), el tizón común del frijol (*Xanthomonas campestris pv. phaseoli*), la cenicilla polvorienta del frijol (*Erysiphe polygoni* DC ex Merat) y la pudrición de la raíz del frijol (*Rhizoctonia spp.*, *Fusarium spp.*, *Pythium spp.* y *Macrophomina phaseolina*) (SAGARPA, 2015). Sin embargo, las enfermedades ocasionadas por hongos son las que se consideran de mayor importancia debido a que causan daños potencialmente severos, principalmente aquellos que provocan pudrición de la raíz (Reséndiz Arvizu, 2009).

2.2. La rizósfera y las interacciones planta-microorganismo.

La rizósfera, fracción de suelo de aproximadamente 1 mm que rodea a las raíces de las plantas, es un área biológicamente activa, ya que representa un punto crítico para la transformación biogeoquímica del proceso de formación del suelo, el ciclo del carbono, fósforo, nitrógeno, azufre y en la productividad final de los ecosistemas (Zhalnina, *et al.*, 2018; Cardoso y Freitas, 1992). Dichos procesos se llevan a cabo en la rizósfera, debido a que los exudados de las raíces de las plantas, como aminoácidos y azúcares, proporcionan una rica fuente de nutrientes, lo cual hace que esta zona esté asociada con una mayor abundancia y actividad bacteriana en comparación con las comunidades de microorganismos de otras zonas del suelo (Chauhan *et al.*, 2015).

Mediante pruebas moleculares se ha estimado que en la rizósfera habitan aproximadamente 4, 000 especies microbianas por gramo de suelo (Montecinos, 2003).

Las interacciones más importantes que se desarrollan en la rizósfera se pueden clasificar en tres grupos principales (Mhlongo *et al.*, 2018):

- Interacciones planta-planta: Efectuadas tanto en los sistemas radicales como en las partes aéreas, por medio de la secreción de moléculas señalizadoras, ya sea exudados de raíz o compuestos volátiles, entre otros. Este tipo de interacción puede resultar en una competencia por nutrientes o en un intercambio de señales de importancia a nivel poblacional.
- Interacciones microorganismo-planta, donde los microorganismos establecen relaciones simbióticas con las plantas secretando moléculas que desencadenan cambios específicos en las plantas, ya sean perjudiciales o beneficiosas para estas últimas.

A la par, las interacciones microorganismo-planta pueden organizarse en tres grupos básicos (Whipps, 2001):

- a) Interacción neutra, en donde ninguno de los organismos (planta y microbio) obtiene algún beneficio o daño directo de la interacción con el otro.
- b) Interacción positiva, que hace referencia a la interacción simbiótica en donde ambos organismos obtienen un beneficio.
- c) Interacciones negativas, cuyo resultado es la generación de una enfermedad.

Interacciones microorganismo-microorganismo, que incluyen procesos en donde los organismos interactúan entre sí para co-infectar o servir ambos como agentes benéficos (sinergismo) y, por otra parte, pueden llevar a cabo actividades de antagonismo (Bhattacharyya y Jha, 2012).

2.3. *Macrophomina phaseolina*.

El hongo *Macrophomina phaseolina*, es un fitopatógeno necrótrofo con amplia distribución mundial, que parasita más de 500 especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas pertenecientes a cerca de 100 familias distintas (Kunwar *et al.*, 1986; Mihail y Taylor, 1995), incluyendo varios cultivos importantes como frijol, soya, sorgo, maíz, alfalfa y algodón. *M. phaseolina* se encuentra comúnmente en países tropicales y subtropicales (Islam *et al.*, 2012; Shrivastava *et al.*, 2017).

M. phaseolina forma colonias con pigmentación oscura que varían de negro a café y gris, las cuales se tornan más oscuras conforme pasa el tiempo (Kaur *et al.*, 2012). Produce un micelio aéreo; microscópicamente presenta micelio ramificado con hifas pigmentadas, filiformes y septadas, que pueden tener ramificaciones secundarias. Los conidios son fusiformes, unicelulares, levemente curvos, puntiagudos en un extremo y redondeados en el otro (Figura 1). Por su parte, los picnidios tienen forma globosa y apariencia membranosa con coloración que va de gris a negro. El hongo forma estructuras de resistencia que se originan por agregación de hifas que producen cuerpos multicelulares denominados microesclerocios, los cuales morfológicamente son esféricos, rodeados de micelio, duros y de color negro; su tamaño varía de 50 a 150 μm (Figura 1). Estas estructuras permiten que el hongo se mantenga viable como inóculo en el suelo o en restos de tejido infectado por más de cuatro años. (Dhingra y Sinclair, 1978; Islam *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2012).

Por otra parte, el hongo *M. phaseolina*, suele crecer a una temperatura óptima de entre 30 y 37 °C y en ambientes con baja disponibilidad de agua. Temperaturas más bajas o más altas (por encima de los 40 °C y por debajo de los 10 °C), provocan bajos niveles de crecimiento (Dhingra y Sinclair, 1978). Se ha observado que la formación de microesclerocios ocurre en situaciones de estrés por nutrientes. Aunado a esto, *M. phaseolina*, se caracteriza por presentar gran variación a niveles morfológico, fisiológico, patogénico y genético entre aislamientos de diferentes regiones geográficas y según el tipo de hospedero (Muñoz-Cabañas *et al.*, 2005; Edraki y Banhashemi, 2010).

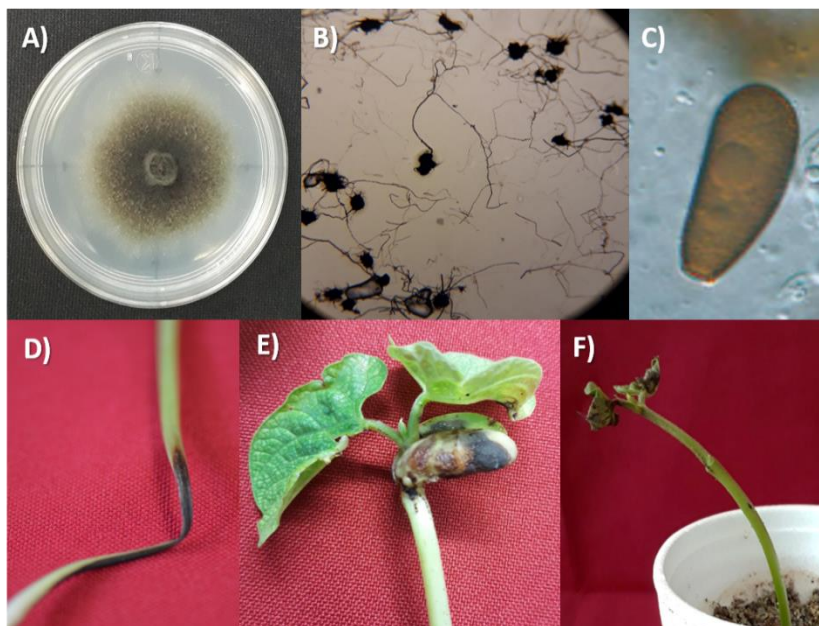


Figura 1. Síntomas y signos de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **A)** Cultivo de *Macrophomina phaseolina* en medio PDA; **B)** Sclerocios de *M. phaseolina*; **C)** Conidio maduro con pared verrugosa (Crous et al., 2006); **D-F)** Plantas de frijol con síntomas de pudrición carbonosa causada por *M. phaseolina*.

En torno a la patogénesis de este hongo en campo, se conoce que los esclerocios de *M. phaseolina* que se encuentran en el suelo, germinan en respuesta a señales del ambiente, como a la presencia de nutrientes y exudados de las raíces de las plantas, principalmente. Una vez que el micelio alcanza al hospedero, el hongo coloniza la superficie de la planta, donde las hifas desarrollan los órganos de fijación, llamados apresorios; secretan enzimas degradadoras de la pared celular y se inicia la invasión intra o intercelular del tejido correspondiente al córtex de la planta. El crecimiento ocurre en forma longitudinal, para posteriormente colonizar el sistema vascular, mismo que, termina siendo obstruido por el desarrollo de microesclerocios, que destruyen las células de la planta (Dhingra y Sinclair, 1978).

Por otra parte, *M. phaseolina* sintetiza enzimas hidrolíticas, como las principales enzimas involucradas en la degradación de la pared celular del proceso infeccioso, pero también produce otras enzimas como oxidasas, peroxidasas, amilasas, hemicelulasas, pectinasas, proteasas y fosfatidasas, así como algunas toxinas (ácido phaseolínico,

asperlina, isoasperlina, phomalactona, phomenon y phaseolinona), elementos que le confieren su alta patogenicidad (Islam *et al.*, 2012).

En este contexto, este fitopatógeno es el agente etiológico de varias enfermedades que afectan en gran medida a los cultivos de importancia agrícola, entre las que se encuentran, la pudrición de la corona, pudrición de la raíz, pudrición del cuello, pudrición del tallo y el ahogamiento o damping-off de las plántulas (Islam *et al.*, 2012). Una de las enfermedades más comunes y más agresivas causadas por este fitopatógeno, es la pudrición carbonosa (Sabaté *et al.*, 2017).

En suelos infestados por *M. phaseolina*, las tasas de germinación de semillas son muy bajas, y el porcentaje de plántulas que logra emerger presenta como primero síntomas de enfermedad, son lesiones oscuras sobre las raíces y cotiledones, que posteriormente se pueden extender a tallo y hojas. Cuando la enfermedad se encuentra en fases más avanzadas, los microesclerocios son visibles en las lesiones necróticas iniciales, lo cual origina la marchitez y pudrición de los tejidos (principalmente en raíz) y la muerte de la planta. Finalmente, el hospedero muerto funge como fuente de inóculo para el inicio de un nuevo ciclo infeccioso (Dhingra y Sinclair, 1978; Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Radwan *et al.*, 2014).

2.3.1. Importancia del hongo fitopatógeno *M. phaseolina* en cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

En *P. vulgaris*, la pudrición carbonosa, causada por *M. phaseolina* es una enfermedad que afecta a plántulas jóvenes; sin embargo, puede dañar la raíz en cualquier etapa del crecimiento. Dentro de los principales factores que benefician la colonización de *M. phaseolina* en su hospedero se encuentran las altas temperaturas y la baja disponibilidad de agua (Kaur *et al.*, 2012).

En México, *M. phaseolina* causa daños en cultivos de importancia económica como el frijol, así como en ajonjolí, soya, algodón, maíz, cucurbitáceas y sorgo (Díaz,

1992). En etapas tempranas del cultivo de frijol, *M. phaseolina* causa lesiones irregulares de color negro, hundidas y cercanas a la base de los cotiledones. Las lesiones se observan en todo el cotiledón y en el tallo de la plántula recién emergente, llegando a envolver los peciolo de las hojas primarias, estrangulando el tallo y provocando la muerte (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). Por otra parte, la sintomatología en hojas jóvenes se caracteriza por la aparición de manchas cloróticas cuando las lesiones del tallo son pequeñas y limitadas. En Plantas adultas, la infección afecta al sistema de transporte de agua, debido a la colonización del xilema con microesclerocios (Dhingra y Sinclair, 1972). De esta forma, los tallos muestran manchas negras, sucede la defoliación prematura y los frutos presentan poca turgencia (Campos, 1987). Consecuentemente, las plantas infectadas reducen su crecimiento y mueren sin producir semilla (Romero, 1988).

Dado que el patógeno es transmitido principalmente por el suelo y cuenta con alta capacidad saprófita, las estrategias para el control de la enfermedad no han sido del todo efectivas. En este sentido, se han buscado opciones para la prevención de esta enfermedad, como la identificación de variedades de frijol resistentes, el tratamiento de semillas con fungicidas, la irrigación continua para diseminar los inóculos en el suelo y la rotación de cultivos (Radwan *et al.*, 2014; Simonetti *et al.*, 2015). Sin embargo, en los últimos años, se han comenzado a utilizar prácticas de manejo de la enfermedad que se basan en estrategias más sustentables y sostenibles en la agricultura, lo que lleva a la búsqueda de alternativas respetuosas con el medio ambiente, reduciendo el uso de fertilizantes y pesticidas químicos (El-Bendary *et al.*, 2016; Sabaté *et al.*, 2017; Shrivastava *et al.*, 2017; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

2.4. Métodos utilizados en el control de enfermedades y daños causados por fitopatógenos.

En los últimos años, en la agricultura se han tratado de implementar técnicas de producción basadas en la sustentabilidad y sostenibilidad de la productividad agrícola. Desde tiempo atrás, el uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos

substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos han impactado significativamente al ambiente y a las mismas actividades agrícolas. La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos han reducido la biodiversidad en los agroecosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos, que ahora son más severas, entre otros efectos negativos. Además, la existencia de problemas de seguridad que evocan en efectos deletéreos en la salud pública relacionados a la fabricación e implementación de fertilizantes químicos ha conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo integrado de plagas y enfermedades de manera más sustentable (Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

Dentro de los métodos de control contra fitopatógenos en invernadero y en campo se encuentran los siguientes:

A) Control cultural, basado en programas de saneamiento, solarización, rotación de cultivos y uso de cultivares resistentes.

B) Control químico, mediante la aplicación de fungicidas químicos, como el bromuro de metilo, para el control de plagas (Duniway, 2002 en Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Existen reportes de que la aplicación prolongada de estos compuestos causa graves problemas medioambientales y en la salud de las personas encargados de aplicarlo (Martínez-Valenzuela, 2007).

C) Control biológico, con el uso de organismos benéficos pueden actuar como antagonistas, parásitos, promotores del crecimiento vegetal o inductores de mecanismos de resistencia (Bhattacharyya y Jha, 2012; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

2.5. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en el control biológico de fitopatógenos.

En la rizósfera, existe una variedad de bacterias asociadas a las raíces comúnmente denominadas rizobacterias. Estas bacterias benéficas, que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas se denominan bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés *Plant Growing Promotion Rhizobacteria*). Kloepper y Schoroth en 1978, acuñaron el término PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) y desde entonces ha estado apareciendo cada vez más en publicaciones de todo el mundo. Las PGPR son organismos de vida libre y se pueden definir como la parte indispensable de la biota de la rizósfera que, cuando se cultiva en asociación con las plantas hospedadoras, mediante múltiples mecanismos, puede estimular el crecimiento vegetal garantizando la disponibilidad y absorción de ciertos micro y macronutrientes. Simultáneamente, las PGPR pueden brindar protección a las plantas y mantenerlas sanas actuando como agentes de biocontrol contra patógenos incluidos hongos, virus e insectos, de manera directa o indirecta (Chauhan *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2015; Jha y Saraf, 2015; Jaisingh *et al.*, 2016; Khan y Bano, 2016; Tabassum *et al.*, 2017; Alijani *et al.*, 2019).

Las rizobacterias pueden establecerse en el ecosistema del suelo debido a su alta adaptabilidad en gran variedad de entornos, mayor velocidad de crecimiento y versatilidad bioquímica para metabolizar una amplia gama de compuestos xenobióticos y naturales (Etesami y Maheshwari, 2018). Cook, en el 2002, infirió que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son un componente significativo en el manejo de prácticas agrícolas con potencial genético innato.

La investigación sobre las PGPR ha incrementado durante los últimos años debido a la necesidad de desarrollar prácticas agrícolas ecológicas y sostenibles para alimentar a una población en constante crecimiento. En vista del uso indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas químicos que presentan resultados contraproducentes sobre el medio ambiente, es transcendental establecer alternativas donde se lleven a

cabo mejores prácticas de gestión de los cultivos para reducir el uso de agroquímicos (Chauhan *et al.*, 2015).

Las PGPR incluyen múltiples géneros de bacterias del suelo, que estimulan el crecimiento y desarrollo de plantas en cuya rizósfera permanecen asociadas la mayor parte de su ciclo de vida (Saharan y Nehra, 2011; Pandey *et al.*, 2012). La clasificación de las PGPR se lleva a cabo de acuerdo a su tipo de interacción, existen bacterias extracelulares promotoras del crecimiento de plantas (por sus siglas en inglés, ePGPR) y bacterias intracelulares promotoras del crecimiento de las plantas (iPGRP) (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). Las primeras pueden coexistir en la rizósfera o en el rizoplano, mientras que las últimas se localizan generalmente dentro nódulos en las células de la raíz (Bhattacharyya y Jha, 2012).

2.5.1. Clasificación de PGRP según su mecanismo de acción.

Las PGPR inhiben el desarrollo de enfermedades causadas por fitopatógenos y estimulan el crecimiento de las plantas mediante mecanismos indirectos o directos, aunque la diferencia entre los dos no siempre es distinta (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Ashraf *et al.*, 2013).

2.5.1.1. Mecanismos indirectos.

El efecto de este tipo de mecanismos, generalmente se ve relacionado con la promoción del crecimiento vegetal, por lo cual, en el control biológico, resulta ser una acción indirecta, ya que, si no inhibe directamente el desarrollo y establecimiento de enfermedades, brinda resistencia nutricional a la planta. Las PGPR emplean mecanismos indirectos que incluyen la fijación del nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos quelantes de hierro, la solubilización de fosfatos insolubles, generación de enzimas e inducción de resistencia sistémica. Otro mecanismo indirecto importante implica la producción de hormonas de crecimiento vegetal como el ácido abscísico (ABA), ácido indol-acético (IAA), citoquininas, auxinas y giberelinas, además de la 1-

aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, hormona implicada en la disminución del nivel de etileno inducido por estrés en la raíz de las plantas en desarrollo (Avis *et al.*, 2008; Bhattacharyya y Jha, 2012; Chauhan *et al.*, 2015; Sabaté *et al.*, 2017; Etesami y Maheshwari, 2018).

2.5.1.2. Mecanismos directos.

Los mecanismos directos de las PGPR incluyen la inhibición de microorganismos que tienen un efecto negativo sobre la planta (antibiosis y competencia), la hidrólisis de moléculas liberadas por patógenos, la producción de antibióticos y de enzimas extracelulares que hidrolizan las paredes de células fúngicas y la síntesis de HCN (Bhattacharyya y Jha, 2012; Das *et al.*, 2013). De esta manera, las PGPR mejoran indirectamente el crecimiento de las plantas mediante la supresión de patógenos y mejoran el proceso metabólico defensivo de la planta, ya que juegan un papel importante en la inducción de resistencia sistémica por estrés biótico (Chen *et al.*, 2009; Pérez-Montañaño *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2018).

2.5.1.2.1. Antibiosis.

La actividad antagónica de las PGPR en el control biológico, hace referencia, principalmente, a la síntesis de metabolitos secundarios como los antibióticos, compuestos volátiles, toxinas, biosurfactantes, así como la producción de enzimas de degradación de la pared celular extracelular como la quitinasa, β -1,3-glucanasa, beta-xilosidasa, pectina metilesterasa, entre otras (Shoda, 2000; Compant *et al.*, 2005; Doornbos *et al.*, 2012; Pérez-Montañaño *et al.*, 2014).

Numerosas especies bacterianas que habitan en la rizósfera, se han reportado como PGPR capaces de producir varios antibióticos y toxinas. Estos incluyen amphisina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pirrolnitrina, cianuro de hidrógeno (HCN), oomicina A, fenazina, tensina, pioluteorina, tropolona y lipopéptidos cíclicos, miembros

de las familias surfactina, iturina y fengycina (Nakkeeran *et al.*, 2013; Wani y Khan, 2014; Pandya y Saraf, 2014; Torres *et al.*, 2016; Sherathia *et al.*, 2016;).

2.5.1.2.2. Competencia.

En los procesos de colonización microbiana dados en la rizósfera, los microorganismos suelen establecerse en los sitios donde el agua y los nutrientes que contienen carbono están más fácilmente disponibles para garantizar su sobrevivencia. Cuando los recursos nutrimentales son limitados, se propician interacciones como la competencia, en la que los organismos presentes en la rizósfera compiten entre sí por la alimentación y el espacio en el entorno (Philippot *et al.*, 2013).

Con frecuencia, existe una competencia entre comunidades microbianas por hierro, que es un nutriente esencial para prácticamente todas las formas de vida. Las rizobacterias pueden suprimir el crecimiento de varios fitopatógenos al limitar el suministro de Fe disponible a través de la producción de sideróforos, los cuales son ligandos de unión a hierro de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad para secuestrar hierro de un entorno limitado (Jing *et al.* 2007; Scavino y Pedraza, 2013). Los sideróforos, generalmente forman complejos con Fe³⁺, que luego son absorbidos por la membrana celular de las bacterias, donde el Fe³⁺ se reduce a Fe²⁺ y es liberado desde el sideróforo a la célula (Gopalakrishnan *et al.*, 2014). Se ha demostrado que las PGPR mejoran el crecimiento de la planta produciendo sideróforos extracelulares que a la par que ejercen un efecto de biocontrol de enfermedades al privar al fitopatógeno de la nutrición de hierro, resulta en un mayor rendimiento del cultivo (O'Sullivan y O'Gara 1992 en Pérez-Montaño *et al.*, 2014).

2.5.1.2.3. Producción de enzimas líticas.

Otro mecanismo por el cual las bacterias pueden suprimir el desarrollo de microorganismos dañinos en la rizósfera, es mediante la producción de enzimas líticas

que degradan la estructura de las paredes celulares de los patógenos, como las quitinasas, amilasas, celulasas, glucanasas o proteasas (Syed *et al.*, 2018).

2.6. Biocontrol de *M. phaseolina* mediante el uso de PGPR.

En la búsqueda de nuevas alternativas en el manejo integrado de enfermedades ha surgido la necesidad de investigar las capacidades de biocontrol efectuadas por bacterias asociadas a la rizósfera de diferentes géneros. Existe en la literatura investigaciones que reportan numerosos aislamientos de bacterias obtenidas de la rizósfera, que han mostrado capacidad de inhibición del crecimiento e infección del fitopatógeno *M. phaseolina*, ya sea por mecanismos directos o indirectos, en diversos cultivos de leguminosas alrededor del mundo.

Investigaciones realizadas por Choudhary en 2011, quien aisló las rizobacterias A₅F y FPT₇₂₁ y la cepa GRP₃ del género *Pseudomonas*, que se caracterizaron por promover el crecimiento de las plantas infectadas por *M. phaseolina*, debido a que disminuían los daños ocasionados por la enfermedad, así como también, inducían la resistencia sistémica en las plantas, esto relacionado con actividades enzimáticas, lipoxigenasa (LOX), fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y peroxidasa (POD).

Por otra parte, estudios realizados, por Gacitúa y colaboradores en 2009, revelaron que pruebas *in vitro* y en campo de aislados del género *Bacillus* mostraron capacidad antagonista contra el agente causal de la podredumbre carbonosa. Fueron evaluados la producción de metabolitos volátiles, sideróforos e inhibición del crecimiento micelial, concluyendo que estas rizobacterias reducían el crecimiento del patógeno hasta un 75 %.

En 2010, Singh y colaboradores, analizaron rizobacterias de la especie *Pseudomonas aureginosa* (PN1-PN10) aisladas de la rizósfera de pinos (*Pinus roxburghii*) han sido eficaces para inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* *in vitro* en un 69 % mediante la aplicación de cultivos de células bacterianas y filtrados de las mismas. La cepa PN1 mostró una fuerte actividad antagónica resultando positiva para

pruebas de producción de sideróforos, ácido índol-acético (AIA), cianógeno y fósforo solubilizado, además de producir quitinasa y b-1,3-glucanasa. En un sistema tripartita, la cepa PN1 fue capaz de colonizar la rizósfera a los 90 días de establecimiento, además de que aumentó el crecimiento de las plantas y la biomasa de las unidades experimentales infectadas con el patógeno.

Otro estudio más reciente fue el elaborado por Shrivastava y colaboradores en el 2017, donde se aisló una cepa de actinobacteria halotolerante (*Streptomyces aureofaciens*) proveniente del suelo afectado por la salinidad de las llanuras indogangéticas orientales (IGP), que se caracterizó por su potencial antagonista contra *Macrophomina phaseolina* mediante un ensayo de cultivo dual. Los resultados revelaron que esta actinobacteria tenía potencial de promover el crecimiento de la planta y resultó positiva para pruebas de detección de producción de enzimas como la amilasa, quitinasa y ureasa, además de que fue capaz de dañar el micelio fúngico debido a la acción de quitinasas.

Finalmente, cada región geográfica cuenta con características diferentes y delimitantes que están directamente relacionadas con la diversidad y abundancia de microbiota asociada a la rizósfera de las plantas y sus mecanismos de acción en el control biológico, por lo cual, el estudio de bacterias con potencial antagónico a hongos fitopatógenos no es finito, ya que varía según la distribución geográfica, la especie de planta a la cual se encuentran asociados los microorganismos y el potencial efecto inhibitorio que tengan estas bacterias contra los hongos que estén siendo agentes causales de enfermedades.

3. JUSTIFICACIÓN

En la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris*), Sinaloa se posiciona en segundo lugar a nivel nacional y según estadísticas de SIAP-SAGARPA, en el año agrícola 2018, se cosecharon 96 mil 337 hectáreas, de las cuales se obtuvo una producción de 173, 995 toneladas, correspondientes al 15.5 % de la producción total del país. Sin embargo, la presencia de algunas enfermedades en este cultivo como la pudrición de la raíz ocasionada por el hongo fitopatógeno *M. phaseolina* representa graves daños que llegan a causar grandes pérdidas en producción en suelos muy infestados.

Generalmente, las enfermedades fúngicas son contrarrestadas mediante la implementación de un manejo que integra el control preventivo y de monitoreo, así como también el uso de productos químicos (fungicidas) que se aplican cuando se presentan sintomatologías asociadas a estas infecciones. Sin embargo, el empleo de estos productos puede tener un impacto negativo en el ambiente, ya que contaminan el suelo, agua y aire, y afectan a una gran cantidad de microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo, además, dicho efecto no minimiza el crecimiento del patógeno, siendo su aplicación una inversión innecesaria para el productor y un riesgo potencial en la salud de las personas que se encargan de proporcionar cuidado a los cultivos.

Actualmente, una iniciativa factible ante el control de enfermedades en cultivos agrícolas es la utilización de agentes biológicos, entre los que se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), las cuales pueden disminuir o suprimir las enfermedades causadas por fitopatógenos. La acción de PGPRs se ha relacionado con la inhibición directa del desarrollo de patógenos, así como la inhibición indirecta a través de la estimulación de los mecanismos de defensa de las plantas.

Los productos disponibles para este fin, han sido desarrollados con cepas de diferentes zonas geográficas, factor que pudiese intervenir en la efectividad del producto, puesto que, estos organismos no están adaptados a las condiciones edafológicas y climáticas de nuestra región. Aunado a esto, los organismos exógenos introducidos a los campos agrícolas pueden desplazar a otros microorganismos

nativos. Por otra parte, en Sinaloa, la información sobre la distribución cuantitativa y cualitativa de los microorganismos de la rizósfera es muy escasa y su potencial de aprovechamiento en las prácticas sustentables no se lleva a cabo en gran medida.

En el presente proyecto, se pretende realizar el aislamiento y evaluación de uno o más aislados de bacterias nativas provenientes de nódulos y rizósfera del frijol (*Phaseolus vulgaris*) con potencial efecto inhibitorio contra el patógeno de raíz de frijol *M. phaseolina*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Aislar y evaluar la efectividad de cepas nativas de bacterias nodulares y de la rizósfera de plantas de frijol en el control biológico del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

4.2. Objetivos específicos.

1. Obtener una colección de aislamientos de bacterias nodulares y de rizósfera de plantas de frijol colectadas en diferentes lotes de la zona norte de Sinaloa.
2. Evaluar el potencial de antagonismo en cultivo *in vitro* con las bacterias seleccionadas contra el patógeno *M. phaseolina*.
3. Evaluar el potencial de antagonismo en cultivo *in planta* con las bacterias seleccionadas contra los patógenos *M. phaseolina* en frijol.
4. Identificar molecularmente el (los) aislados bacterianos seleccionados.

5. HIPÓTESIS

Al menos uno de los aislados de bacterias de la colección presentará el potencial para disminuir hasta en un 50 % el desarrollo del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de muestras

Se recolectó suelo de dos lotes agrícolas de los Ejidos “Bachoco” y “Adolfo Ruíz Cortines III”, localizados en el municipio de Guasave Sinaloa. Estos dos lotes con un historial de 3 ciclos agrícolas consecutivos sembrando frijol de la variedad Azufrado Higuera. Las muestras de suelo fueron homogenizadas por separado y colocadas en macetas de 20 cm de diámetro. En total se utilizaron 5 macetas, cada una con 5 semillas de frijol variedad Azufrado Higuera. Una vez germinadas las semillas, las macetas se colocaron en un cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad a 25° C, durante 30 días, regándolas con agua destilada cada segundo día. Finalmente, el aislamiento de bacterias se llevó a cabo a partir de la rizósfera de dos plantas de frijol por cada maceta y de 5 nódulos viables por cada planta.

6.2. Aislamiento de bacterias nodulares.

Para el aislamiento de bacterias nodulares, cinco nódulos viables (de coloración rosácea) se cortaron dejando un centímetro de raíz para facilitar su manejo y fueron desinfectados realizando una inmersión en alcohol al 95 % por un minuto y posteriormente en hipoclorito de sodio al 3 % durante 3 minutos. Por último, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril (ADE) (Somasegaran y Hoben, 1994).

Los nódulos desinfectados fueron colocados individualmente en microtubos de 1.5 mL con 50 µL de ADE y fueron triturados con ayuda de un pistilo estéril. Los productos del macerado fueron sembrados por estría en placas con medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 30° C por 2 días.

6.3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera.

El suelo adherido a las raíces fue utilizado para realizar diluciones en serie en solución salina (0.85 %, NaCl, p/v), posteriormente se llevó a cabo la siembra por extensión en medio agar LB y las placas de Petri sembradas se incubaron a 30° C por 24 horas. Después de la incubación, se realizó el conteo de las colonias bacterianas. Las colonias presentes fueron seleccionadas y sub-cultivadas para obtener cultivos puros; se les realizó una prueba de hemólisis y los aislados que resultaron negativos se almacenaron a -70° C en medio LB líquido con glicerol al 15 % (Daigle, Connick, y Boyetchko, 2002; Lakshmi *et al.*, 2015; Patil, 2014).

6.4. Prueba de hemólisis.

Esta prueba se efectuó con la finalidad de descartar aquellos aislados que pudieran llegar a tener un efecto dañino en el humano. Para este ensayo se utilizaron placas de medio de cultivo agar-sangre a las cuales se les realizaron perforaciones de 0.5 cm de diámetro. Los aislados bacterianos se cultivaron en 5 mL de medio LB a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. Un mililitro de cada tubo de cultivo se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se tomaron 100 µL del sobrenadante obtenido y se colocaron en las perforaciones de las placas de medio de cultivo. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C. Los criterios de la prueba de hemólisis fueron los siguientes: se denominó hemólisis alfa (α -hemólisis) o hemólisis parcial, cuando se presentó un obscurecimiento verdoso en el medio de cultivo alrededor de las perforaciones conteniendo el sobrenadante. Hemólisis beta (β -hemólisis), o hemólisis total, cuando se observó un halo claro del medio de cultivo por el efecto de lisis total de los eritrocitos y hemólisis gama (γ -hemólisis), o no hemolítico, si el medio de cultivo no presentaba ningún tipo de aclaramiento (Forbes *et al.*, 2002).

6.5. Reactivación del patógeno.

El aislado del hongo fitopatógeno *M. phaseolina*, fue proporcionado por la UTEFI-SAGARPA. El medio de cultivo que se utilizó para la propagación del patógeno fue Agar Papa Dextrosa (PDA). Se colocó un pequeño fragmento de la muestra en el medio de cultivo y se dejó incubar por 7 días a 28 °C (Dhingra y Sinclair, 1995).

6.6. Prueba de antagonismo *in vitro*.

Para la realización de esta prueba, se establecieron cultivos duales en cajas Petri sobre medio PDA. Se realizó una siembra de bacteria por medio de una estría en cuatro puntos equidistantes de la caja de Petri de 50 mm de diámetro y un disco de agar con micelio del fitopatógeno, crecido por 7 días, fue colocado en el centro de la placa. Para el cultivo control, solo se colocó un disco de agar con micelio. Los cultivos duales se mantuvieron en incubación a 28° C por 3 a 5 días, el ensayo se detuvo una vez que el hongo en la caja control había alcanzado los 4 cm de diámetro (Paneerselvam *et al.*, 2012; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

Transcurrida una semana, una vez que el hongo en la caja control había alcanzado los 4 cm de diámetro, se realizó una evaluación de la inhibición del crecimiento fúngico, utilizando la siguiente fórmula (Paneerselvam *et al.*, 2012):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [(C - T) / C] \times 100$$

Dónde: **(C)** es el crecimiento radial del control en el cultivo control.

(T) es el crecimiento radial en el cultivo dual.

Los aislados bacterianos que presentaron mayor porcentaje de inhibición *in vitro* contra el crecimiento del patógeno, se seleccionaron para llevar a cabo las pruebas de detección de posibles mecanismos directos e indirectos (promoción de crecimiento

vegetal) de antagonismo y ensayos de antagonismo *in planta* y su posterior identificación molecular.

6.7. Pruebas para la detección de posibles mecanismos de actividad antagónica.

Para analizar los mecanismos de acción que posiblemente estén empleando los aislados bacterianos con mayor porcentaje de antagonismo *in vitro* obtenidos en este estudio, fue necesario realizar algunas pruebas bioquímicas cualitativas para la determinación de producción de metabolitos. Los ensayos se realizaron con los cuatro aislados bacterianos seleccionados para las pruebas de antagonismo *in planta* (BA97, BN17, BN20 y BR20).

6.7.1. Posibles mecanismos de antagonismo *in vitro*.

6.7.1.1. Antagonismo mediante compuestos volátiles (VOCs) – método placa dividida.

La actividad antifúngica de compuestos volátiles se analizó mediante una modificación de los métodos descritos por Fernando *et al.* (2005) en placa Petri dividida. Para este ensayo cada uno de los cuatro aislados fueron estriados en una de las divisiones de la placa Petri con medio LB, mientras que, en la división restante, conteniendo medio PDA, se colocó un disco de micelio de *M. phaseolina* tomado de una colonia con 10 días de crecimiento. Las placas fueron selladas con Parafilm para evitar cualquier abertura y de esta manera garantizar que en caso de producirse compuestos volátiles éstos no se desplazaran fuera de la caja Petri.

El crecimiento radial del micelio se evaluó a los 5 días posteriores al establecimiento del ensayo tanto en unidades inoculadas con el patógeno y bacterias

como en placas control que contenían solo un disco de hongo, con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición fúngica (Paneerselvam *et al.*, 2012).

6.7.1.2. Antagonismo mediante compuestos volátiles (VOCs) – método cámara sellada.

Estos ensayos se realizaron en placas de Petri de 50 mm, formando una cámara sellada, donde una placa contenía medio LB y la otra medio PDA (Alijani *et al.*, 2019). Cada aislado bacteriano se estirió en una placa de medio LB, mientras que en el centro de las placas con PDA se colocó un disco de micelio de *M. phaseolina* en crecimiento activo con 7 días de cultivo. La placa que contenía bacteria se colocó invertida sobre la inoculada con hongo y fueron selladas herméticamente con Parafilm, creando una cámara de interacción para la posible producción de compuestos volátiles. A la par se estableció una cámara control que solo tenía un disco micelial.

Se realizaron dos réplicas para cada tratamiento y las placas se incubaron a temperatura ambiente por 5 a 7 días, una vez que el hongo en la caja control alcanzó los 4 centímetros de diámetro. El porcentaje de la inhibición del crecimiento fúngico para cada aislado bacteriano seleccionado se calculó usando la fórmula descrita por Paneerselvam *et al.* (2012) como se describe en la sección 6.6.

6.7.1.3. Antagonismo mediante metabolitos secundarios no-volátiles.

Para evaluar la producción de metabolitos no volátiles por parte de las bacterias BA97, BN17, BN20 y BR20 en el antagonismo *in vitro* se empleó el método descrito por Gacitúa y colaboradores (2018) con algunas modificaciones. Las bacterias se cultivaron inoculando una colonia en 5 mL de medio LB y se incubaron en un agitador rotatorio a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min para obtener el sobrenadante, los cuales se esterilizaron utilizando un filtro Milipore de 0.22 µm. En placas de 50 mm con medio PDA se colocaron trozos de 0.5

cm de papel filtro estéril en cuatro puntos equidistantes; en cada uno de ellos se colocaron 10 μ L del filtrado y en el centro se ubicó un disco de micelio de *M. phaseolina* con una semana de crecimiento. Al igual que en los ensayos previos, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial.

6.8. Pruebas para la detección de posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de promoción vegetal (mecanismos de control indirecto) de los aislados seleccionados, se llevaron a cabo algunas pruebas bioquímicas reportadas para los principales mecanismos de promoción de crecimiento.

6.8.1. Capacidad de solubilización de fosfatos.

Para determinar la solubilización de fósforo, los aislados se crecieron en tubos de ensaye con 5 mL de medio LB por 18 h a 30° C y 200 rpm. Un mililitro de cada tubo de cultivo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos, se tomaron 800 μ L del sobrenadante y se centrifugaron a las mismas condiciones para recuperar 600 μ L del sobrenadante, centrifugando por tercera ocasión para finalmente obtener 500 μ L de sobrenadante. Cincuenta micro litros de cada cultivo centrifugado fueron colocados en perforaciones de 5 mm en placas de medio Agar Pikovskaya. Las cajas Petri fueron incubadas durante una semana a 25 °C. La formación de un halo claro en el medio de cultivo alrededor de la colonia, indicaría una reacción positiva para la solubilización de fosfatos (Pikovskaya, 1948). Como controles positivos se usaron las bacterias GR84 y GR26, mientras que como control negativo se utilizó la cepa GR80. Dichos aislados fueron previamente caracterizados en el equipo de trabajo (López-Soto, 2019).

6.8.2. Producción de sideróforos.

Este tipo de mecanismo se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Schwyn y Neilands (1987). Cien micro litros de cada cultivo bacteriano se inocularon sobre pozos de 5 mm de diámetro en placas de agar CAS y se incubaron a temperatura ambiente por dos semanas. Se seleccionaron como aislados productores de sideróforos aquellos que presentaron el desarrollo de un halo claro de tonalidad amarillo-naranja alrededor de la zona donde se colocó el cultivo. Como control positivo se utilizó el aislado GR80, previamente caracterizado como productor de sideróforos por López-Soto (2019) en nuestro equipo de trabajo.

6.8.3. Producción de ácido indolacético (AIA).

La capacidad de los aislados para producir auxinas se evaluó utilizando el reactivo Salkowski, que fue desarrollado originalmente para la determinación de indol y consiste en FeCl_3 disuelto en un ácido oxidante concentrado (Salkowski. 1885; Szkop *et al.*, 2012).

Previo al análisis de producción de AIA por parte de los aislados, se llevó a cabo una curva de calibración con 12 concentraciones de AIA (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 12, 10, 5 y 0 $\mu\text{M}/\text{mL}$) en medio LB, las cuales fueron mezcladas con reactivo Salkowski (20 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por litro de $\text{H}_2\text{SO}_4 7.9 \text{ M}$), incubando a temperatura ambiente por 30 min. Se midió la densidad óptica (DO) de las distintas concentraciones a 530 nm para realizar una curva con los datos de absorbancia obtenidos y se tomó registro de las tonalidades observadas.

Por otra parte, una colonia bacteriana de cada uno de los aislados se cultivó en caldo LB durante 24 h. Estos cultivos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 10 min. Se tomaron 100 μL del sobrenadante bacteriano y se adicionaron 100 μL del reactivo Salkowski, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en ausencia de luz (Pilet y Chollet, 1970) y se llevó a cabo una lectura de DO_{530} . El criterio de selección fue de

manera visual al evaluar si los sobrenadantes bacterianos presentaban coloración rosada y se compararon las lecturas espectrofotométricas con las obtenidas en la curva de calibración.

6.9. Formulación líquida de aislados rizosféricos y nodulares.

Como parte del estudio general del potencial antagónico a *M. phaseolina* por parte de los aislados provenientes de la rizósfera y nódulos de plantas de frijol, se llevó a cabo una formulación en líquido de los dos mejores aislados resultantes en pruebas de antagonismo *in vitro* e *in planta* y se realizó la evaluación de viabilidad y vida de anaquel, esto con el objetivo de conocer el espectro de acción sinérgica de ambos aislados en formulación en la inhibición del crecimiento del fitopatógeno.

6.9.1. Establecimiento de consorcios microbianos.

Continuando con en el escrutinio basado en las características bioquímicas y potencial antagónico, y con la finalidad de explorar la posibilidad de realizar formulaciones en consorcio, se decidió evaluar la compatibilidad entre las cuatro mejores cepas bacterianas (B97, BN17, BN20 y BR20). Para esto, dos de las cepas fueron estriadas de manera horizontal en placas de agar LB, mientras que las otras dos fueron estriadas verticalmente, de manera perpendicular a las anteriores. Este método se realizó por duplicado y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 h con la finalidad de observar si existía presencia de una zona de inhibición, lo cual indicaría una incompatibilidad entre los aislados, o de caso contrario, la ausencia de zona de inhibición revelaría coexistencia entre las cepas bacterianas (Fukui *et al.*, 1994 en Sundaramoorthy *et al.*, 2012).

6.9.2. Formulación.

Para el proceso de formulación se seleccionaron los aislados BA97 y BN20 debido a la alta eficacia mostrada en el control del patógeno en los ensayos *in vitro*. Se realizaron inóculos de los aislados, para ello matraces de 125 mL con 25 mL de caldo LB fueron inoculados con cada bacteria dejándolos incubar en un agitador rotatorio durante 24 h a 30 °C y 200 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 5,000 rpm por 20 min a 4 °C con el objetivo de concentrar el inóculo obtenido. Finalizado este paso, se decantaron 12.5 mL de sobrenadante y el resto de cultivo se homogenizó, se tomó 1 mL de cada cultivo y se realizaron diluciones en serie, las cuales fueron sembradas por extensión en placas Petri con agar LB para determinar la concentración de células presentes.

Una vez determinada la concentración de cada inóculo, se prepararon matraces de 500 mL con 100 mL de caldo nutritivo adicionado con 2 % de glicerol, los cuales fueron inoculados con cada uno de los aislados ajustando la concentración final a 1.9×10^7 UFC/mL. Los matraces fueron incubados durante un día a 30° C y 200 rpm para posteriormente ser almacenados a dos diferentes condiciones: temperatura ambiente y a - 4° C.

Los formulados se rotularon de la siguiente manera para su fácil organización e identificación

- BA97 1 y BN20 1: Correspondían a las formulaciones almacenadas a - 4° C.
- BA97 2 y BN20 2: Formulaciones resguardadas a temperatura ambiente.

6.9.3. Prueba de viabilidad post formulación.

La determinación de la población microbiana viable post formulación se llevó a cabo utilizando el método de recuento en placa. Un mililitro de cada formulación fue tomado y se realizaron diluciones en serie con agua destilada estéril para posteriormente realizar un plaqueo por extensión sobre placas de agar LB. Las cajas

de Petri fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de formulado (UFC/mL⁻¹).

6.9.4. Vida de anaquel de la formulación.

Para conocer la tasa de supervivencia de las bacterias, se determinó la vida útil de las formulaciones a las dos diferentes temperaturas de almacenamiento durante 3 meses, haciendo muestreos semanales y conteo de UFC/mL mediante diluciones seriales y siembras por extensión (Chen *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2010).

6.9.5. Pruebas de eficacia *in vitro* del formulado en el control de *M. phaseolina*.

De la misma manera que en el establecimiento de ensayos de antagonismo previos, se llevaron a cabo pruebas en cultivo dual *in vitro*, retando los formulados creados con el hongo *M. phaseolina*. Para cada tratamiento, se colocaron 10 µL de formulado en 4 puntos equidistantes y en el centro de la placa se situó un disco de micelio con 7 días de crecimiento. Para la estimación de la capacidad antagónica de los aislados como consorcio, se hicieron mezclas a partes iguales de cada bacteria según su formulación (BA97-BN20 1 y BA97-BN20 2). La metodología para la evaluación del porcentaje de inhibición fue la misma que se utilizó en los ensayos previos descritos en el apartado 6.6.

6.10. Pruebas de antagonismo *in planta*.

6.10.1. Estandarización de la metodología para la producción de inóculo bacteriano.

Una vez seleccionados los aislados que mostraron actividad antagonista *in vitro* y que no presentaban un potencial efecto dañino para el humano, y previo a la evaluación de estos aislados en invernadero, se llevó a cabo la estandarización para

preparar el inóculo a utilizar. Para ello, se realizó una curva de crecimiento de las bacterias seleccionadas, con la finalidad de determinar la fase de crecimiento exponencial, y asegurar con ello el utilizar células viables y en crecimiento constante. En placas Petri con medio agar LB, se sembró por estriado cada uno de los aislados congelados a -70 °C y se incubaron por 24 h para reactivar a los microorganismos. De dicha placa se realizó una segunda reactivación por estriado de una colonia en una placa con medio agar LB la cual se incubó por 24 horas a 30 °C. Posteriormente se realizó un pre-inóculo de cada cepa, donde a un tubo de ensaye de 15 mL conteniendo 5 mL de caldo LB, se le adicionó una colonia del cultivo y se incubó en un agitador orbital a 30 °C y 200 rpm por 18 horas. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó 1 mL de este cultivo a un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de medio líquido LB y se incubó en un agitador orbital a 30 °C y 200 rpm. De este inóculo se tomaron lecturas de densidad óptica (DO) a 595 nm de longitud de onda cada dos horas hasta llegar a la fase estacionaria del cultivo. Obtenida la curva de crecimiento, se determinó el punto de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria, de donde se obtuvieron las condiciones de densidad óptica (DO) y unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para detener el cultivo a utilizarse como inóculo en los ensayos posteriores (Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

6.10.2. Estandarización de la metodología para la producción de inóculo fúngico.

Para la producción de inóculo fúngico, se sembró el hongo *M. phaseolina* en cajas Petri de 90 x 15 mm conteniendo medio PDA y se incubó a 28 °C por aproximadamente 10 días, hasta que el hongo había colonizado la placa en su totalidad. Posteriormente, diez mililitros de agua destilada estéril se añadieron al cultivo para remover el micelio del hongo con ayuda de un bisturí y dicha suspensión fue utilizada para realizar diluciones en serie. Finalmente, 100 µL del inóculo en distintas diluciones fueron sembrados por extensión en medio agar PDA y se dejaron en incubación a 28 °C por 24 horas para realizar el conteo de UFC/mL.

Una vez que se obtuvo la concentración del inóculo fúngico producido, se llevó a cabo un seguimiento de la viabilidad del inóculo durante una semana haciendo nuevamente diluciones seriales y siembras por extensión, así como también se efectuó una observación, bajo el microscopio, de las unidades formadoras de colonias visualizadas en las cajas petri.

6.10.2.1. Bioensayo de patogenicidad.

Con el objetivo de verificar el efecto patogénico del inóculo fúngico, se estableció un bioensayo de infección usando una concentración de 3.4×10^3 UFC/mL de *M. phaseolina*. Semillas de frijol azufrado higuera fueron desinfectadas con NaClO al 3 % y sembradas en vasos de poliestireno expandido de 6 oz con sustrato estéril vermiculita-arena (1:1). Los tratamientos montados fueron: control y *M. phaseolina*, con 3 y 5 réplicas respectivamente. La inoculación de las semillas de los tratamientos se llevó a cabo colocando 1 mL de suspensión de hongo a 3.4×10^3 UFC/mL, y para el caso de los controles se usó 1 mL de caldo LB.

Las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura ambiente con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad y se regaron con agua destilada cada segundo día por 8 días. Transcurrido este tiempo, las plantas fueron evaluadas, midiendo parte radical y aérea, así como también se realizó un registro de los síntomas de infección.

6.10.3. Escala de patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* en plantas de frijol.

Para poder evaluar la incidencia y severidad en posteriores ensayos de antagonismo *in planta*, se llevó a cabo un bioensayo con inóculo fúngico con 3.4×10^3 UFC/mL del hongo. Setenta unidades experimentales fueron establecidas en vasos de poliestireno (12 oz) con sustrato estéril vermiculita-arena (1:1). Diez unidades correspondientes a los controles absolutos donde se inoculó la semilla con 1 mL de caldo LB, mientras que las sesenta restantes fueron inoculadas con 1 mL de inóculo fúngico. El experimento se mantuvo en un cuarto de crecimiento con condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura (16 h luz / 8h oscuridad, 25 °C).

Al término del bioensayo, se organizaron las plantas según su sintomatología en seis niveles distintos (del 0 al 5) para conformar la escala de severidad.

6.10.4. Bioensayo de antagonismo *in planta*.

Para el establecimiento de estas pruebas, se seleccionaron dos aislados rizosféricos (BA97 y BR20) y dos provenientes de nódulos (BN20 y BN17), los cuales presentaron los mayores porcentajes de inhibición a *M. phaseolina* en las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Se establecieron nueve tratamientos y un control absoluto con siete réplicas cada uno. Las semillas fueron colocadas en vasos de poliestireno de 12 oz con sustrato estéril (vermiculita-arena) y se les adicionó 1 mL de cada tratamiento correspondiente, antes de ser sembradas, en un arreglo completamente al azar en un cuarto de crecimiento con condiciones controladas (fotoperiodo: 16 h luz/8 h oscuridad; temperatura: 25 °C), regando con agua destilada cada segundo día durante una semana. Para los tratamientos con hongo la concentración utilizada fue de 3.4×10^3 UFC/mL y para bacterias, se ajustó la concentración de los inóculos a 1×10^6 UFC/mL.

Los tratamientos del diseño experimental a evaluar fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: Inóculo *M. phaseolina* (Mp) e inóculo BA97.
- Tratamiento 2: Mp + BN17.
- Tratamiento 3: Mp + BN20
- Tratamiento 4: Mp + BR20
- Tratamiento 5: Mp
- Tratamiento 6: BA97
- Tratamiento 7: BN17
- Tratamiento 8: BN20
- Tratamiento 9: BR20
- Control absoluto: Semilla inoculada con 1mL de caldo LB

El efecto de la infección por el patógeno fue analizado siete días posteriores a la siembra, utilizando la escala generada a partir de la observación de la severidad de la enfermedad en las plantas evaluadas. La incidencia y el índice de porcentaje de enfermedad fueron calculados mediante las siguientes fórmulas (du Toit *et al.*, 1997; Asran and Buchenauer, 2003):

- **Incidencia: $I (\%) = \frac{n}{N} \times 100$**

Dónde: **n**= n° de plantas enfermas y **N**= n° total de plantas.

- **Índice de porcentaje de enfermedad: $IE (\%) = [\sum (R \times N)] \times 100 / H \times T$**

Dónde: **R**= nivel de la enfermedad, **N**= n° de plantas por nivel, **H**= nivel más alto y **T**= total de plantas contadas.

A su vez, el índice de enfermedad se usó para calcular el efecto de biocontrol de los tratamientos hongo-bacteria usando la fórmula que se muestra a continuación (Li *et al.*, 2008 en Chen *et al.*, 2009):

- **Efecto de biocontrol (%): EB (%)=**
$$\frac{(\text{IEP} - \text{IEB}) \times 100}{\text{IEP}}$$

Dónde: **IEP**= índice de enfermedad en el control patógeno, **IEB**= índice de enfermedad en el tratamiento con bacteria.

6.10.4.1. Análisis estadístico.

Los datos numéricos obtenidos a partir de los niveles de la escala de severidad fueron analizados usando Kruskal-Wallis. Por otra parte, los resultados de peso fresco, peso seco y longitud de raíz y tallo fueron analizados en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25 mediante las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad de varianzas y al resultar no normales se procedió a realizar un ANOVA de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos para determinar si existían diferencias entre los grupos y su posterior comparación utilizando el procedimiento de Dunn con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples con un valor *alpha* de 0.05.

6.11. Identificación molecular de los aislados bacterianos seleccionados.

La identificación de los aislados bacterianos seleccionados se llevó a cabo mediante secuenciación del gen ADNr 16S. El ADN genómico de los aislados se extrajo utilizando el kit DNAzol (Invitrogen, No. Cat. 10503-027) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los aislados se crecieron en medio LB líquido durante 18 horas a 200 rpm y 30° C. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada cultivo y fueron centrifugados a 13,000 rpm por 20 min. Seguido a esto, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 500 µL de DNAzol® macerando suavemente las muestras con un pistilo estéril y agitando de 3 a 4 veces para después centrifugar 10 min a 14,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa transfiriéndola a un microtubo de 1.5 mL y se añadieron 500 µL de EtOH al 100 %. El tubo se agitó por

inversión de 4 a 5 veces y se centrifugó a 6,000 rpm por 5 min. Después de descartar el sobrenadante, se agregaron 500 μ L de EtOH al 75 %, agitando por inversión de 4 a 5 veces y se centrifugó nuevamente a 6,000 rpm por 5 min. Se repitió el paso anterior con un nuevo lavado y se dejó secar la pastilla. Finalmente, el ADN extraído se resuspendió con 50 μ L de H₂O ultra pura.

La integridad del ADN genómico extraído fue visualizada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v). Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen ADNr 16S utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos F2C (5'- AGAGTTTGATCATGGCTC -3') y C (5'- ACGGGCGGTGTGTAC -3'), que amplifican una región de aproximadamente 1400 pb. La mezcla de reacción de PCR contendrá 1 μ L de extracto de ADN, 1X de buffer de reacción, 1 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 500 μ M de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 0.5 U de TaqDNA polimerasa en un volumen total de 25 μ L. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron establecidas de la siguiente manera: una temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, y finalmente una temperatura de extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v), teñido con bromuro de etidio, se utilizó un sistema de fotodocumentación Chemidoc (Bio-Rad) para la visualización de los fragmentos y analizar si estos correspondían al tamaño de producto esperado. Posteriormente, se realizó la purificación de los productos de PCR, utilizando el kit QIAquick® PCR Purification (siguiendo las indicaciones del fabricante) y su posterior cuantificación para su envío a secuenciación.

Obtenidas las secuencias, éstas fueron comparadas con el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.gov>) utilizando la plataforma BLASTn para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con organismos que mostraran 90 % o más de identidad como criterio de identificación. Posteriormente, se utilizó el programa Clustal W para realizar el alineamiento múltiple de secuencias (Larkin et al., 2007). El árbol filogenético se construyó en el programa

MEGA X con el método de neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987, Kumar *et al.*, 2018) y el modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980). La solidez de la topología NJ se evaluó mediante la prueba de bootstrap usando 1000 réplicas. Para generar el árbol filogenético se incluyeron las secuencias de los cuatro aislados (BA97, BN17, BN20 y BR20) y cepas de referencia de los géneros más cercanos. Como grupos externos se utilizaron secuencias de los géneros *Streptomyces*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*.

6.12. Identificación molecular del aislado de *Macrophomina phaseolina*.

La extracción del ADN del hongo se realizó a partir del micelio de la cepa, mediante el método desarrollado por Rajendrakumar y col., (2006), con buffer de extracción CTAB (100mM Tris-Cl, pH 8.0, 25 mM EDTA, pH 8.0, 1.25 M NaCl, 2 % CTAB y 3 % PVP). El ADN genómico obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se visualizó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 0.8 %. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de la región ITS del ADNr con los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') que amplifican una región de aproximadamente 600 pb.

La mezcla de reacción de PCR contenía 1 µL de extracto de ADN, 1X de buffer de reacción, 1 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 500 µM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 0.5 U de TaqDNA polimerasa en un volumen total de 25 µL. Las condiciones para los ciclos térmicos de PCR fueron, un primer paso de 4 minutos a 95 °C; un minuto de desnaturalización a 95 °C; una fase de alineamiento de 1 min a 55 °C y un periodo de elongación de 2 min a 72 °C. Estos pasos se repitieron en 34 ciclos finalizando con un paso de 5 min a 4° C para posteriormente visualizar, cuantificar y purificar los productos de PCR con la misma técnica citada anteriormente.

Los productos de PCR se enviaron a secuenciación y el análisis de las mismas se llevó a cabo de la igual forma en el apartado anterior de alineamiento y creación de árbol filogenético para los aislados bacterianos.

7. RESULTADOS

7.1. Colección de bacterias nodulares y de la rizósfera de plantas de frijol.

En los meses de febrero a junio del 2018, se realizaron aislamientos bacterianos de la rizósfera y nódulos de plantas de frijol crecidas bajo condiciones de invernadero. En total, se obtuvieron 243 aislados, de ellos 111 aislados de la rizósfera fueron rotuladas como BA01-BA111; y 20 aislados nodulares como BN01-BN20, procedentes del primer muestreo con suelo proveniente del Ejido Bachoco, Guasave Sinaloa. Para el caso de los cultivos trampa con suelo de un lote agrícola del Ejido Adolfo Ruiz Cortines III, se lograron seleccionar 99 aislados rizosféricos (BR1-BR99) y 13 aislados nodulares (BN01-BN13).

Una vez conformado el banco de germoplasma, el primer escrutinio fue la realización de las pruebas de hemólisis, esto debido a que la actividad hemolítica de los microorganismos puede ser un factor de patogenicidad para el humano. Se obtuvieron 172 aislados con β -hemólisis (hemólisis total) que fueron capaces de producir un halo color amarillo cristalino en el medio de cultivo por efecto de la lisis de los eritrocitos presentes en la sangre. Por otra parte, 32 aislados se caracterizaron por ser α -hemolíticos (hemólisis parcial), y, por último, un total de 39 aislados fueron γ -hemolíticas debido a que no presentaron ningún tipo de hemólisis (Anexo 1). De estos últimos, once aislados provenían de nódulos y los 28 restantes eran bacterias rizosféricas. Por último, los 39 aislados no hemolíticos fueron seleccionados para conformar la colección microbiana final de organismos rizosféricos y nodulares para realizar ensayos posteriores de antagonismo *in vitro* e *in planta*.

Los 39 microorganismos de esta colección fueron criopreservados y mantenidos en un ultracongelador a -70 °C en medio líquido LB con glicerol al 15 %. Para realizar las pruebas de supervivencia, los aislados fueron descongelados y reactivados en dos ocasiones. Todos los aislados fueron capaces de crecer y formar colonias en el medio después de su reactivación, lo que indica que se obtuvo una tasa de supervivencia del 100 %.

7.2. Bioensayo de antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos contra *M. phaseolina*.

Las 38 muestras viables de aislados no hemolíticos de la colección obtenida fueron usadas para realizar pruebas de antagonismo *in vitro* contra el hongo *M. phaseolina*. Los datos adquiridos mostraron que 14 aislados tenían capacidad antagonista ante el hongo, de los cuales 8 presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50 %, BA93, BA97, BA100, BN4, BN17, BN20, BR20 y BN1 (Cuadro 2, Figura 2), como se planteó en los criterios de selección estipulados para estas pruebas. Destacándose BA97 y BN17, por contar con hasta el 85 % de inhibición, ante el crecimiento de *M. phaseolina*, en cultivo dual, seguido por el aislado BN20 con 80 % (Figura 2A, 2B y 2E).

Aunado a estos resultados, se decidió realizar pruebas de antagonismo *in vitro* de los aislados que conformaban la colección contra otros hongos fitopatógenos que afectan a su vez al cultivo de frijol, con la finalidad de ampliar el rango de posible acción de los aislados bacterianos en el manejo de enfermedades. Se realizaron cultivos duales con los hongos *Fusarium verticillioides* (Fv), *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl), *Sclerotium rolfsii* (Sr) y *Rhizoctonia* sp. (Rh). Con los datos obtenidos se pudo observar que 13 de las 39 bacterias, del banco de germoplasma, presentaron capacidad antagonista ante al menos uno de estos cuatro hongos (Anexo 2), destacándose el aislado BN20 que inhibió el crecimiento de los cuatro hongos con porcentajes de 48.5, 40, 35 y 44.5 % (Anexo 3-6), además de ser antagonista a *M. phaseolina* con el 80 %. Cabe mencionar que el aislado BA97 aparte de ser antagonista a *M. phaseolina* en un 85%, también impidió la proliferación micelial de 3 de los 4 hongos fitopatógenos analizados (Fv, Forl y Rh) con porcentajes de 30 a 52 % (Anexo 3-6).

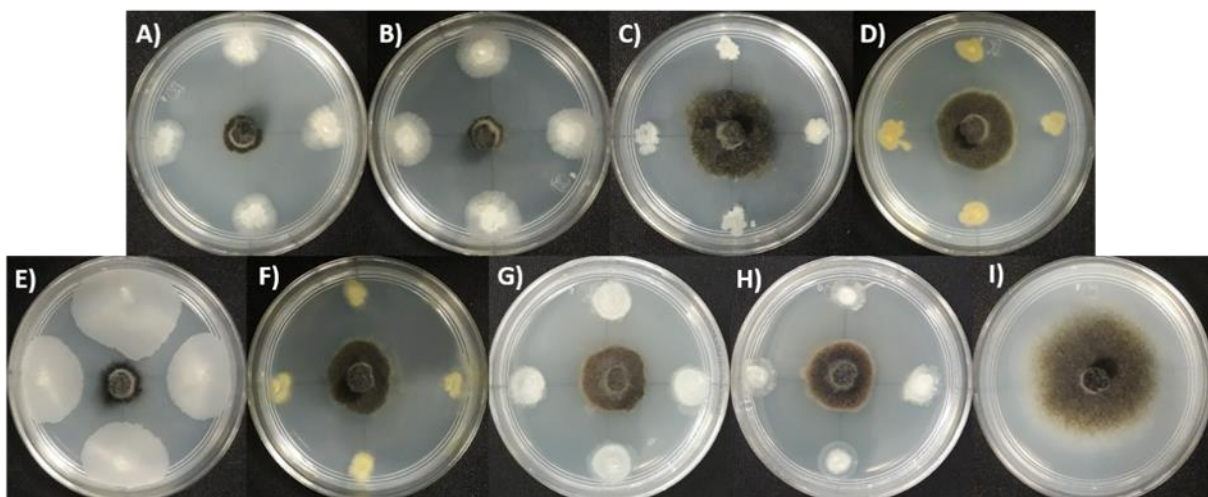


Figura 2. Pruebas de antagonismo *in vitro* mediante cultivo dual bacteria-hongo. **A)** BA97, **B)** BN17, **C)** BA100, **D)** BA93, **E)** BN20, **F)** BN4, **G)** BN1, **H)** BR20 e **I)** CONTROL *M. phaseolina*.

Cuadro 2. Bioensayo de antagonismo *in vitro* contra *M. phaseolina*.

Aislado	Inhibición (%)	Muestreo	Aislado	Inhibición (%)	Muestreo	Aislado	Muestreo	Inhibición (%)
BA14	-	1°	BA103	-	1°	BN20	1°	80
BA35	-	1°	BA104	-	1°	BR15	2°	-
BA48	-	1°	BA105	-	1°	BR20	2°	62.5
BA89	-	1°	BA106	-	1°	BR41	2°	-
BA90	-	1°	BA108	-	1°	BR52	2°	35
BA91	-	1°	BA109	-	1°	BR53	2°	23.5
BA92	-	1°	BA110	-	1°	BR56	2°	45
BA93	55	1°	BA111	-	1°	BR95	2°	-
BA94	-	1°	BN4	65	1°	BN1	2°	70
BA95	-	1°	BN13	35	1°	BN2	2°	-
BA97	85	1°	BN14	-	1°	BN3	2°	35
BA100	60	1°	BN16	-	1°	BN5	2°	-
BA101	-	1°	BN17	85	1°	BN8	2°	30

7.3. Mecanismos de antagonismo *in vitro*.

Se investigó la actividad antifúngica relacionada a la producción de compuestos volátiles de los cuatro aislados bacterianos seleccionados para la inhibición del crecimiento micelial de *M. phaseolina*, mediante 2 diferentes técnicas. A excepción del aislado BR20, que inhibió el crecimiento del patógeno en un 37.5 %, el resto de los

aislados tuvieron porcentajes mayores al 50 % en los cultivos duales en caja Petri dividida (Cuadro 3, Figura 3). El aislado BA97 fue el que inhibió en mayor medida el crecimiento del hongo en placa dividida con un 75 %.

Cuando los aislados bacterianos fueron confrontados a *M. phaseolina* en el método de cámara sellada, el porcentaje de antagonismo se redujo en comparación a los resultados mostrados con la técnica en placa dividida, obteniendo porcentajes que oscilaban entre el 35 y 52.5 % (Cuadro 3, Figura 4).

Finalmente, para las pruebas *in vitro* de metabolitos no volátiles, se logró observar que ninguno de los cuatro aislados contó con capacidad antagónica contra el hongo, ya que el crecimiento radial del micelio en todas las unidades experimentales fue igual con respecto a la caja control (Cuadro 3, Figura 5).

Cuadro 3. Mecanismos de antagonismo *in vitro* de los aislados BA97, BN17, BN20 y BR20.

Aislado	Metabolitos volátiles				Metabolitos no volátiles	
	Placa dividida		Cámara		Filtrado	
	Diámetro de <i>M. phaseolina</i> (cm)	Inhibición (%)	Diámetro de <i>M. phaseolina</i> (cm)	Inhibición (%)	Diámetro de <i>M. phaseolina</i> (cm)	Inhibición (%)
BA97	2.5 ^e	75	2.5 ^c	52.5	4 ^a	-
BN17	1.8 ^c	55	1.9 ^{bc}	37.5	4 ^a	-
BN20	1.5 ^d	62.5	2.5 ^{bc}	37.5	4 ^a	-
BR20	1 ^b	37.5	2.6 ^b	35	4 ^a	-
Control	4 ^a	-	4 ^a	-	4 ^a	-

Se muestran los diámetros miceliales en cada tratamiento y su respectiva inhibición (%). Resultados con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tukey, $P \geq 0.05$).

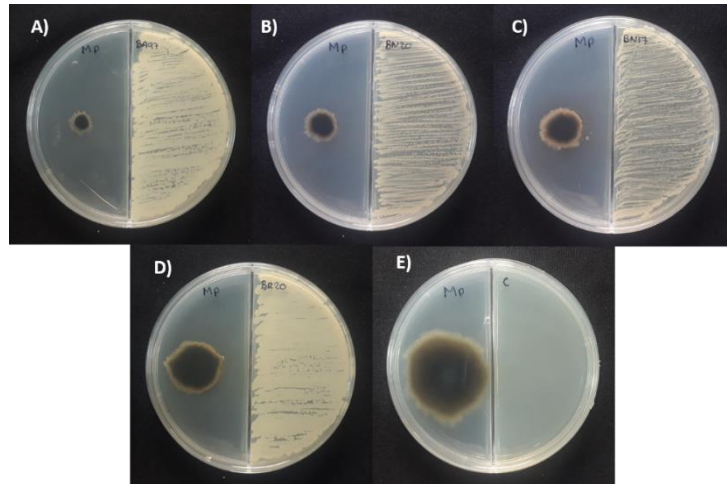


Figura 3. Prueba de antagonismo *in vitro* contra *M. phaseolina* mediante compuestos volátiles en placa dividida.

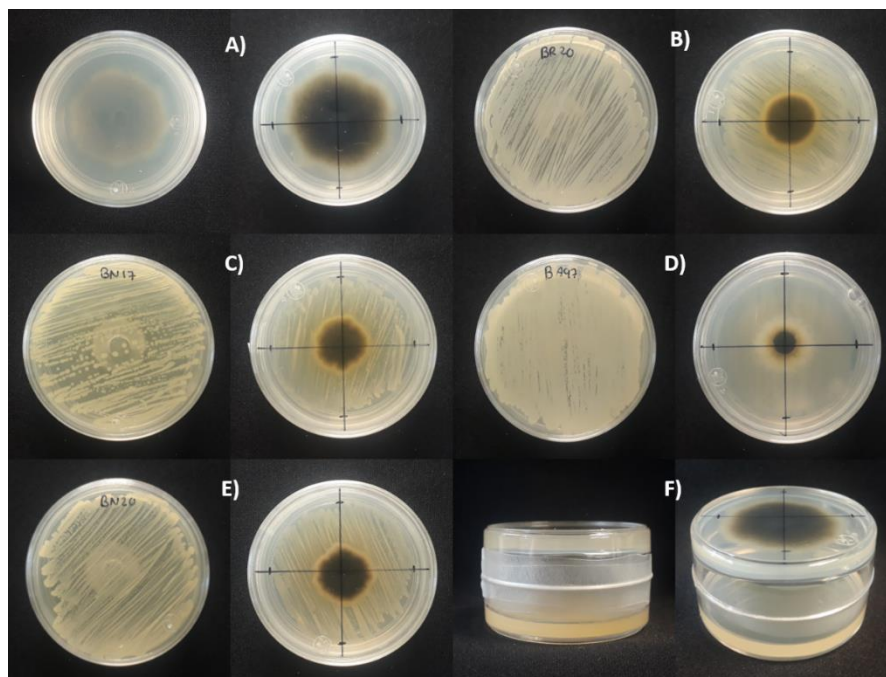


Figura 4. Prueba de antagonismo *in vitro* contra *M. phaseolina* mediante compuestos volátiles en cámara sellada. En el cultivo dual se aprecia la inhibición del crecimiento micelial de los tratamientos: **A)** Cultivo control con *M. phaseolina*, **B)** BR20, **C)** BN17, **D)** BA97, **E)** BN20 y **F)** Ejemplo de la estructura del método de cámara para VOC's.

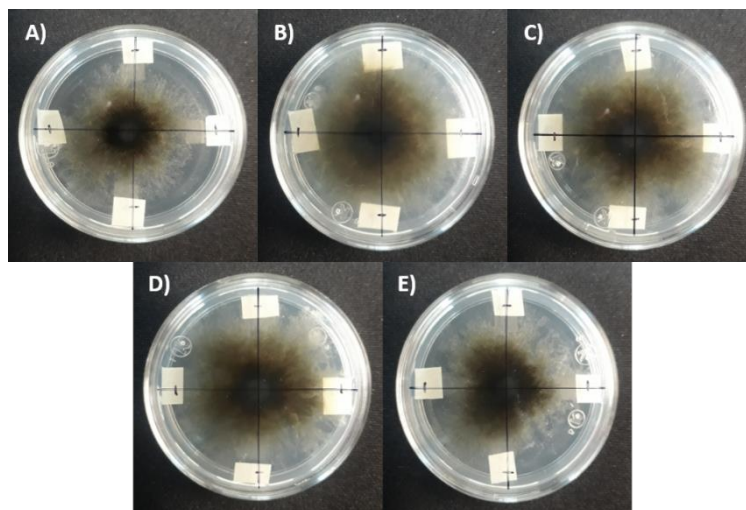


Figura 5. Prueba de antagonismo *in vitro* contra *M. phaseolina* mediante compuestos no volátiles. **A)** Cultivo control, **B)** BN20, **C)** BA97, **D)** BN17 y **E)** BR20.

7.4. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

7.4.1. Solubilización de fosfato.

Los aislados BN97, BN20, BN17 y BR20 fueron cultivados durante 7 días en agar Pikovskaya para analizar sus capacidades de solubilizar el fósforo presente en el medio. Un aclaramiento del medio mediante la formación de un halo alrededor del pozo donde se inoculó el sobrenadante bacteriano indicaría un resultado positivo, ninguno de los aislados analizados contó con esta capacidad al no observarse dicha zona de aclaramiento en las unidades experimentales, lo cual indica que no son considerados como solubilizadores de fosfato (Figura 6).

7.4.2. Producción de sideróforos.

Los ensayos para identificar si las mejores cuatro bacterias bajo estudio eran productoras de sideróforos se efectuaron en medio CAS. Posterior al periodo de incubación se pudo observar que ninguno de los aislados presentó dicha actividad (Figura 7).

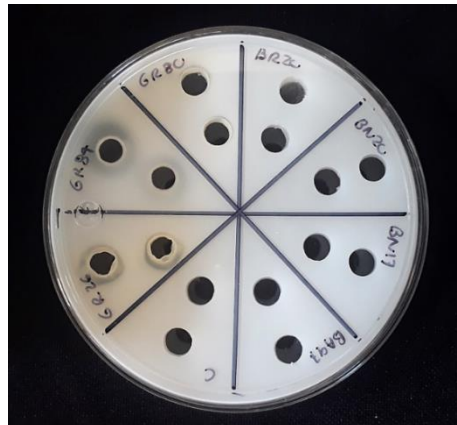


Figura 6. Pruebas de solubilización de fosfatos en agar Pikovskaya. **BA97, BN17, BN20 y BR20** no presentaron halos indicativos de esta capacidad. Las bacterias **GR84 y GR26** fueron los controles positivos, donde se observa un halo de solubilización. **C** indica el control absoluto.

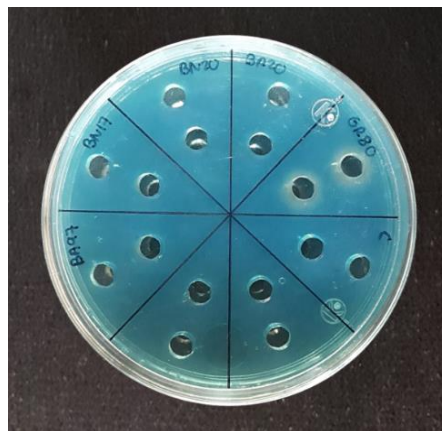


Figura 7. Prueba de producción de sideróforos en agar CAS. **BA97, BN17, BN20 y BR20** no presentaron halos indicativos de esta capacidad. La bacteria **GR80** fungió como control positivo, donde se observa un halo color naranja. **C** indica el control absoluto.

7.4.3. Producción de ácido indol acético.

A partir del método colorimétrico con el reactivo Salkowski, se determinó el potencial de los aislados para la biosíntesis de ácido indolacético (AIA). Se observaron coloraciones rosáceas muy tenues en los aislados después de ser expuestos al reactivo Salkowski (Figura 8). Por medio de la comparación con una curva de AIA, se determinó la concentración de AIA producida por los aislados. El intervalo de

concentración de AIA producido por los aislados fluctuó de entre 22.07 a 11.31 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (Figura 9).

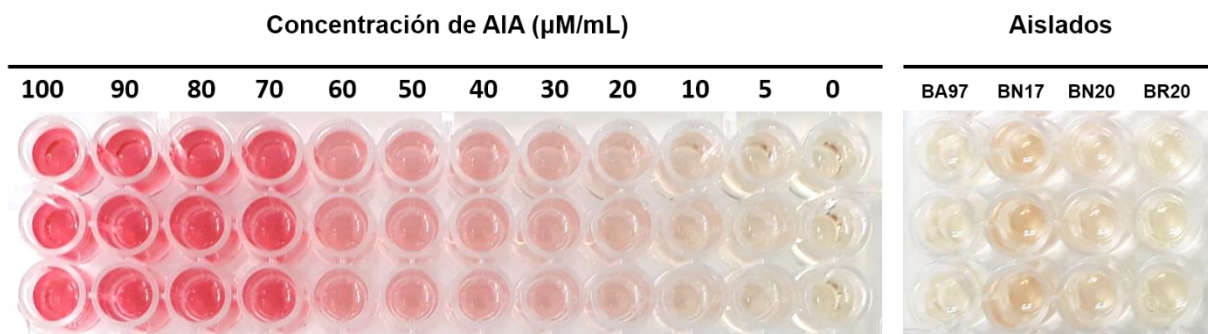


Figura 8. Producción de AIA en escala colorimétrica.

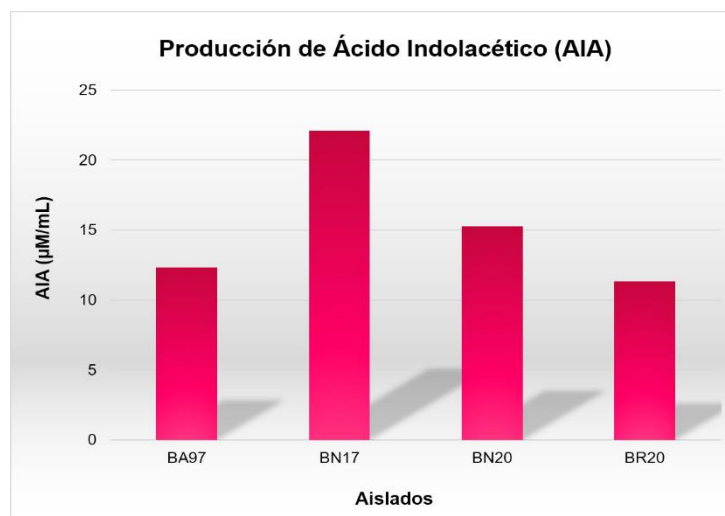


Figura 9. Concentraciones de AIA producidas por los aislados bacterianos.

7.5. Formulación líquida de aislados bacterianos.

Los aislados BA97 y BN20 fueron empleados para realizar una formulación líquida al contar con la mayor eficacia de antagonismo *in vitro* e *in planta*, respectivamente. Para esto fue necesario establecer en primera instancia un ensayo de compatibilidad entre los mejores cuatro aislados, donde se pudo observar que ninguno de los aislados ejercía un efecto de inhibición del crecimiento y proliferación del otro, por lo que se decidió trabajar con las cepas BA97 y BN20 (Figura 10).

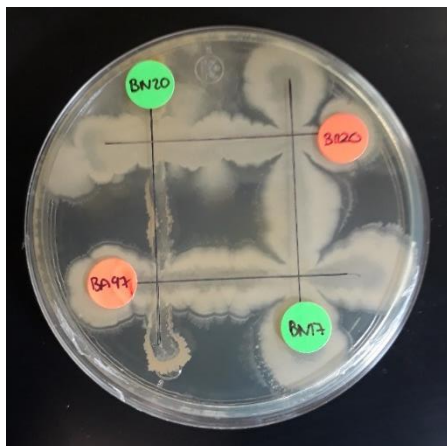


Figura 10. Ensayo de compatibilidad de los aislado.

La formulación consistió en caldo nutritivo con 2 % de glicerol para brindar mayor protección a las células, inoculado con 1.9×10^7 UFC/mL. Un día posterior al proceso de formulación, se registró la tasa de supervivencia de las células mediante recuento en placa, donde se obtuvo un rango total de entre 1 a 1.8×10^8 UFC/mL en los cuatro formulados (Cuadro 3). Cabe resaltar que, en estas 24 h de incubación, los formulados estuvieron bajo condiciones óptimas de crecimiento de 200 rpm y 30°C , por lo cual se pudo alcanzar un 100 % de supervivencia y un incremento aproximado de 7.3 veces su volumen inicial (Cuadro 4).

Finalizado el conteo de células viables, los formulados fueron almacenados en refrigeración a -4°C (BA97 1 y BN20 1) y a temperatura ambiente (BA97 2 y BN20 2). La primera lectura de vida de anaquel se realizó una semana posterior al almacenamiento. La presencia de células bacterianas viables en cada una de las formulaciones osciló entre las 1.4×10^6 a 3.9×10^6 UFC/mL (Cuadro 4).

Desde la primera lectura (7 días) de vida de anaquel, hasta la última (30 días) post-formulación, hubo una reducción en la tasa de UFC/mL de manera general (Figura 11). Para el caso de los formulados que fueron almacenados a -4°C , se logró observar que el porcentaje de viabilidad bajó drásticamente a partir de los 21 días de almacenamiento, siendo el formulado con la bacteria BN20 el que ya no contó con

células viables a partir de este periodo, mientras que el formulado BA97 1 tuvo una menor disminución de UFC/mL de 48.8 % desde la semana 1 a la semana 4 (Cuadro 4).

Por otra parte, se pudo constatar que las formulaciones almacenadas a temperatura ambiente fueron las que menor tasa de reducción tuvieron al evaluar su vida de anaquel hasta la semana 4 en comparación a las formulaciones que se encontraban en refrigeración. El formulado BN20-2 bajó su viabilidad en un 61 % con un total de 7.8×10^5 UFC/mL a las cuatro semanas. Por otra parte, el formulado que en menor medida redujo sus niveles de UFC/mL durante un mes fue el BA97-2, con una tasa de reducción del 26 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Vida de anaquel de las formulaciones en diferentes condiciones de almacenamiento.

	Población (UFC/mL)			
	Refrigeración (- 4° C)		Temperatura ambiente	
	BN20 1	BA97 1	BN20 2	BA97 2
0	1.9×10^7	1.9×10^7	1.9×10^7	1.9×10^7
24 h	1.3×10^8	1.8×10^8	1.5×10^8	1×10^8
7 días	1.4×10^6	3.9×10^6	2×10^6	2.7×10^6
14 días	1.5×10^6	6.3×10^6	1.2×10^6	4.8×10^6
28 días	0	2×10^6	8×10^5	2.5×10^6

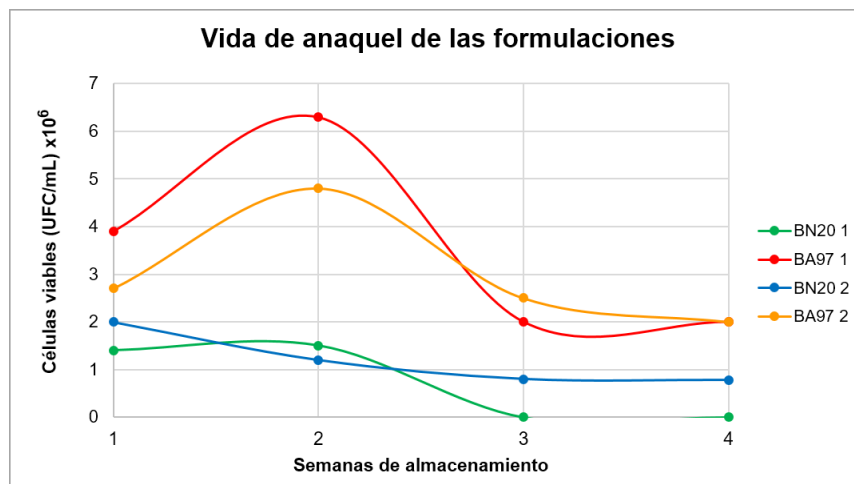


Figura 11. Vida de anaquel de las formulaciones.

7.5.1. Pruebas de antagonismo *in vitro* de la formulación en el control de *M. phaseolina*.

La actividad antagonista *in vitro* de los formulados a base de los aislados BN20 y BA97 y sus respectivas combinaciones mostró una eficacia de biocontrol al patógeno de un 20 a un 75 % a los 7 días post-formulación, destacando las formulaciones almacenadas a temperatura ambiente, las cuales presentaron los mayores porcentajes de inhibición cuando ambas formulaciones fueron combinadas (BN20 – BA97 2) con un 74 % (Figura 12, Cuadro 5, Anexo 8).

En general, el efecto de inhibición de *M. phaseolina* a los 21 días post formulación, disminuyó ligeramente en todas las formulaciones. Para aquellas resguardadas en refrigeración, BN20 1, BA97 1 y su combinación, se alcanzaron porcentajes de 16.5, 50 y 52.5 respectivamente. En cambio, los porcentajes de antagonismo de las formulaciones BN20 2, BA97 2 y su combinación (almacenadas a temperatura ambiente) fluctuaron entre el 52.5 al 72 % (Figura 12, Cuadro 5, Anexo 9).

Cuadro 5. Actividad antagonica de las formulaciones a *M. phaseolina in vitro*.

Tiempo	Formulación	Diámetro micelial (cm)	Inhibición (%)	Tiempo	Formulación	Diámetro micelial (cm)	Inhibición (%)
7 días	BN20 1	3	25	21 días	BN20 1	3.34	16.5
	BA97 1	2	50		BA97 1	2	50
	BN20–BA97 1	1.8	55		BN20–BA97 1	1.9	52.5
	BN20 2	0.94	76.5		BN20 2	1.2	70
	BA97 2	1.9	52.5		BA97 2	1.9	52.5
	BN20–BA97 2	1.04	74		BN20–BA97 2	1.14	72
	Control Mp	4	-		Control Mp	4	-

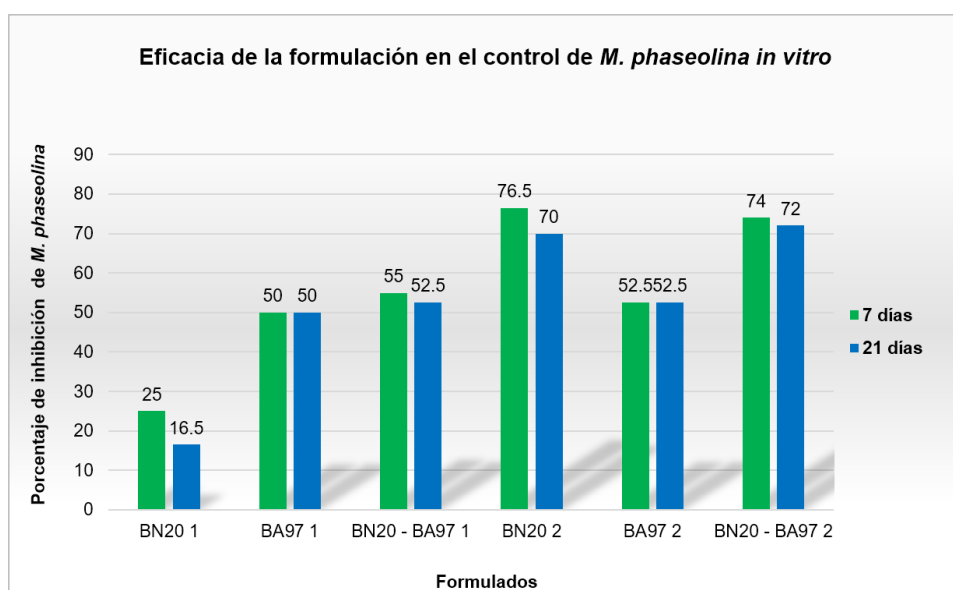


Figura 12. Eficacia *in vitro* de las formulaciones en el control de *M. phaseolina*.

7.6. Pruebas de antagonismo *in planta*.

7.6.1. Producción de inóculo bacteriano para pruebas *in planta*.

Con la finalidad de incrementar la biomasa de los aislados con potencial antagonista ante *M. phaseolina* para el establecimiento de las pruebas de antagonismo *in planta*, se estandarizó una técnica de monitoreo en medio líquido, evaluando el crecimiento de cada una de las 8 bacterias antagonicas mediante una curva de

crecimiento para establecer la fase exponencial y determinar la concentración de células viables presentes en dicha fase.

Para facilidad de manejo, las curvas de crecimiento se realizaron en dos lotes, donde el primero consistió en las cuatro bacterias con mayor porcentaje de inhibición del patógeno *in vitro* (BA97, BN20, BN1 y BN17). En la Figura 13, se muestra el comportamiento de la DO_{595} (expresada en logaritmo natural) registrada de los aislados BA97, BN20, BN1 y BN17, donde se observa que los aislados BN20 y BN17 fueron los que llegaron a su fase exponencial a las 8 h de incubación, mientras que las restantes alcanzaron esta fase a las 14 h de incubación. Por otra parte, para el caso del segundo lote, los aislados BA100, BN4, BR20 alcanzaron la fase log a las 14 h, mientras que la cepa BA93 a las 8 h (Figura 14). La concentración de UFC/mL de los aislados osciló de entre un 3.7×10^7 a 7.9×10^8 (Cuadro 6).

Al final, de los 8 aislados, se seleccionaron para pruebas de antagonismo in planta 2 aislados rizosféricos BA97 y BR20, y 2 nodulares que fueron BN17 y BN20, siendo los cuatro los que presentaron mayor porcentaje de inhibición *in vitro*.

Cuadro 6. Curvas de crecimiento de aislados bacterianos.

Aislado	Fase Log (h)	Densidad óptica (DO_{595})	Concentración (UFC/mL)
BA97	14	1.186	6.5×10^8
BN4	14	1.297	5.4×10^8
BN17	8	1.041	1.7×10^8
BN20	8	1.000	3.7×10^8
BR20	14	1.107	4×10^8
BN1	14	1.126	2.5×10^8
BA93	8	1.075	5.6×10^8
BA100	14	1.052	7.9×10^8

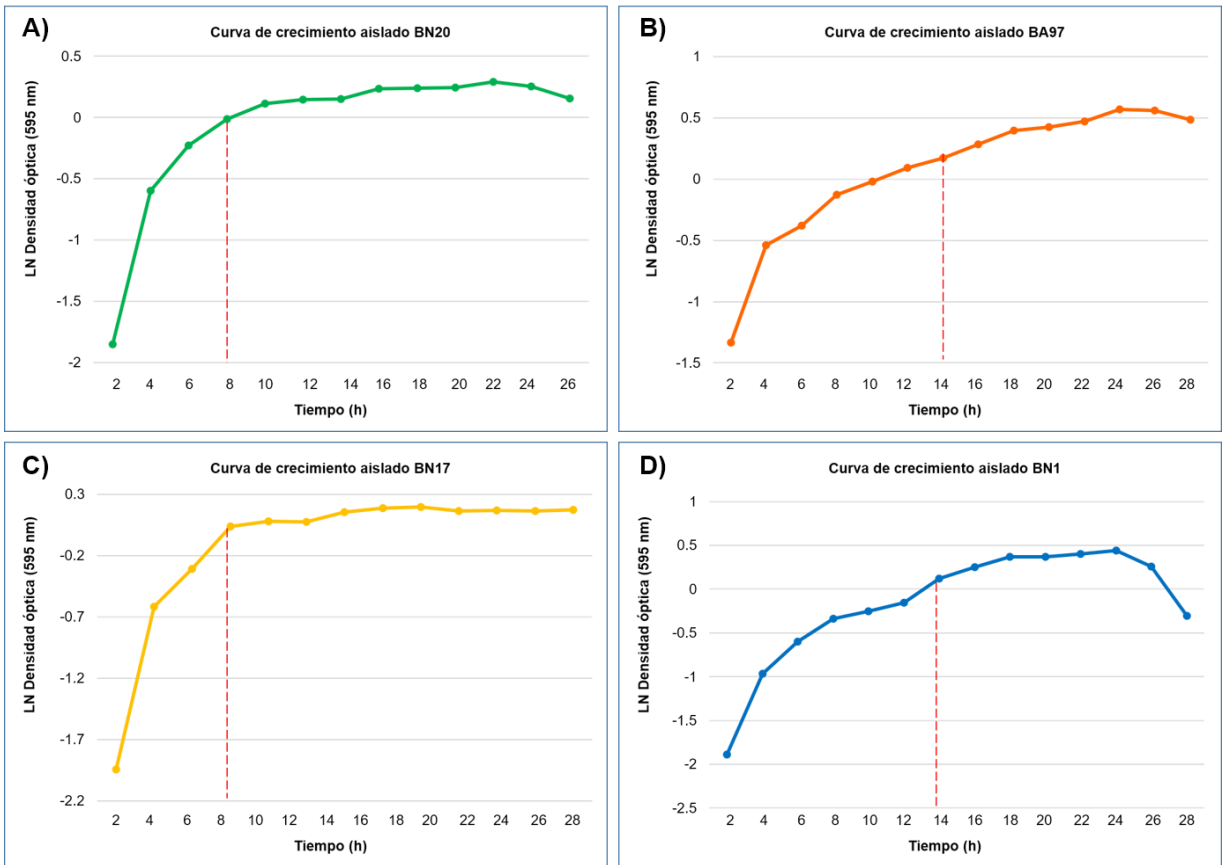


Figura 13. Curvas de crecimiento de los aislados BN20 (A), BA97 (B), BN17 (C) y BN1 (D).

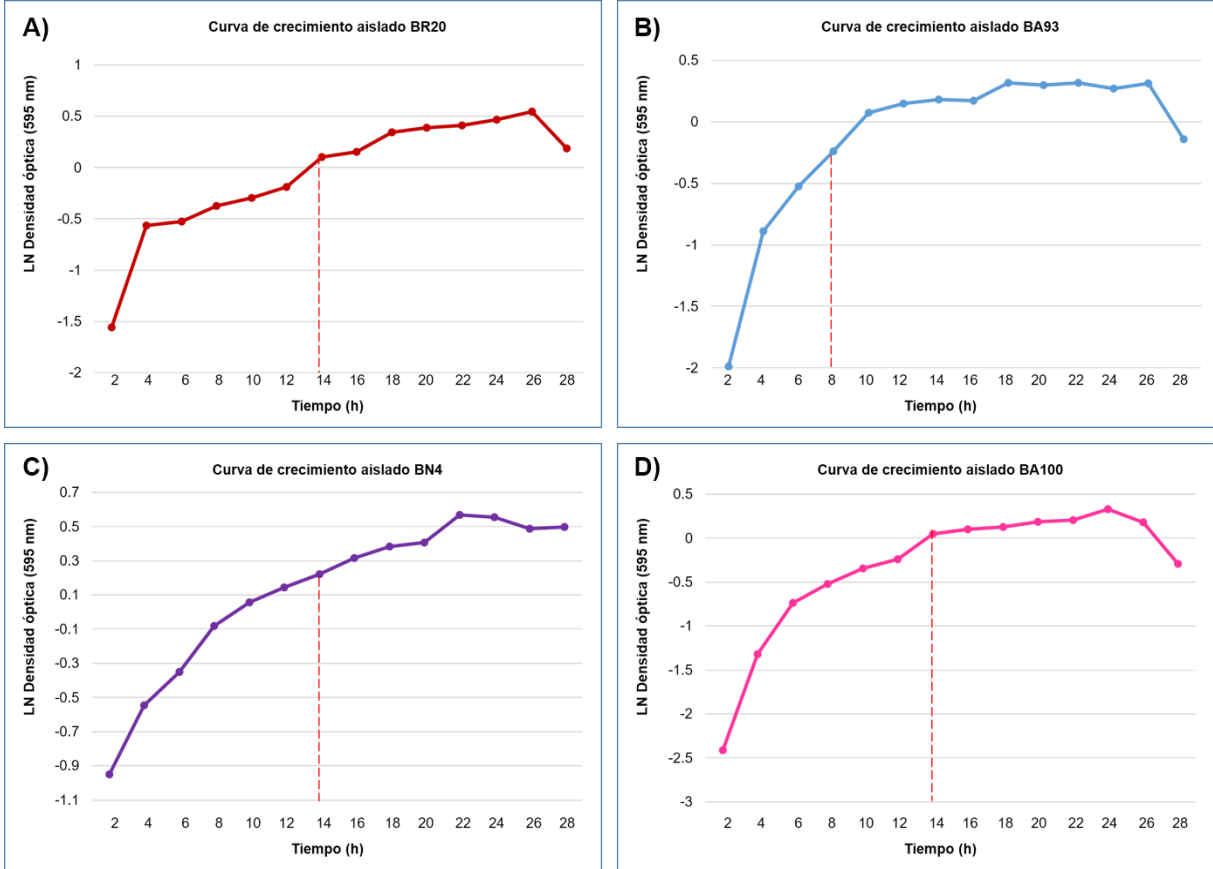


Figura 14. Curvas de crecimiento de los aislados BR20 (A), BA93 (B), BN4 (C) y BA100 (D).

7.6.1.1. Producción de inóculo fúngico para pruebas in planta.

Con la finalidad de generar el inóculo del hongo, obteniendo unidades infectivas como fragmentos de hifas, microesclerocios o picnidios, se realizó una suspensión del hongo mediante raspado del micelio. Aproximadamente 10 cajas de medio PDA colonizado en su totalidad por *M. phaseolina* con alrededor de 10 días de crecimiento fueron resuspendidas con 10 mL de agua destilada estéril cada una. El producto de la suspensión fue homogenizado para hacer diluciones seriales y sembrar en medio PDA con el objetivo de obtener unidades formadoras de colonias determinando la concentración del mismo. El rango de UFC/mL de *M. phaseolina* en suspensión osciló

de entre 3.1×10^3 a 3.6×10^3 , siendo constante durante una semana posterior a la obtención del inóculo en suspensión.

A la par, se efectuó una observación, en microscopio, de las estructuras presentes en el micelio del hongo y en la suspensión de inóculo. Dichas estructuras consistieron primordialmente en microesclerocios y pequeños segmentos de hifas (Figura 15). No se encontró presencia de conidios o picnidios.

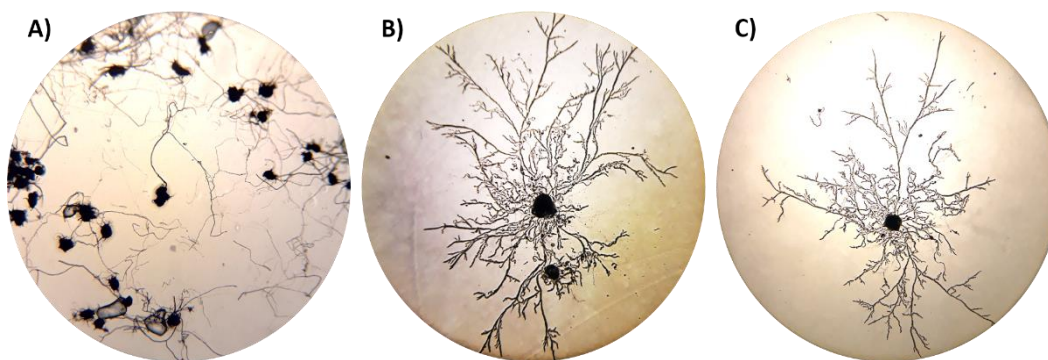


Figura 15. Estructuras de *M. phaseolina*. **A)** Microesclerocios visualizados a partir de una muestra de micelio; **B y C)** Microesclerocios germinados procedentes de diluciones seriales del inóculo fúngico. El tamaño de las colonias corresponde a 4 y 5 mm respectivamente.

7.6.1.2. Ensayo de patogenicidad del inóculo de *M. phaseolina*.

Para estos experimentos, se logró infectar las semillas de frijol a los siete días posteriores a la inoculación con el hongo a una concentración de 3.4×10^3 UCF/mL. En los tratamientos control (C1-C3), las plántulas crecieron de manera normal, con longitudes de tallo y raíz de hasta 16.3 y 37 centímetros respectivamente (Cuadro 7), mientras que en los tratamientos con *M. phaseolina*, ninguna de las 5 unidades experimentales logró germinar adecuadamente, presentando signos, como la presencia de micelio y síntomas característicos de la pudrición carbonosa ocasionada por el patógeno bajo estudio, tal es el caso de necrosis de cotiledón, tallo y raíz (Figura 16).

Cuadro 7. Bioensayo de patogenicidad del inóculo de *M. phaseolina*.

VARIABLES	TRATAMIENTOS							
	C1	C2	C3	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5
Longitud tallo (cm)	16.3	15.2	11.2	2	2	0	2	1.5
Longitud raíz (cm)	13.5	22	12	3.3	4.5	0	7.2	6.2

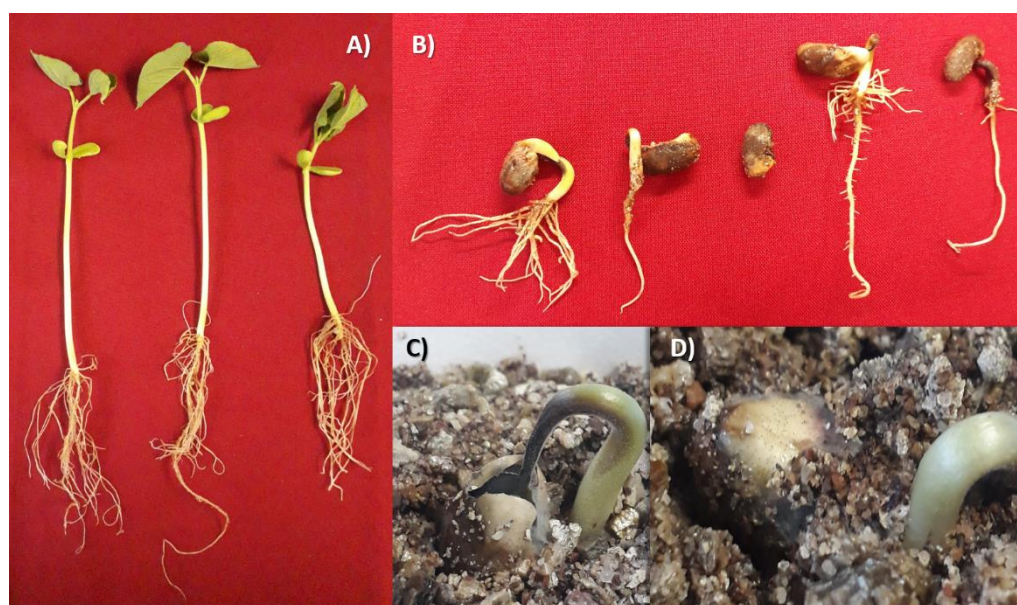


Figura 16. Bioensayo de patogenicidad de *M. phaseolina* (3.4×10^3 UCF/mL). **A)** Controles; **B)** Tratamientos con 1mL de inóculo fúngico; **C)** Necrosis de tallo y cotiledón, síntomas característicos de la enfermedad; **D)** Signos de la enfermedad (presencia de micelio y formación de microesclerocios).

7.6.2. Escala de severidad de *M. phaseolina* en plantas de frijol.

El porcentaje de incidencia de la enfermedad en este bioensayo fue de 100%, ya que las sesenta unidades experimentales inoculadas con el patógeno mostraron síntomas de la enfermedad en mayor o menor medida, lo cual permitió el agrupamiento de dichas afecciones en 6 niveles distintos, del 0 al 5, dónde el nivel 0 (sin sintomatología) solo estuvo conformado por las plantas control (Figura 17). La escala de severidad creada consistió en lo siguiente:

Nivel 0= Sin presencia de signos o síntomas de pudrición carbonosa (Figura18).

Nivel 1= 1 al 5 % de la superficie cubierta presentaba síntomas de la enfermedad (cotiledón) (Figura 19).

Nivel 2= 6 al 20 %. Se observa necrosis más avanzada a lo largo de los cotiledones, parte superior y base del tallo, así como también en raíz. Plántulas con dos hojas verdaderas, en algunos casos una de ellas con malformaciones (Figura 20).

Nivel 3= 21 al 40 %. Necrosis cubriendo totalmente los cotiledones y avanzando hacia el tallo (aproximadamente 2 cm por debajo del cotiledón). Hojas verdaderas de tamaño reducido y longitud de las plantas considerablemente menor a comparación de los niveles 1 y 2 (Figura 21).

Nivel 4= 41 al 70 %. Ninguna de las plántulas cuenta con emergencia de las primeras hojas verdaderas, cotiledones y tallos necrosados (Figura 22).

Nivel 5= 71 al 100 %. Semillas sin germinar o solo desarrollan pequeños tallos y raíces que se observan con síntomas de la enfermedad como necrosis total y formación de microesclerocios (Figura 23).

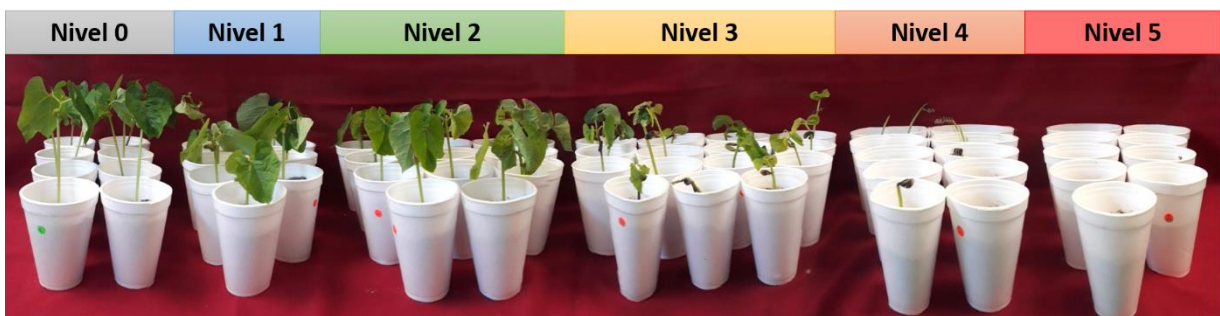


Figura 17. Resultados de escala de severidad de *M. phaseolina* en plantas de frijol.



Figura 18. Nivel 0 de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.



Figura 19. Nivel 1 de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.



Figura 20. Nivel 2 de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.



Figura 21. Nivel 3 de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.



Figura 22. Nivel 4 de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.



Figura 23. Nivel de Escala de Severidad *M. phaseolina* en frijol.

7.6.3. Bioensayo de antagonismo *in planta* de aislados bacterianos contra *M. phaseolina*.

Después de una semana del establecimiento del experimento, las plantas fueron cosechadas y se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad, así como también se registraron los parámetros de longitud y peso de las plantas.

Los niveles de la escala de severidad establecidos fueron del 0 al 5, donde el valor 0 correspondió a los tratamientos control, mientras que los valores 1, 2, 3, 4 y 5 correspondían a diferentes porcentajes de infección del patógeno en orden ascendente. Todas las plantas de los tratamientos *M. phaseolina* (Mp) y hongo-bacteria (Mp-BN97, Mp-BN17, Mp-BN20 y Mp-BR20) mostraron sintomatología asociada a los niveles del 1 al 5 estipulados en la escala de severidad, dando como resultado una incidencia del 100 % (Cuadro 8).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante Kruskal-Wallis para datos no paramétricos cualitativos ordinales en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 25. El análisis de los resultados permitió inferir, con un valor *P* de 0.05, que existe diferencia significativa entre las medianas de los tratamientos, donde el tratamiento Mp-BN20 corresponde a aquel que ejerce mayor control del patógeno en la interacción tripartita planta-patógeno-bacteria, ya que es el único tratamiento estadísticamente diferente al control hongo (Mp) (Figura 24, Cuadro 8). Este resultado se correlaciona con los porcentajes de índice de la enfermedad (IE %) calculados para cada tratamiento, donde el IE (%) obtenido en el tratamiento control patógeno (Mp) fue de 77.14 %, mientras que, en los tratamientos con bacteria, se pudo observar una reducción en este índice, especialmente cuando el patógeno fue retado con el aislado BN20 (Mp-BN20), obteniendo un IE de 34.28 %, equivalente a aproximadamente la mitad del IE (%) del tratamiento Mp (Cuadro 8).

A partir de los índices de enfermedad de cada uno de los tratamientos patógeno-bacteria se calculó el efecto de biocontrol de cada uno de los aislados bacterianos, donde nuevamente el tratamiento Mp-BN20 resultó ser el más eficaz en el control de la enfermedad con un porcentaje de biocontrol de 55.50 %.

Cuadro 8. Agrupación de niveles de escala por tratamiento con *M. phaseolina*.

Tratamientos	Grado de severidad (nivel escala)						
	1	2	3	4	5	IE(%)	EB(%)
Mp-BA97	1	3	1	2	0	54.42	33.3
Mp-BN17	0	2	0	5	0	68.57	11.11
Mp-BN20	3	3	1	0	0	34.28	55.50
Mp-BR20	1	1	0	5	0	65.71	14.81
Mp	0	0	3	2	2	77.14	-
Total	5	9	5	14	2		

Se representan los valores medios de todas las réplicas por nivel, aquellos con las mismas letras muestran resultados no significativos ($P \geq 0.05$). Los valores con signos \pm representan una desviación estándar entre diferentes réplicas del mismo tratamiento. **IE (%)** y **EB (%)** hacen referencia al porcentaje de índice de enfermedad y porcentaje de efecto de biocontrol respectivamente.

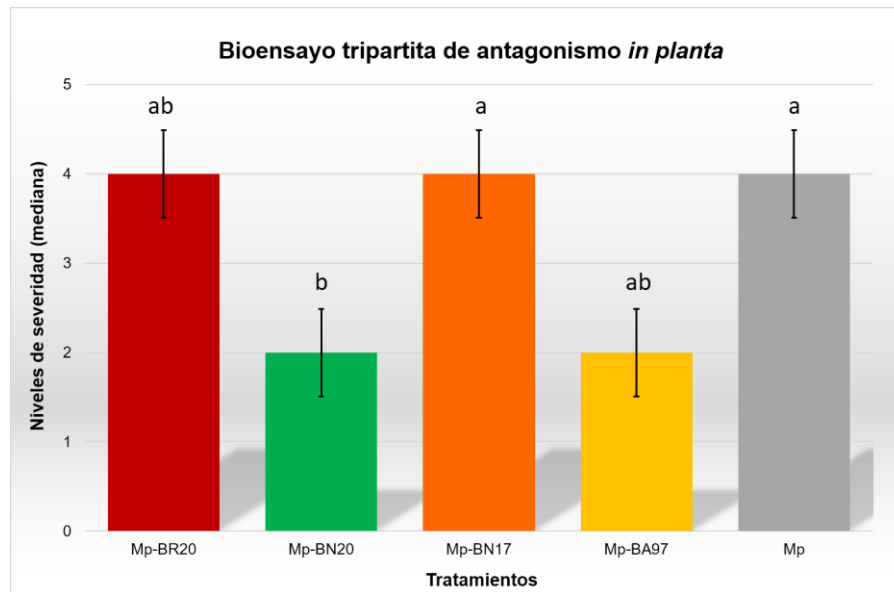


Figura 24. Bioensayo de antagonismo *in planta*. La organización en niveles y la comparación de medianas se llevó a cabo mediante Kruskal-Wallis, con una comparación de medianas con el ajuste Bonferroni. Las barras con la misma letra no difieren significativamente ($P \geq 0.05$)

Por otra parte, los datos numéricos de los parámetros de crecimiento evaluados en este bioensayo, fueron sometidos a un análisis de Kruskal-Wallis, ya que resultaron ser datos no paramétricos por no cumplir con las pruebas de normalidad.

En cuanto a la variable longitud foliar, no se presentó una diferencia significativa entre los tratamientos bacteria-patógeno con sus respectivos controles (hongo y absoluto) (Figura 25), sin embargo, en los datos obtenidos para longitud radical de las unidades experimentales, el tratamiento Mp-BN20 mostró diferencia estadística con respecto al control Mp, pero no entre los demás tratamientos hongo-bacteria (Figura 26). En relación a los controles, ninguno de los aislados bacterianos mostró algún efecto adverso en el crecimiento comparándolo con el control absoluto.

De igual manera, los datos relacionados con el peso fresco y seco, de parte foliar y radical, fueron analizados para identificar el efecto de cada uno de los tratamientos. En las variables longitud foliar, peso seco foliar y peso seco de raíz no se encontró diferencia significativa entre tratamientos bacteria-hongo, así como tampoco entre estos y su control hongo (Mp). Sin embargo, se observa diferencia estadística significativa del tratamiento Mp-BN20 sobre la longitud de raíz en comparación con el tratamiento Mp (Figuras 27-30).

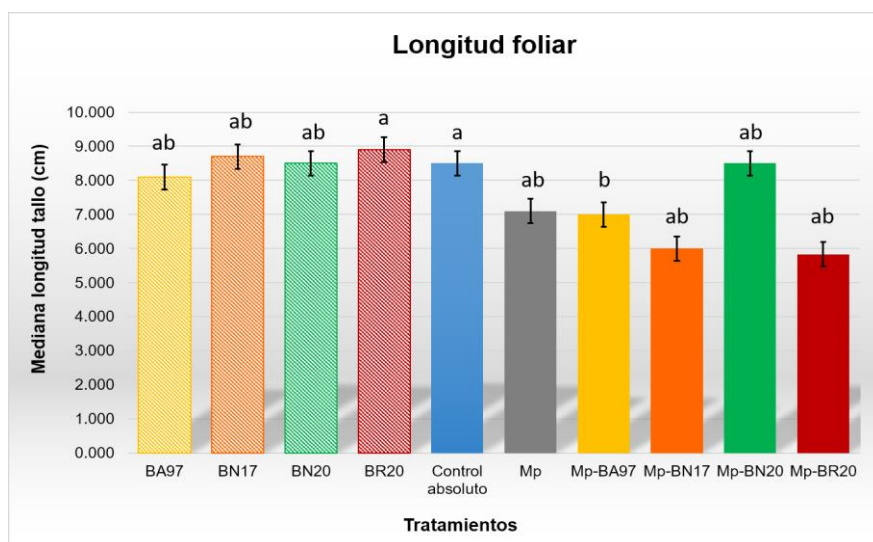


Figura 25. Longitud foliar del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria (BA97, BN17, BN20 y BR20) y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

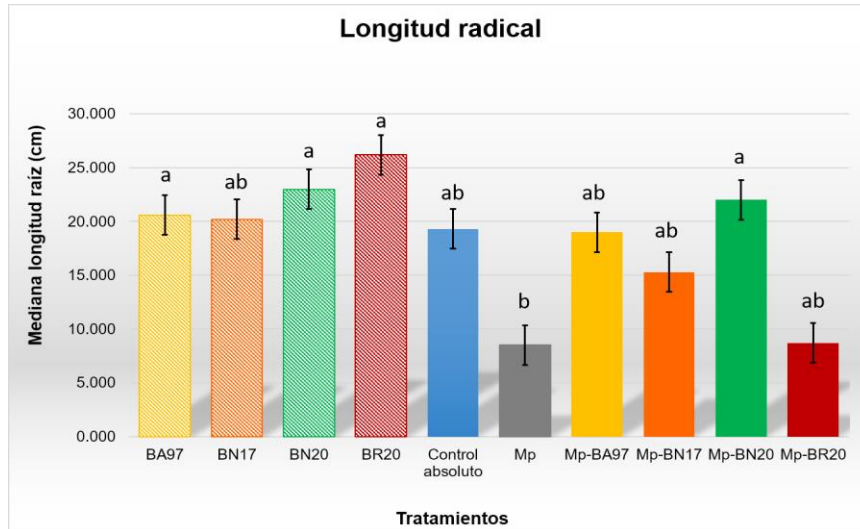


Figura 26. Longitud radical del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria BA97, BN17, BN20 y BR20) y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

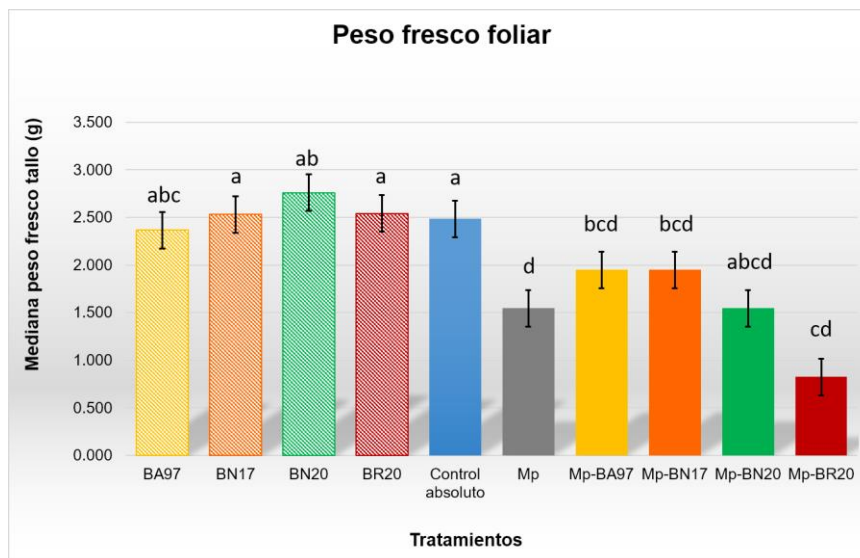


Figura 27. Peso fresco foliar del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

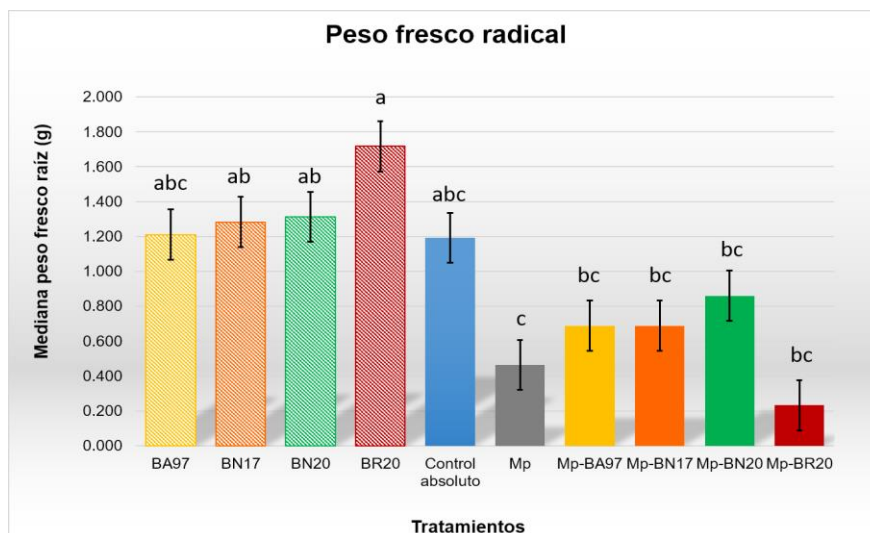


Figura 28. Peso fresco radical del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

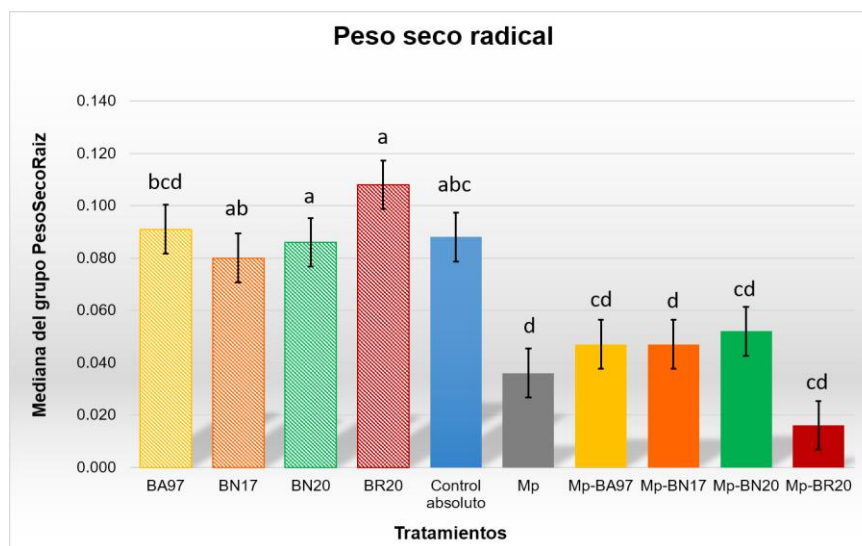


Figura 29. Peso seco radical del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

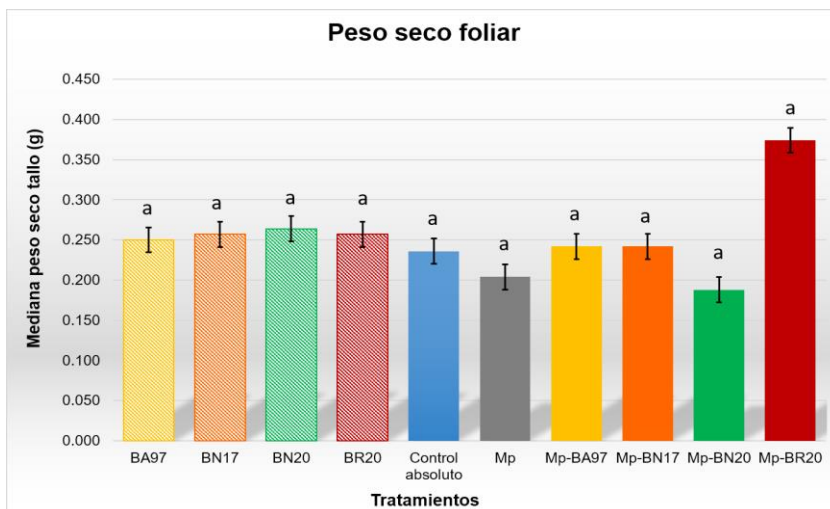


Figura 30. Peso seco foliar del bioensayo tripartita. Comparación de medianas entre tratamientos bacteria-patógeno, control hongo (Mp) y controles bacteria y absoluto. Las barras con la misma letra no difieren significativamente (Kruskal-Wallis, Bonferroni $P \geq 0.05$). Se muestran barras de error típico.

7.7. Identificación molecular de los aislados bacterianos.

El análisis de las secuencias de la zona 16S del ADN ribosomal de los aislados BA97, BN17, BN20 y BR20 mostró una identidad del 90 al 99 % a especies del género *Bacillus*. Se realizó un árbol filogenético con las secuencias de los aislados y con las secuencias de referencia obtenidas del Genbank, donde, los cuatro aislados se identificaron como *Bacillus* sp. (Figura 31).

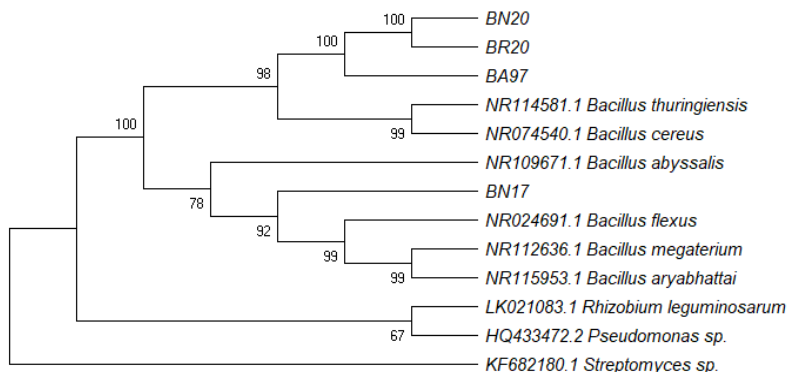


Figura 31. Relación filogenética entre los aislados bacterianos y especies representativas basada en las secuencias del gen 16S del ADNr construidas utilizando el método de neighbor-joining. Los números indican el porcentaje de las probabilidades de bootstrap determinadas para 1,000 réplicas.

7.8. Identificación molecular del hongo *M. phaseolina*.

Las secuencias de la zona 18S y 28S del ADN ribosomal del hongo utilizado en este estudio fueron comparadas con los datos del GenBank, encontrando un 99.8 % de identidad con secuencias reportadas para la especie *M. phaseolina*. El análisis de las secuencias y su agrupación en un árbol filogenético, ubica al aislado Mp en un grupo junto con cepas de la especie *M. phaseolina*, mientras que lo separa de las especies *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *S. sclerotiorum*, usadas como secuencias de grupos externos (Figura 32).

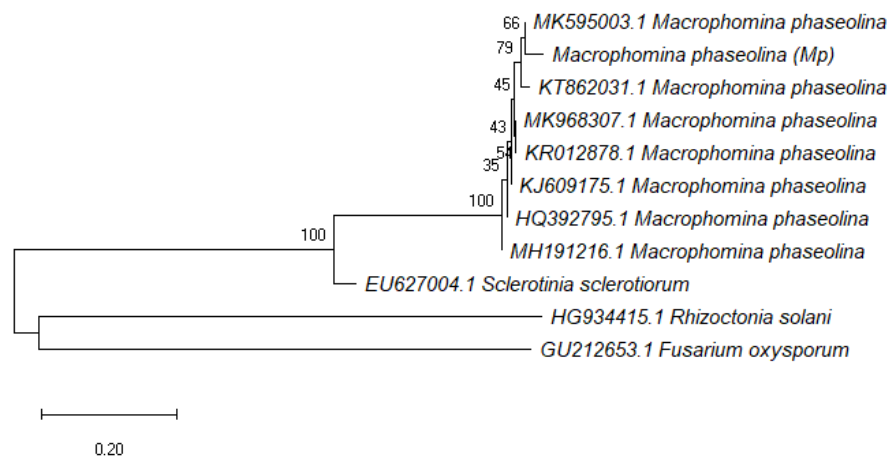


Figura 32. Árbol filogenético basado en las zonas 18S y 28S del ADN ribosomal del aislado fúngico Mp. Los números indican el porcentaje de las probabilidades de bootstrap determinadas para 1,000 réplicas. La barra de escala muestra la tasa de sustitución de nucleótidos por sitio.

8. DISCUSIONES

8.1. Colección microbiana de aislados rizósfericos y nodulares.

La producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) tiene importancia mundial debido a su valor económico, nutricional y cultural, sin embargo, los rendimientos de la producción de esta leguminosa pueden verse afectados por la incidencia de aproximadamente 45 enfermedades diferentes a lo largo del ciclo de vida de este cultivo (Martins *et al.*, 2018; Meziadi *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2014). Dentro de estas afecciones, se encuentra la pudrición carbonosa ocasionada por el hongo *M. phaseolina*. Esta enfermedad se asocia con la presencia de microesclerocios en el suelo que infectan con mayor frecuencia en periodos de sequía, donde reduce la productividad de los cultivos y se refleja negativamente en los ingresos monetarios del productor. Ante esto, el uso de microorganismos antagónicos, tales como las bacterias rizosféricas para el control biológico de fitopatógenos, como el hongo *M. phaseolina*, podría fungir como una alternativa prometedora incluir dentro de un manejo integrado de ésta enfermedad.

Por a lo anterior, es necesario llevar a cabo un escrutinio masivo y dirigido para la búsqueda de aislados bacterianos con potencial efecto de biocontrol de enfermedades en campo, creando colecciones bacterianas, las cuales juegan un papel muy importante, ya que permiten conservar a los microorganismos de manera *ex situ*, lo que las hace un depósito de recursos genéticos microbianos, resguardando material biológico puro y estable, conservando la diversidad de bacterias nativas, las cuales pueden ser estudiadas para elucidar su potencial biotecnológico (Weng *et al.*, 2003; Montes de Oca, 2008; Sharman y Shouche, 2014).

En la región norte del estado de Sinaloa, se han realizado previamente estudios relacionados con las comunidades bacterianas en diferentes cultivos de importancia económica como tomate, maíz y frijol (Cordero-Ramírez *et al.*, 2013, Figueroa-López, 2011, Torres-Rodríguez, 2013). En estas investigaciones, se crearon bancos de microorganismos de hasta más de 11,000 aislados de la rizósfera, con el objetivo de

seleccionar aquellos aislados que promovieran el crecimiento vegetal y que contaran con capacidad antagónica a *F. oxysporum* en cultivos de tomate, a *F. verticillioides* en cultivares de maíz y a *M. phaseolina* y *S. sclerotiorum* en frijol. En el presente trabajo, se creó una colección de 243 aislados bacterianos provenientes de la rizósfera y nódulos de plantas de frijol, sin embargo, en el presente estudio el 100% de los microorganismos fueron viables posterior a la crioconservación.

En términos de bioseguridad, un banco de germoplasma bacteriano debe ser estudiado antes de su utilización como agente de control biológico en campo, esto para determinar, entre otras características, su capacidad hemolítica. Algunos estudios han demostrado que algunas cepas de bacterias rizosféricas usadas como biofungicidas son patógenas para el humano (Villareal-Delgado *et al.*, 2018, Ceuppens *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016), tal es el caso de las especies *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, que se han encontrado en algunos alimentos contaminados, provocando infecciones eméticas y diarreicas a nivel mundial. Por otra parte, cepas de *B. thuringiensis* también se han asociado con intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados. Ante esto, se infiere que la posible virulencia de estas cepas es debido a la acción de toxinas como la hemolisina BL, principalmente (Villareal-Delgado *et al.*, 2018, Oh *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2016).

Por este motivo, una prueba sencilla para descartar patogenicidad en los aislados de la colección, fue la realización de pruebas de hemólisis en agar sangre, donde el 71% de los aislados fueron β -hemolíticos; 13% hemolíticos parciales (α) y finalmente, el 16% no presentó ningún tipo de hemólisis (γ -hemolíticos), siendo los aislados ideales para continuar con las pruebas de interés sin que representen un riesgo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cordero-Ramírez *et al.*, 2011 y Figueroa-López *et al.*, 2016, quienes obtuvieron también mayor porcentaje de aislados con hemólisis total (β -hemolíticos).

8.2. Efecto antagónico *in vitro* de la colección microbiana.

Los treinta y nueve microorganismos no hemolíticos (16%) de la colección fueron retados en ensayos *in vitro* contra *M. phaseolina*, teniendo porcentajes de inhibición de hasta el 85%, el cual es un rango de antagonismo más alto que lo reportado por otros estudios. Al- alani y colaboradores (2012), encontraron una cepa de *Rhizobium japonicum* que era capaz de inhibir el crecimiento de *M. phaseolina* y de *F. solani* en un 64% y 65%, respectivamente, mediante el empleo de un filtrado bacteriano. Por su parte, se han encontrado porcentajes de antagonismo *in vitro* mayores al 50 %, usando la técnica de cultivo dual en medio PDA, como lo establecido por Torres y colaboradores en 2016; empleando bacterias de las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Además de estos géneros de bacterias, existen algunos reportes de actinobacterias del género *Streptomyces* que han logrado ejercer un biocontrol *in vitro* contra *M. phaseolina* hasta en un 64% (Shrivastava *et al.*, 2017), así como también las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* con porcentajes de inhibición de 71 y 55% respectivamente (Hernández *et al.*, 2016).

Dos de los aislados con mayores porcentajes de antagonismo a *M. phaseolina*, *in vitro* (BA97 y BN20), inhibieron el crecimiento micelial, mediante cultivo dual, de otros hongos fitopatógenos de frijol de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*. Característica que evidencia su amplio rango acción en el manejo de enfermedades para un mismo cultivo. Existen algunos trabajos sobre el control *in vitro* de diversos fitopatógenos del cultivo de frijol, donde se demuestra el efecto antagónico de cepas de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus* y *Pseudomonas* como agentes de biocontrol sobre los patógenos de frijol; *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *S. sclerotium*, *R. solani* y del género *Colletotrichum* sp (Kumar *et al.*, 2016). Por su parte, en el trabajo elaborado por Torres y colaboradores (2017) se reporta a una cepa de *B. amyloliquefaciens* con efecto antagónico a diversos hongos como *Penicillium* sp., *R. solani*, *F. solani*, *S. rolfsii* y *S. sclerotium*.

8.3. Mecanismos de antagonismo in vitro y pruebas bioquímicas.

Con la finalidad de incrementar el conocimiento acerca de las bacterias con las que se trabajó, se decidió llevar a cabo el análisis de los posibles mecanismos de antagonismo y promoción de crecimiento vegetal mediante pruebas *in vitro* y de naturaleza bioquímica. Estas pruebas permitieron inferir los mecanismos empleados por los aislados estudiados en el presente trabajo para dichas capacidades.

Ninguna de las cuatro bacterias (BN20, BA97, BN17 y BR20) fue capaz de solubilizar fosfato mediante pruebas en agar Pikovskaya o producir sideróforos en agar CAS, pero si contaron con capacidad para producir ácido indol acético (Cuadro 9), características muy representativas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Cassán *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010; Filippi *et al.*, 2011; Bhattacharyya y Jha, 2012; Krey *et al.* 2013). En numerosos trabajos, se menciona que algunas bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Streptomyces*, *Erwinia*, *Serratia* y *Staphylococcus* se han identificado como bacterias solubilizadoras de fosfato que promueven el crecimiento de las plantas (Sudhakar *et al.*, 2000; Mehnaz y Lazarovits, 2006, Shrivastava *et al.*, 2017, Alijani *et al.*, 2019). Por otra parte, la producción de sideróforos se ha relacionado con la supresión de enfermedades, compitiendo con los patógenos por el hierro presente en suelos rizosféricos, lo que resulta en un mayor rendimiento del cultivo ya que mejoran, de manera indirecta, el crecimiento vegetal (O'Sullivan y O'Gara 1992, Khamna *et al.*, 2009, Jarikrishnan *et al.*, 2014).

En el ensayo de producción de AIA, los aislados fueron capaces de producir esta auxina en cantidades de 11 a 22 $\mu\text{M}/\text{mL}$, lo cual indica que, mediante esta fitohormona, los aislados pudiesen conferir un mayor desarrollo en la planta por medio de la formación de raíces o por división celular. Bacterias del género *Bacillus* han sido reportadas como cepas capaces de producir AIA en cantidades de 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Díaz Rodríguez *et al.*, 2019), sin embargo, especies del género *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, pueden producir altos niveles de AIA, con concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ryu y Patten, 2008; Hayat *et al.*, 2012), y, en adición de triptófano (precursor

de la síntesis de esta fitohormona) en el medio, se han logrado aumentar la producción de AIA en esta especie, alcanzando hasta 350 µg/ml después de 72 h de incubación (Bose *et al.*, 2016 en Díaz Rodríguez *et al.*, 2019).

Por otra parte, los cuatro aislados evaluados presentaron la producción de compuestos volátiles en las pruebas de antagonismo *in vitro* contra *M. phaseolina* mediante dos métodos distintos de cultivo dual con porcentajes de inhibición de hasta 75 %. En cambio, presentaron resultados negativos al ser evaluados en las pruebas de inhibición utilizando sobrenadantes filtrados. Gacitúa y colaboradores (2009), analizaron la inhibición del crecimiento de *M. phaseolina* mediante compuestos volátiles producidos por cepas de *B. stearothersophilus* TM 008 y *B. amyloliquefaciens* VIII 016, cuyos porcentajes de antagonismo fluctuaron entre 4 y 44 %.

Se sabe que el género *Bacillus* produce una gran cantidad de antibióticos peptídicos (Tabbene *et al.*, 2009), así como compuestos volátiles de bajo peso molecular y varios lipopéptidos con actividades específicas contra hongos fitopatógenos (Arrebola *et al.*, 2009; Chaves-López *et al.*, 2015; Ben Slimene *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Cuadro 9. Mecanismos de antagonismo *in vitro* y pruebas bioquímicas para la promoción vegetal.

Aislado	Metabolitos volátiles		Metabolitos no volátiles	Promoción del crecimiento vegetal		
	Placa dividida	Cámara	Filtrado	Solubilización de fosfato	Producción sideróforos	Producción AIA (µM/mL)
BA97	75 %	52.5 %	-	-	-	12.32
BN17	55 %	37.5 %	-	-	-	22.07
BN20	62.5 %	37.5 %	-	-	-	15.24
BR20	37.5 %	35 %	-	-	-	11.31

8.4. Efecto antagónico en la interacción tripartita Planta-Bacteria-*M. phaseolina*.

En el establecimiento de bioensayos de antagonismo *in planta* primordialmente se estandariza la producción de inóculos a utilizar, esto con la finalidad de establecer concentraciones homogéneas y poder evaluar el efecto de los tratamientos. En el presente estudio, se generó inóculo bacteriano de las ocho bacterias con mayor antagonismo *in vitro* con el objetivo de estandarizar su desarrollo y seleccionar el punto de crecimiento exponencial, ya que es en esta etapa cuando las células se encuentran en división constante y con una producción máxima de metabolitos secundarios, los cuales pueden estar relacionados en la actividad antifúngica que se pretendía investigar en las pruebas de interacción tripartita (Toure *et al.*, 2004).

La fase logarítmica del crecimiento de dichas bacterias fue establecida, de manera general a las 8 y 14 h. Cabe mencionar que, en la mayoría de los estudios sobre PGPRs antagónicas, los inóculos empleados no son realizados basándose en una cinética de crecimiento específica para cada aislado, sino que los microorganismos son incubados por periodos de entre 24 a 72 h, suponiendo que estos han pasado su fase exponencial, contando con mayor masa celular y con una máxima producción de metabolitos útiles para el biocontrol (Singh *et al.*, 2010; Choudhary, 2011; Kumar *et al.*, 2016).

Respecto a la producción de inóculo fúngico de *M. phaseolina* en este estudio, inicialmente se había seguido el método de propagación en arroz (Castellanos *et al.*, 2011), sin embargo, el inóculo fue susceptible a contaminación, al no permanecer completamente en condiciones asépticas durante el proceso de elaboración, además representó una opción no factible para el desarrollo del proyecto debido al largo periodo de incubación (20 días apróx.), motivo por el cual se optó por realizar la técnica de suspensión de micelio, donde se obtuvo de manera rápida un inóculo en líquido con microesclerocios y fragmentos de hifas como estructuras infectivas. Los microesclerocios representan el inóculo primario de este hongo, por lo cual su formación y desarrollo sucede de manera rápida, mediante la aglomeración de hifas

(Knox-Davis, 1966; Dhingra y Sinclair, 1978; Khan, 2007; Kaur *et al.* 2012) y en pocas ocasiones se logran formar otras unidades infectivas como picnidios o conidios, mediante su inducción en medios suplementados en laboratorio (Ahmed y Ahmed, 1969; Dhingra y Sinclair, 1978; Ma y Hartman, 2010).

Las concentraciones del inóculo obtenido en esta investigación variaron de entre 3.1×10^3 a 3.6×10^3 UFC/mL. Diversos autores reportan concentraciones de inóculo con concentraciones similares o más altas de entre 6.3×10^3 a 10^6 UFC/mL obtenidas bajo distintas metodologías, generalmente en propagación en semillas de avena, sorgo y trigo (Singh *et al.* 2008; Choudhary, 2011; Baggio *et al.* 2019).

Conociendo la naturaleza del inóculo de *M. phaseolina* se seleccionó una concentración intermedia de 3.4×10^3 UFC/mL, la cual fue probada en un bioensayo de patogenicidad generando un 100 % de incidencia de la enfermedad donde las unidades experimentales presentaron síntomas de necrosis en semilla (al no germinar), tallo, cotiledones y raíz. Así como también se generó una escala de severidad, la cual contó con 6 niveles (0 al 5), donde en los niveles 4 y 5 los daños ocasionados en las plántulas son potencialmente severos, ya que en su mayoría las unidades experimentales presentaron micelio y microesclerocios en semilla, tallo y raíz, lo cual sería un indicativo de la alta virulencia del inóculo fúngico analizado. Difícilmente se logra observar estos altos niveles de infección en campo, debido a que los niveles de unidades infectivas en el suelo y material vegetal contaminado en campo llegan a ser tan elevados y dirigidos como los utilizados en experimentación a nivel laboratorio. Ante esto, Abawi y Pastor-Corrales (1988) y Songa *et al.* (1997) comentan que la inoculación artificial de este patógeno incrementa la severidad de la enfermedad en los bioensayos realizados.

Existen pocos trabajos donde han utilizado escalas de severidad predeterminadas para la pudrición carbonosa (*M. phaseolina*) en diversos cultivos. Diourte *et al.* (1995) en ensayos de patogenicidad implementó una escala de 5 niveles para analizar la severidad en la pudrición del tallo en plantas de sorgo. Abawi y Pastor-Corrales (1990) propusieron una escala constituida también por 5 niveles de severidad

para variedades de frijol, las cuales pueden ser empleadas para analizar la incidencia y severidad de otras enfermedades causadas por patógenos como *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e incluso, por nematodos del género *Meloidogyne* que afectan a estas leguminosas.

Cabe mencionar que, para este trabajo, esta escala resulta más eficaz ya que está establecida bajo las mismas condiciones que el bioensayo de interacción tripartita, lo que hace más adecuada para su comparación.

Cuando se analizó la interacción tripartita para conocer la capacidad de antagonismo *in planta* de los aislados bacterianos, de igual manera que en el ensayo previo de infección, se obtuvo un 100% de incidencia, con sintomatología asociada a los 5 niveles estipulados, sin embargo, los daños más severos fueron observados en las plantas inoculadas solo con el patógeno (Mp). El tratamiento Mp-BN20 ejerció mayor control del hongo en la interacción analizada con respecto al tratamiento control Mp (77.14 % IE), con un porcentaje de efecto de biocontrol (EB) de 55.50% y un índice de enfermedad (IE) de 34.28%, seguido del tratamiento Mp-BA97 donde hubo un IE de 54.45% y un EB de 33.3% a los 7 días post inoculación (Cuadro 8). A pesar del poco tiempo de establecimiento del bioensayo y la diferencia de concentración de inóculos (donde se le dio preferencia al hongo con una mayor cantidad de este), los tratamientos con bacteria pudieron exhibir su efecto de biocontrol.

Al-alani y colaboradores (2012), reportaron que un aislado de *R. japonicum* (10^8 UFC/mL) redujo el índice de la enfermedad causada por *M. phaseolina* en plantas de soya en follaje y en raíz con porcentajes de IE de 34.43 y 36.10% en comparación con el control hongo (50 y 69.40 %, respectivamente). Este mismo efecto se logró observar cuando el aislado bacteriano se retó al tratamiento combinado con suelo contaminado con *M. phaseolina* y *F. solani*. Por su parte, Minaxi y Saxena (2010) inocularon semillas de *Vigna radiata* con 4×10^8 UFC/semilla demostraron un decremento drástico en el porcentaje de incidencia de la enfermedad en un 84.7% en el suelo infestado con *M. phaseolina* (1×10^5 UFC/g) en comparación con las semillas sin inocular en el suelo infestado por el hongo donde el IE fue del 97.25%.

Es importante mencionar que, el efecto de antagonismo *in planta* en diversos estudios puede diferir dependiendo de la naturaleza de los aislados bacterianos, el cultivo a utilizar, las condiciones del establecimiento del bioensayo, la manera de inocular los tratamientos y la duración del bioensayo. Gopalakrishnan y colaboradores (2011) retaron aislados de la rizósfera de arroz en ensayos tripartita Sorgo-Bacteria-*M. phaseolina* observando que los daños ocasionados por el patógeno fueron bajos, y el efecto de las bacterias consistió, además de inhibir la colonización del patógeno, en promover el crecimiento vegetal de plantas de sorgo. Este resultado se puede deber al tipo de inoculación implementada, ya que antes de sembrar las semillas, éstas fueron embebidas en inóculo bacteriano durante 1 h, permitiendo la colonización de la bacteria en la testa de la semilla, además, una vez germinadas las plantas, se aplicaron dosis de inóculo bacteriano (5 ml con 10^8 UFC/mL) en dos ocasiones antes de la evaluación de las plantas.

Respecto a los parámetros de crecimiento de las plantas de frijol en el bioensayo tripartita, se encontró diferencia estadística con respecto al control patógeno en la longitud radical de las unidades experimentales del tratamiento Mp-BN20. Una posible limitación en esta variable pudo haber sido que no se calculó el volumen de raíz, que si bien, no hay diferencias estadísticas entre tratamientos y sus controles, en la evidencia fotográfica si es posible observar diferencias en cuanto a volumen radicular entre estos tratamientos (Anexo 7). En lo que respecta a los controles, podemos observar que ninguno de los aislados bacterianos exhibió algún efecto negativo en el crecimiento de las plantas de frijol respecto al control absoluto. En comparación a estos resultados, Minaxi y Saxena en 2010 reportan que plantas de frijol mungo tratadas con una cepa de *Pseudomonas aureginosa* mostraron una longitud de tallo y raíz significativamente mayor que el tratamiento control en suelos sin inocular e infestados con *M. phaseolina* a los 30 días post inoculación.

En la comparación de pesos frescos de parte área se constató que no existió diferencia entre los tratamientos (Mp-Bacteria) y el control hongo, pero si entre estas y el control absoluto. La similitud en pesos frescos se puede deber a que el peso de los cotiledones, semillas o tallos primarios de las unidades más dañadas por el hongo

son equivalentes al de las estructuras bien desarrolladas de los demás tratamientos. Un factor importante en esta variable es el tiempo del establecimiento de la interacción. Sharma y colaboradores en el 2018, evaluaron esta misma interacción en frijol mungo observado diferencias significativas en las variables de peso fresco foliar y de raíz a los 30 días, debido a que en este periodo las plantas contaban con mayor elongación de tallo y desarrollo de ramificaciones aéreas y en raíz.

8.5. Identificación molecular de aislados bacterianos rizosféricos y nodulares.

En el presente estudio, los aislados BN20 y BN17, fueron extraídos de nódulos de frijol, mientras que los aislados BA97 y BR20 se obtuvieron de rizósfera. Los cuatro aislados se agruparon, mediante el análisis de secuencias y su posterior organización filogenética, dentro del género *Bacillus*. Este género de bacterias está altamente reportado en diversos trabajos de investigación como bacterias antagónicas ante hongos fitopatógenos y como promotoras de crecimiento vegetal (Chen *et al.*, 2010; El-Bendary *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2017) , sin embargo, especies del género *Bacillus* pueden fungir como endófitos de plantas y contar con características similares a las reportadas para especies de los géneros *Rhizobium*, *Mezorhizobium* y *Bradyrhizobium*, ya que benefician a las plantas al promover la nodulación y el crecimiento vegetal (Bai *et al.*, 2002; Geetha *et al.*, 2008; Selvakumar *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011, Chinnaswamy *et al.*, 2018).

Otra de las características importantes de especies de *Bacillus* con actividad antagónica a hongos, es que cuentan con una ventaja adicional sobre otras especies de bacterias, ya que forman endosporas que les permiten tolerar condiciones ambientales extremas de pH y temperatura, factores que hace posible su uso en el almacenamiento de productos comerciales (Francis *et al.*, 2010; El-Bendary *et al.*, 2016; Sabaté *et al.*, 2017). Además, estas bacterias tienen potencial para sintetizar metabolitos con actividad antagónica, como los lipopéptidos de la familia surfactina, iturinas, fengycinas, polimixinas, kurstakinas, y bacitracinas (Sabaté *et al.*, 2017).

En cuanto al efecto antagónico de cepas de *Bacillus* ante *M. phaseolina*, estudios como los elaborados por Torres *et al.* (2016), demuestran que cepas de *B.*

amyloliquefaciens y *B. subtilis*, muestran capacidad de inhibir al patógeno por al menos dos mecanismos diferentes: síntesis de lipopéptidos y competencia entre microorganismos. Por su parte, Hashem *et al.* (2017), reporta que la inoculación de *B. subtilis* en frijol mungo aumentó las actividades enzimáticas de las superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasa, glutatión reductasa, además de que esta asociación planta-bacteria, mitigó la infección por *M. phaseolina* debido a un aumento de los ácidos indol acéticos, indol butírico y ácido abscísico.

8.6. Identificación molecular de la cepa de *M. phaseolina*.

Por otra parte, la cepa de hongo utilizada en este estudio fue previamente clasificada según sus características morfológicas y culturales como *Macrophomina phaseolina*, y, mediante el análisis de secuencias se logró comprobar que, efectivamente el aislado fúngico correspondía al género *Macrophomina* y a la especie *phaseolina*, con un 99 % de similitud con las secuencias ITS de aislados de *M. phaseolina* en frijol común (KR012878.1), caña de azúcar (KJ609175.1), girasol (KT862031.1), garbanzo (HQ392805.1), soya (MK595003.1), sorgo (MK968307.1) y lenteja (MH191216.1) del banco de datos del NCBI.

Múltiples investigaciones se han realizado para identificar a este hongo como el agente causal de las pudriciones de raíz en diversos cultivos de interés agrícola alrededor del mundo (Jana *et al.*, 2005; Suriachandraselvan *et al.*, 2005; Khan, 2007; Das *et al.*, 2008; Babu *et al.*, 2010; Saleh *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2011; Abed-Ashtiani *et al.*, 2018; Hyder *et al.*, 2018; Mir *et al.*, 2018; Baggio *et al.*, 2019)), sin embargo, no hay muchos estudios en relación a la información genética sobre *M. phaseolina*. El avance más reciente sobre la base molecular de la patogénesis de *M. phaseolina* fue realizado en 2012 por Islam y colaboradores, generando la secuencia del genoma de este fitopatógeno, con un tamaño de 49.295 Mb y 14.249 genes. Se encontraron una gran cantidad de genes que codifican para oxidasas, peroxidasas, enzimas hidrolíticas para la degradación de polisacáridos, entre otras enzimas como las carbohidrato esterasas, las cuales pueden ser una de las principales características que le permiten

al hongo ser un organismo polífago, siendo la primera línea de ataque durante la invasión y colonización de sus hospederos (Radwan *et al.*, 2013).

En relación al amplio rango de patogenicidad de *M. phaseolina*, se han realizado comparaciones de estructuras genómicas de este con *Fusarium oxysporum*, el cual es uno de los hongos fitopatógenos y toxigénicos más importantes, encontrando que, tienen grandes áreas de sintenia. De los 14.249 genes de *M. phaseolina*, el 54,10% de ellos, se comparten con *F. oxysporum*, el gran número de genes compartidos entre estas especies, permite inferir que puede haber estrategias comunes para infectar un amplio rango de huéspedes (Islam *et al.*, 2012).

9. CONCLUSIONES

1. A partir de la creación de la colección de bacterias asociadas a rizósfera y nódulos de frijol se obtuvieron 39 aislados no hemolíticos.
2. De la subcolección no hemolítica, 8 aislados contaron con potencial de antagonismo *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* con porcentajes de inhibición mayores a 50 %.
3. Cuatro de los 8 aislados antagónicos *in vitro* fueron seleccionados para evaluar su antagonismo in planta, donde el aislado BN20 fue el que mostró mayor capacidad de reducir la severidad de la enfermedad en la interacción tripartita planta-bacteria-patógeno, con un índice de enfermedad del 34.28 %, ejerciendo un efecto de biocontrol del 55.50 %.
4. Los aislados BAN20, BA97, BN17 y BR20 se identificaron molecularmente como *Bacillus* sp.

10. PERSPECTIVAS

- Para una mejor evaluación de los efectos de biocontrol y promoción de crecimiento vegetal, se podrían establecer ensayos de interacción tripartita con un mayor tiempo de incubación.
- Realizar pruebas de eficacia de las bacterias seleccionadas en campo.
- Analizar mediante cromatografía de gases los compuestos volátiles que producen las bacterias.
- Determinar características bioquímicas de las bacterias antagónicas y promotoras de crecimiento como la producción de quitinasas, lipasas, amilasas, producción de HCN.
- Analizar la inducción de resistencia sistémica en la interacción tripartita Bacteria-Planta-*M. phaseolina* mediante la expresión de genes o por medio de actividades enzimáticas involucradas en la respuesta a patógenos.
- Llevar a cabo una formulación en sólido de los mejores aislados, BN20 y BA97, como consorcio microbiano y evaluar su efecto en el control biológico de *M. phaseolina* en frijol a nivel de laboratorio y campo.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G. y Pastor-Corrales, M. A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diganosis, Research Methodologies, and Management Strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 128 pp.
- Abed-Ashtiani, F., Narmani, A., Arzanlou, M. 2018. *Macrophomina phaseolina* associated with grapevine decline in Iran. *Phytopathol Mediterr* 57(1):107–111.
- Ahmed, N. and Ahmed, Q., A. 1969. Physiologyc specialization in *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby, causing stem rot of jute, *Corchorus* species. *Mycopathol.* 39, 129-138.
- Al-Ani, R. A., Adhab, M. A., Mahdi, M. H., & Abood, H. M. 2012. *Rhizobium japonicum* as a biocontrol agent of soybean root rot disease caused by *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Plant Protection Science - UZEI (Czech Republic)*, v. 48.
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. 2019. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. *International Journal of Food Microbiology*, 307, 108276. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276.
- Apodaca-Sánchez, M., A. 2006. Principales enfermedades infeccionas del frijol en Sinaloa y su manejo. En Memoria de Jornada de Transferencia de Tecnología del Cultivo del Frijol. Fundación Produce AC.
- Arias, R., S., Ray, J., D., Mengistu, A., Schefer, B., E. 2011. Discriminating microsatellites from *Macrophomina phaseolina* and their potential association to biological functions. *Plant Pathol* 60:709–718.
- Armenta-Bojórquez, A., D., García Gutiérrez, C., Camacho-Báez, R., Apodaca-Sánchez, M. A., G., M. L., & Nava-Pérez, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai* 6(1): 51-56.
- Ashraf, M.A., Asif, M., Zaheer, A., Malik, A., Ali, Q., Rasool, M. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria & sustainable agriculture: a review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 704–709.

- Asran, M. & Buchenauer, H. 2003. Pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates on maize (*Zea mays* L.) cultivars and relation with deoxynivalenol and ergosterol contents. *Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz* 110:209–219.
- Avis, T. J., Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733-1740. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Babu, B., K., Reddy, S., S., Yadav, M., K., Sukumar, M., Mishra, V., Saxena, A., K., Arora, D., K. 2010. Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. *Indian J Microbiol* 50(2):199–204.
- Baggio, J. S., Cordova, L. G., & Peres, N. A. 2019. Sources of Inoculum and Survival of *Macrophomina phaseolina* in Florida Strawberry Fields. *Plant Disease*, 103(9), 2417-2424. doi: 10.1094/pdis-03-19-0510-re.
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D., L., & Driscoll, B., T. 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3), 230-238. doi: 10.1139/w02-014.
- Bhattacharyya, P., N., y Jha, D., K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9.
- Bose, A., Kher, M., M., Nataraj, M., Keharia, H. 2016. Phytostimulatory effect of indole-3-acetic acid by *Enterobacter cloacae* SN19 isolated from *Teramnus labialis* (L. f.) Spreng rhizosphere. *Biocatal Agric Biotechnol* 6:128–137.
- Boyette, C., D., & Hoagland, R., E. 2015. Bioherbicidal potential of *Xanthomonas campestris* for controlling *Conyza canadensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 25(2), 229-237.
- Carbonaro, M., Maselli, P., y Nucara, A. 2015. Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>.

- Cardoso EJBN & Freitas SS. 1992. A rizosfera. In: Cardoso EJBN, Tsai SM, Neves PCP (eds) Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, Campinas, pp 41–57.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol*;45:28–35.
- Castellanos, G., Jara, C. E., Mosquera, G. 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 232 p. (Publicación CIAT No. 375)
- Ceuppens, S., Boon, N. and Uyttendaele, M. 201). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*. 84:433-450. <https://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12110>.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>.
- Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., & Wang, X. 2009. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 675-684. doi: 10.1007/s11274-009-0222-0.
- Chen, Z.-M., Li, Q., Liu, H.-M., Yu, N., Xie, T.-J., Yang, M.-Y., . . . Chen, X.-D. 2009. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1353-1360. doi: 10.1007/s00253-009-2162-x
- Chinnaswamy, A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., de la Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., . . . Pueyo, J. J. 2018. A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, 172(3), 295–308. doi:10.1111/aab.12420.

- Choudhary, D. K. 2011. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2287-2295. doi: 10.1007/s10529-011-0699-0
- Chung, S., Lim J. H., Kim, S. D. 2010. Powder Formulation Using Heat Resistant Endospores of Two Multi-functional Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Bacillus* Strains Having *Phytophthora* Blight Suppression and Growth Promoting Functions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(4), 485-492. doi: 10.3839/jksabc.2010.074.
- CODESIN [Internet]. Reporte de agricultura en Sinaloa para el año 2017. 2017. Disponible en: <http://sinaloaennumeros.com/agricultura-en-sinaloa-2017/>.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., & Barka, E. A. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959. doi: 10.1128/aem.71.9.4951-4959.2005.
- Cook, R. J. 2002. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annu Rev Phytopathol* 38:95–116.
- Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Figueroa-Lopez, A. M., Mancera-López, M. E., Martínez-Álvarez, J. C., Apodaca-Sánchez, M. Á., & Maldonado-Mendoza, I. E. 2013. Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Journal of Basic Microbiology*, 53(10), 838-847.
- Crous, P., Slippers, B., Wingfield, M., Rheeder, J., Marasas, O., Phillips, A., . . . Groenewald, J. Z. 2006. Resolving phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235-253.
- Daigle, D. J., Connick, W. J., & Boyetchko, S., M. 2002. Formulating a weed-suppressive bacterium in "pesta". *Weed Technology*, 16(2), 407-413.
- Das IK, Fakrudin B, Arora DK (2008) RAPD cluster analyses and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. *Microbiol Res* 163:215–224.

- Das, K., Katiyar, V., Goel, R. 2003. 'P' solubilization potential of plant growth promoting *Pseudomonas* mutants at low temperature. *Microbiology Research*. 158, 359–362.
- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. 1972. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia baticola*) from the same soybean plant. *Phytopathology*. 62: S1108.
- Dhingra, O. y Sinclair, J. 1978. *Biology and Pathology of Macrophomina phaseolina*. Universidade Deferal de Vicosa. Minas Gerais, Brasil. 166 pp.
- Dhingra, O.D., Sinclair, B. J. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press. p. 434.
- Díaz Rodríguez, A. M., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., & de los Santos Villalobos, S. 2019. Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology*, 28(5), 569-577. doi: 10.1007/s10646-019-02053-x.
- Díaz, F. A. 1992. Evaluación de genotipos de frijol e influencia de la temperatura con relación a la pudrición carbonosa. *Agric. Téc. Méx.* 18: 3-10.
- Diourte, M., Starr, J. L., Jeger, M. J., Stack, J. P., & Rosenow, D. T. 199. Charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance and the effects of water stress on disease development in sorghum. *Plant Pathology*, 44(1), 196-202. doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02729.x
- du Toit, L. J., Kirby, H., W., Pedersen, W. L. 1997. Evaluation of an aeroponics system to screen maize genotypes for resistance to *Fusarium graminearum* seedling blight. *Plant disease* 81:175–179.
- Duniway, J. M. 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology*. 92:1337–1343.
- Edraki, V. y Banihashemi, Z. 2010. Phenotypic diversity among isolates of *Macrophomina phaseolina* and its relation to pathogenicity. *Iran, J. Plant. Path.* 46: 93-100.
- El-Bendary, M. A., Hamed, H. A., & Moharam, M. E. 2016. Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 173-178. doi: 10.1016/j.bcab.2016.02.001.
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. 201. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action

- mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013.
- FAO [Internet]. Information on post-harvest operations. 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/legumes/en/>
- Fernandez, F., Gepts, P., Lopez, M. 1985. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. en: López Genes, Marceliano; Fernández O., Fernando O.; Schoonhoven, Aart van (eds.). Frijol: Investigación y producción. Programa de las Naciones Unidas (PNUD); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 61-78.
- Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955-964. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.10.021.
- Figuroa-López, A. M. 2011. Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Figuroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., Maldonado-Mendoza, I. E. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer Plus*. doi:10.1186/s40064-016-1780-x.
- Filippi MCC, da Silva GB, Silva-Lobo VL, Côrtes MVCB, Moraes AJG, Prabhu AS. 2011. Leafblast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biol Control*;58:160–6.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. 2002. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 11th Ed. Mosby, St. Louis, MO.
- Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D. 2010. The Gram-positive side of plant–microbe interactions. *Environ. Microbiol.* 1, 1–12.
- Fukui, R., Schroth, M.N., Hendson, M., Hancock, J.G. 1994. Interaction between strains of Pseudomonads in sugar beet spherospheres and the relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. *Phytopathology* 84, 1322–1330.

- Gacitúa A, S., Valiente F, C., Díaz P, K., Hernández C, J., Uribe M, M., & Sanfuentes V, E. 2009. Identification and Biological Characterization of Isolates with Activity Inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Chilean journal of agricultural research*, 69(4). doi: 10.4067/s0718-58392009000400007.
- Gacitúa A, S., Valiente F, C., Díaz P, K., Hernández C, J., Uribe M, M., & Sanfuentes V, E. 2009. Identification and Biological Characterization of Isolates with Activity Inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Chilean journal of agricultural research*, 69(4). doi: 10.4067/s0718-58392009000400007.
- Gaige, A. R., Ayella, A., & Shuai, B. 2010. Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), 412-418. doi: 10.1016/j.pmpp.2010.07.001
- Geetha, R., Falguni, S., Anjana, J., D., Archana, G. 2008. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Biores. Technol.* 99:4544–4550.
- Glickmann, E. and Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*; 61: 793-796.
- Gopalakrishnan, S., Humayun, P., Kiran, B. K., Kannan, I. G. K., Vidya, M. S., Deepthi, K., & 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(6), 1313-1321. doi: 10.1007/s11274-010-0579-0.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. 2014. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377. doi: 10.1007/s13205-014-0241-x
- Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Sharma, M. P., Kotchoni, S., O. 2014. Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (12), 3149–3161.

- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598.
- Hayat, R., Sheirdil, R. A., Iftikhar-ul-Hassan, M., & Ahmed, I. 2012. Characterization and identification of compost bacteria based on 16S rRNA gene sequencing. *Annals of Microbiology*, 63(3), 905-912. doi: 10.1007/s13213-012-0542-4.
- Hernández Pérez, D., Díaz Castellanos, M., Quiñones Ramos, R., Santos Bermúdez, R., Portal González, N., & Herrera Isla, L. 2017. Empleo de rizobacterias para la protección de plantas de frijol frente al tizón ceniciento (*Macrophomina phaseolina*). *Centro Agrícola*, 44, 5-12.
- Hyder S, Gondal AS, Ahmed R, Sahi ST, Rehman A, Hannan A, Khan DG. 2018. First report of charcoal rot in tomato caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. from Pakistan. *Plant Dis Notes*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1663-PDN>.
- Islam, M. S., Haque, M. S., Islam, M. M., Emdad, E. M., Halim, A. , Hossen, Q. M. M., Hossain, M. Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, M. S. 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics* 13: 493.
- Islam, M. S., Haque, M. S., Islam, M. M., Emdad, E. M., Halim, A., Hossen, Q. M. M., . . . Alam, M. 2012. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC Genomics*, 13(1), 493. doi: 10.1186/1471-2164-13-493.
- Jaisingh, R., Kumar, A., Dhiman, M., 2016. Isolation and characterization of PGPR from rhizosphere of Sesame indicum L. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3, 238–244.
- Jana TK, Singh NK, Koundal KR, Sharma TR. 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. *Can J Microbiol* 51(2):159–164.
- Jha, C. K., Saraf, M., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 J. Agric. Res. Dev.* 5, 108–119.
- Jing, Y. D., He, Z. L., Yang, X. E. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J Zhejiang Univ Sci* 8(3):192–207.

- Jones, B. V., Sun, F., & Marchesi, J. R. 2007. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 418-420. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x.
- Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S, K., Vallad, G. E., Chand, R., Chauhan, V. B. 2012. Emerging phytopathogen *Marophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Crit Rev Microbiol*. 38: 136-151.
- Khamna, S., Yokota, A., Lumyong, S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (4), 649–655.
- Khan, N., Bano, A., 2016. Modulation of phytoremediation and plant growth by the treatment with PGPR, Ag nanoparticle and untreated municipal wastewater. *Int. J. Phytoremediation* 18 (12), 1258–1269.
- Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI and Kim KS. 2016. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:872-879 <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1502.02003>.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Gilbert-Clarey, Tours, France, pp. 879–882.
- Knox-Davis, P. S. 1966. Further studies on picnidium production by *Macrophomina phaseoli*. *South Afri J Agri Sci.* 9: 595-600.
- Krey, T., Vassilev, N., Baum, C., Eichler-Löbermann, B. 2013. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. *Eur J Soil Biol*;55:124–30.

- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Kumar, P., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. 2016. Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in both pot and field studies. *Rhizosphere*, 2, 13-23. doi: 10.1016/j.rhisph.2016.09.002.
- Kunwar, I. K., Singh, T., Machado, C. C., Sinclair, J. B. 1986. Histopathology of soybean seed and seedling infection by *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 76:532–535.
- Lakshmi, V., Kumari, S., Singh, A., & Prabha, C. 2015. Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings. *Journal of King Saud University - Science*, 27(2), 113-119.
- Landa BB, Hervas A, Bethiol W, Jimenez- Diaz RM. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*. 25:305-318.
- Larking, M., A., Blackshields, G., Brown, N., P., Chenna, *et al.* 2007. Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- Li, W., Hu, J., C., Wang, S., J. 2008. Growth-promotion and biocontrol of cucumber fusarium wilt by marine *Bacillus subtilis* 3512A. *J Shenyang Agric Univ* 39:182–185.
- López-Soto, G. R. 2019. Selección de rizobacterias de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con potencial efecto de biocontrol sobre hongos fiopatógenos de importancia agrícola y la promoción de crecimiento vegetal. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Guasave, Sinaloa, México.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 541–556.
- Ma, J., Hill, C. B., & Hartman, G. L. 2010. Production of *Macrophomina phaseolina* Conidia by Multiple Soybean Isolates in Culture. *Plant Disease*, 94(9), 1088-1092. doi: 10.1094/pdis-94-9-1088.

- Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., & Wang, W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*, 90, 34-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>
- Martínez-Álvarez, J. C., Castro-Martínez, C., Sanchez-Peña, P., Gutiérrez-Dorado, R., & Maldonado-Mendoza, I. E. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(5), 1-10.
- Martínez-Valenzuela, C., y Gómez-Arroyo, S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200.
- Martinez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., Mora, M. L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Sci Plant Nutr*. 10:293–319.
- Martins, S. A., Schurt, D. A., Seabra, S. S., Martins, S. J., Ramalho, M. A. P., Moreira, F. M. d. S., . . . Medeiros, F. H. V. d. 2018. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth promotion and biocontrol by rhizobacteria under *Rhizoctonia solani* suppressive and conducive soils. *Applied Soil Ecology*, 127, 129-135. doi: [10.1016/j.apsoil.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.03.007).
- Mayek-Pérez, N., García-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J., Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common vean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 185-195.
- Mehnaz, S., Lazarovits, G. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol*;51:326–35.
- Meziadi, C., Richard, M.M., Derquennes, A., Thareau, V., Blanchet, S., Gratiás, A., Pflieger, S., Geffroy, V. 2016. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Sci*. 242, 351–357.

- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. 2018. The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00112.
- Mihail, J. D., Taylor, S. J. 1959. Interpreting variability among isolates for *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany*. 10: 1596–1603.
- Minaxi, & Saxena, J. 2010. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* RM-3 as a Potential Biocontrol Agent. *Mycopathologia*, 170(3), 181-193. doi: 10.1007/s11046-010-9307-4.
- Mir, Z. R., Singh, P. K., Zaidi, P. H., Vinayan, M. T., Sharma, S. S., Krishna, M. K., . . . Nair, S. K. 2018. Genetic analysis of resistance to post flowering stalk rot in tropical germplasm of maize (*Zea mays* L.). *Crop Protection*, 106, 42-49. doi: 10.1016/j.cropro.2017.12.004.
- Mishra, S., Singh, A., Keswani, C., Saxena, A., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2015. Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens. *Plant. Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, pp. 111–125.
- Montes de Oca, N. 2008 Establecimiento y desarrollo de la colección de cultivos del CENSA. *Rev Salud Anim.*; 30: 17-24.
- Montesinos, E. 2003 Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *Int Microbiol* 6:221–223. doi: 10.1007/s10123-003-0141-0.
- Mora-Romero, G. A., Gonzalez-Ortiz, M. A., Quiroz-Figueroa, F., Calderon-Vazquez, C. L., Medina-Godoy, S., Maldonado-Mendoza, I., . . . Lopez-Meyer, M. 2014. PvLOX2 silencing in common bean roots impairs arbuscular mycorrhiza-induced resistance without affecting symbiosis establishment. *Functional Plant Biology*, 42(1), 18. doi: 10.1071/fp14101.
- Muñoz-Cabañas, R. M., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. 2005. Análisis Patogénico y Genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedantes. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 11-18.

- Nakkeeran, S., Marimuthu, T., Raguchander, T., 2013. Exploring DAPG and Phenazine producing PGPR strains and fungal antagonists for the management of Noni diseases. WNR Technical Bulletin-11. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore and World Noni Research Foundation, Chennai, India.
- O'Sullivan, D., J., O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev*; 56:662–76.
- Oh, M., Ham, J. and Cox, J. M. 2012. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 152:1-8. [https:// dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018](https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018).
- Pandey, P., Bisht, S., Sood, A., Sharma, G.D., Maheshwari, D.K. 2012. Consortium of plant-growth-promoting bacteria: future perspective in agriculture. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 185–200.
- Pandya, U., Saraf, M., 2014. *In vitro* evaluation of PGPR strains for their biocontrol potential against fungal pathogens. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, pp. 293–305.
- Paneerselvam, A., Kumar, D. P., Thenmozhi, R., Anupama, P. D., Nagasathya, A., Thajuddin, N. 2012. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* F. sp. *lycopersicis*. *J Microbiol Biotechnol Res* 2:78–89.
- Panorama Agroalimentario Frijol 2016. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200638/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2016.pdf
- Pastor-Corrales, M. A., and Abawi, G. S. 1987. Reactions of selected vean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. *Plant Disease* 71: 990-993.
- Patil, V. S. 2014. Isolation, characterization and identification of rhizospheric bacteria with the potential for biological control of *Sida acuta*. *Journal of Environmental Research and Development*, 8(3), 411.

- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J. Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5), 325-336. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>.
- Pérez-Moreno, J., Ferrera-Cerrato, R., García-Espinosa, R. 1995. Diversidad genética y patología del frijol. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México, 141 pp.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., van der Putten, W. H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (11).
- Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J., Crous, P. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51e167.
- Pikosvkaya, R. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17:362–370.
- Radwan, O., L.V. Rouhana, G.L. Hartman, and S.S. Korban. 2013. Genetic Mechanisms of Host–Pathogen Interactions for Charcoal Rot in Soybean. *Plant Mol. Biol. Report.*: 1–13.
- Radwan, O., Rouhana, L. V., Hartman, G. L. 2014. Genetic Mechanisms of Host-Pathogen Interactions for Charcoal Rot in Soybean. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 32: 617-629.
- Rajendrakumar, P., Kalidindi, S., K. Srinivasa, R., P. Natarajkumar, B. C. Viraktamath, Sena, M. B., Akshaya, K. B. y Raman, M. S. 2006. A protocol for isolation of DNA suitable for rapid seed and grain purity assessments in rice. *Rice Genetics Newsletter*. 23: 92-95.
- Rao, I., M. 2001. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: the case of common bean and tropical forages. In: Pessaraki M (ed) *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker, New York, pp 583–613
- Reséndiz Arvizu, V. H. 2009. Uso de *Trichoderma spp.* como agente biocontrolador de algunos agentes causales de la pudrición de raíz de frijol común (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) en el estado de Durango, Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México. 84 pp.
- Romero, C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. Univ. Aut. Chapingo. Chapingo, México. 326-327 pp.
- Ryu, R., J., Patten, C., L. 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* 190(21):7200–7208.
- SAGARPA [Internet]. Agenda Técnica Agrícola de Sinaloa 2015. 2015. Disponible en: www.inifap.gob.mx/Documents/agendas_tecnologicas/25_Sinaloa_2015_SIN.pdf.
- SAGARPA [Internet]. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030>.
- Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 1–30.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Saleh AA, Ahmed HU, Todd TC, Travers SE, Zeller KA, Leslie JF, Garrett KA 2010 Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. *Mol Ecol* 19(1):79–91.
- Salkowski, E. 1885 Uber das verhalten der skatolcarbonsaure im organismus. *Z Physiol Chem* 9:23–33.
- Scavino, A. F., & Pedraza, R. O. 2013. The Role of Siderophores in Plant Growth-Promoting Bacteria. 265-285. doi: 10.1007/978-3-642-37241-4_11
- Schmidt, T. M., Thomé, A. H. E., Sperotto, R. A., & Granada, C. E. (2018). Effect of rhizobia inoculation on the development of soil-borne pathogens infecting common bean plants. *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 687-694. doi: 10.1007/s10658-018-1600-y.
- Schwartz, H., F., Pastor-Corrales, M., A. 1989. Bean production problems in the tropics, 2nd edn. CIAT, Cali.

- Schwyn, B., & Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
- Selvakumar, G., Kundu, S., Anand, D., G., Yogesh, S., S., Hari, S., G. 2008. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seeding growth. *Curr. Microbiol.* 56:134–139.
- Sharma A. and Shouche Y. 2014. Microbial Culture Collection (MCC) and International Depository Authority (IDA) at National Centre for Cell Science, Pune. India. *Ind. J. Microbiol.* 54(2):129-133.
- Sharma, C. K., Vishnoi, V. K., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. 2018. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. *Rhizosphere*, 5, 71-75. doi: 10.1016/j.rhisph.2018.01.001.
- Sherathia, D., Dey, R., Thomas, M., Dalsania, T., Savsani, K., Pal, K.K., 2016. Biochemical and molecular characterization of DAPG-producing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Legume Res.-Int. Jo.* 39 (4), 614–622 (OF).
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515-521. doi: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80049-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80049-3)
- Shrivastava, P., Kumar, R., & Yandigeri, M. S. 2017. In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 192-199. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.12.004.
- SIAP-SAGARPA [Internet]. Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por Estado. 2018. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do
- Singh, N., Kumar, S., Bajpai, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., & Kang, S. C. 2010. Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent

- Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant growth promotory activity in chir-pine. *Crop Protection*, 29(10), 1142-1147. doi: 10.1016/j.cropro.2010.04.008.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & 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(9), 1669-1679. doi: 10.1007/s11274-008-9680-z.
- Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, NewYork, pp. 332-341.
- Songa, W., J. Hillocks, A. W. Mwangi'mbe, R. Buruchara, and W. K. Ronno. 1997. Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in Eastern Kenya. *Expl. Agric.* 33: 459-468.
- Sousa, S.A., de Oliveira, T.C., Gonçalves, G.d.M.O., Lopes, M.B.S., dos Santos, G.R., Fidelis, R.R. 2014. Características agronômicas e resistência de genótipos de feijão comum à mela no sul do estado do Tocantins. *J. Biotec. Biodivers.* 5: 130–139.
- Stumbriene, K., Gudiukaite, R., Semaskiene, R., Svegzda, P., Jonaviciene, A., & Suproniene, S. 2018. Screening of new bacterial isolates with antifungal activity and application of selected *Bacillus* sp. cultures for biocontrol of *Fusarium graminearum* under field conditions. *Crop Protection*, 113, 22-28. doi: 10.1016/j.cropro.2018.07.006.
- Sudhakar, P., Chattopadhyay, G., N., Gangwar, S., K., Ghosh, J., K. 2000. Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry(*Morus alba*). *J Agric Sci*;134:227–34.
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. 2011. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.002
- Suriachandraselvan M, Salalrajan F, Aiyyanathan KEA. 2006. Relationship between morphological variations and virulence in the isolates of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of sunflower. *Madras Agric J* 93(1–6):63–67.

- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., y Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.11.012.
- Szkop, M., Sikora, P., & Orzechowski, S. 2011. A novel, simple, and sensitive colorimetric method to determine aromatic amino acid aminotransferase activity using the Salkowski reagent. *Folia Microbiologica*, 57(1), 1-4. doi: 10.1007/s12223-011-0089-y.
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. 2017. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102-117. doi: 10.1016/j.apsoil.2017.09.030.
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis subsp. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, 182, 31-39. doi: 10.1016/j.micres.2015.09.005.
- Torres, M. J., Pérez Brandan, C., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*, 105, 93-99. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.12.001.
- USDA [Internet]. Natural Resources Conservation Service. 2018. Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Phaseolus vulgaris* L. Disponible en: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PHVU>.
- Villanueva-Tarazona, E. E. y Quintana-Díaz, A. 2012. Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 32(1): 24-103.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad

- agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). doi: 10.18781/r.mex.fit.1706-5.
- Wani, P.A., Khan, M.S., 2014. Screening of multiple metal and antibiotic resistant isolates and their plant growth promoting activity. *Pak J. Biol. Sci.* 17 (2), 206.
- Weng-Alemán, Z., Junco-Díaz R de los A, Díaz-Rosa O., E. 2003. Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. *Rev Cuba Hig Epidemiol.*; 41(1).
- Whipps, J., M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52:487–511
- Zhao, L., Xu, Y., Sun, R., Deng, Z., Yang, W., & Wei, G. 2011. Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain mq23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 42(2), 567–575. doi:10.1590/S1517-838220110002000022.

12. ANEXOS

Anexo 1. Colección científica de aislados bacterianos provenientes de nódulos y rizósfera de plantas de frijol.

Aislado	Sitio de muestreo	Hemólisis	Aislado	Sitio de muestreo	Hemólisis	Aislado	Sitio de muestreo	Hemólisis
BA01	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA82	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR32	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA02	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA83	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR33	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA03	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA84	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR34	Cortines III, Gve., Sin.	α
BA04	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA85	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR35	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA05	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA86	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR36	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA06	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA87	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR37	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA07	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA88	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR38	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA08	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA89	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR39	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA09	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA90	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR40	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA10	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA91	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR41	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA11	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA92	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR42	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA12	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA93	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR43	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA13	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA94	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR44	Cortines III, Gve., Sin.	β

BA14	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BA95	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR45	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA15	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA96	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR46	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA16	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA97	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR47	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA17	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA98	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR48	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA18	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA99	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR49	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA19	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA100	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR50	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA20	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA101	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR51	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA21	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA102	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR52	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA22	Bachoco, Gve., Sin.	α	BA103	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR53	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA23	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA104	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR54	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA24	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA105	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR55	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA25	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA106	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR56	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA26	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA107	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR57	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA27	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA108	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR58	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA28	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA109	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR59	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA29	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA110	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR60	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA30	Bachoco, Gve., Sin.	β	BA111	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR61	Cortines III, Gve., Sin.	β

BA31	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN01	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR62	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA32	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN02	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR63	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA33	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN03	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR64	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA34	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN04	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR65	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA35	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BN05	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR66	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA36	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN06	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR67	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA37	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN07	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR68	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA38	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN08	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR69	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA39	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN09	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR70	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA40	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN10	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR71	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA41	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN11	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR72	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA42	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN12	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR73	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA43	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN13	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR74	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA44	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN14	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR75	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA45	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN15	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR76	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA46	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN16	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR77	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA47	Bachoco, Gve., Sin.	α	BN17	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR78	Cortines III, Gve., Sin.	β

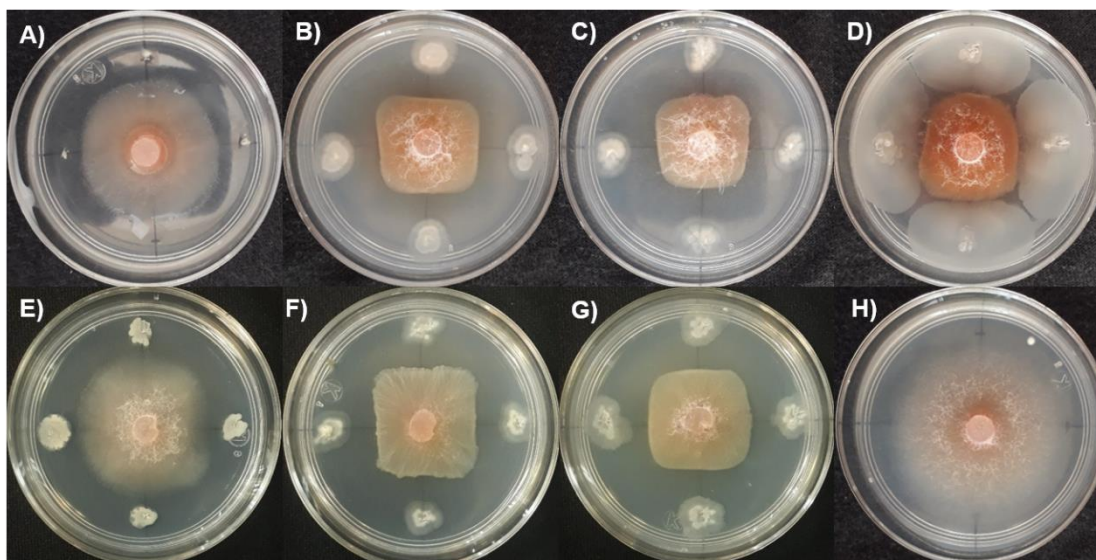
BA48	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BN18	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR79	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA49	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN19	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR80	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA50	Bachoco, Gve., Sin.	β	BN20	Bachoco, Gve., Sin.	γ	BR81	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA51	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR01	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR82	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA52	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR02	Cortines III, Gve., Sin.	α	BR83	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA53	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR03	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR84	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA54	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR04	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR85	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA55	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR05	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR86	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA56	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR06	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR87	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA57	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR07	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR88	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA58	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR08	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR89	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA59	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR09	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR90	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA60	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR10	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR91	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA61	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR11	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR92	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA62	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR12	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR93	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA63	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR13	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR94	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA64	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR14	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR95	Cortines III, Gve., Sin.	γ

BA65	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR15	Cortines III, Gve., Sin.	γ	BR96	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA66	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR16	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR97	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA67	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR17	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR98	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA68	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR18	Cortines III, Gve., Sin.	β	BR99	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA69	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR19	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN1	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA70	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR20	Cortines III, Gve., Sin.	γ	BN2	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA71	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR21	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN3	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA72	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR22	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN4	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA73	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR23	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN5	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA74	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR24	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN6	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA75	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR25	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN7	Cortines III, Gve., Sin.	α
BA76	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR26	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN8	Cortines III, Gve., Sin.	γ
BA77	Bachoco, Gve., Sin.	α	BR27	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN9	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA78	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR28	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN10	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA79	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR29	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN11	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA80	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR30	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN12	Cortines III, Gve., Sin.	β
BA81	Bachoco, Gve., Sin.	β	BR31	Cortines III, Gve., Sin.	β	BN13	Cortines III, Gve., Sin.	β

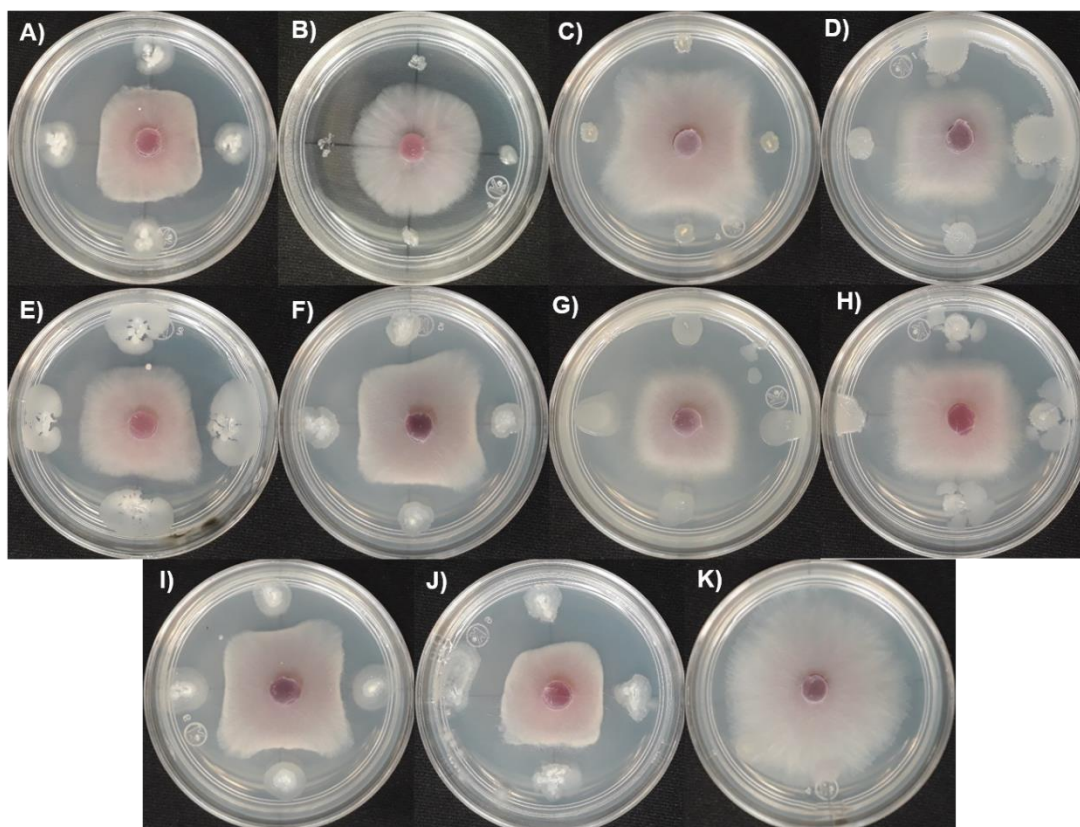
Anexo 2. Porcentajes de antagonismo *in vitro* de las bacterias no hemolíticas de la colección contra diversos hongos fitopatógenos de cultivos de frijol. **Fv)** *Fusarium verticillioides*, **Forl)** *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, **(Sr)** *Sclerotium rolfsii* y **(Rh)** *Rhizoctonia sp.*

Aislado	Inhibición (%)					Aislado	Inhibición (%)				
	Mp	Fv	Forl	Rh	Sr		Mp	Fv	Forl	Rh	Sr
BA35	-	27.5	-	-	-	BN20	80	48.5	40	35	44.5
BA93	55	-	-	-	-	BR20	62.5	47	39	30.5	-
BA95	-	-	39	19	38.5	BR52	35	-	-	-	-
BA97	85	52	40	30	-	BR53	23.5	-	-	-	-
BA100	60		40	24	42	BR56	45	29	31.5	25	37.5
BA105	-	-	25	-	26	BR95		24	-	-	-
BA110	--	26	-	-	-	BN1	70	49	47.5	30	
BN4	65	-	-	-	-	BN3	35	-	-	-	-
BN3	35	-	-	-	-	BN8	30	-	-	-	-
BN17	85	46.5	41.5	26.5	-						

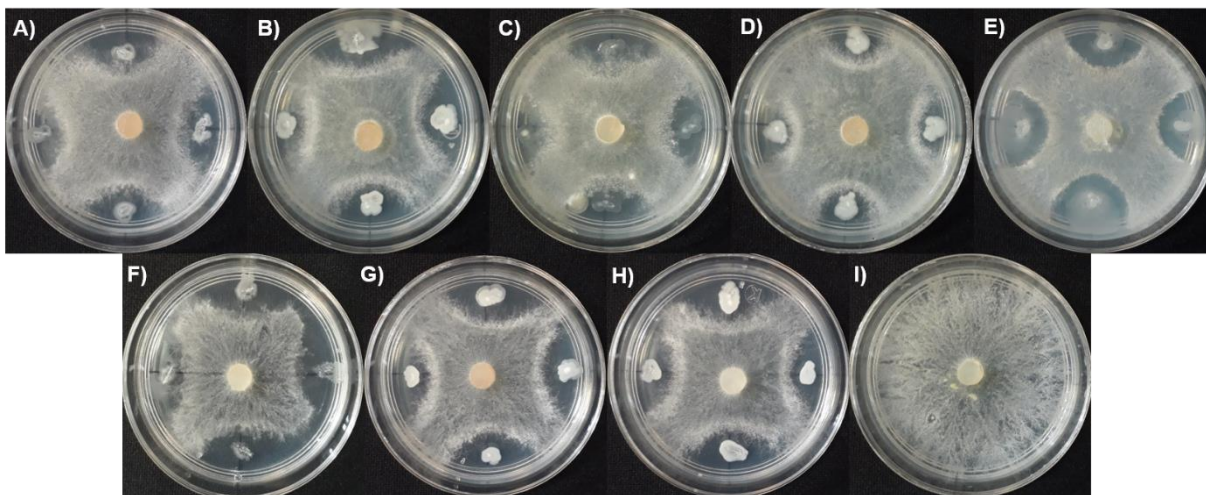
Anexo 3. Cultivos duales bacterias contra *Fusarium verticillioides*. **A)** BA35, **B)** BA97, **C)** BN17, **D)** BN20, **E)** BR56, **F)** BR20, **G)** BN1, **H)** Control Fv.



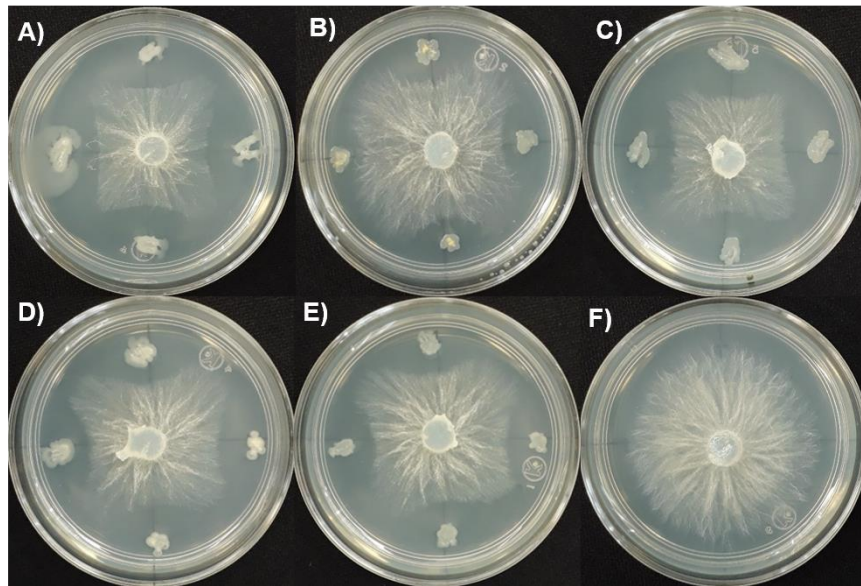
Anexo 4. Cultivos dual bacterias – *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*. **A)** BN17, **B)** BN13, **C)** BA105, **D)** BA95, **E)** BN20, **F)** BA97, **G)** BA100, **H)** BR56, **I)** BR20, **J)** BN1 y **K)** Control Forl.



Anexo 5. Cultivos dual bacterias – *Rhizoctonia* sp. **A)** BA95, **B)** BA97, **C)** BA100, **D)** BN17, **E)** BN20, **F)** BR56, **G)** BR20, **H)** BN1, **I)** Control Rh.



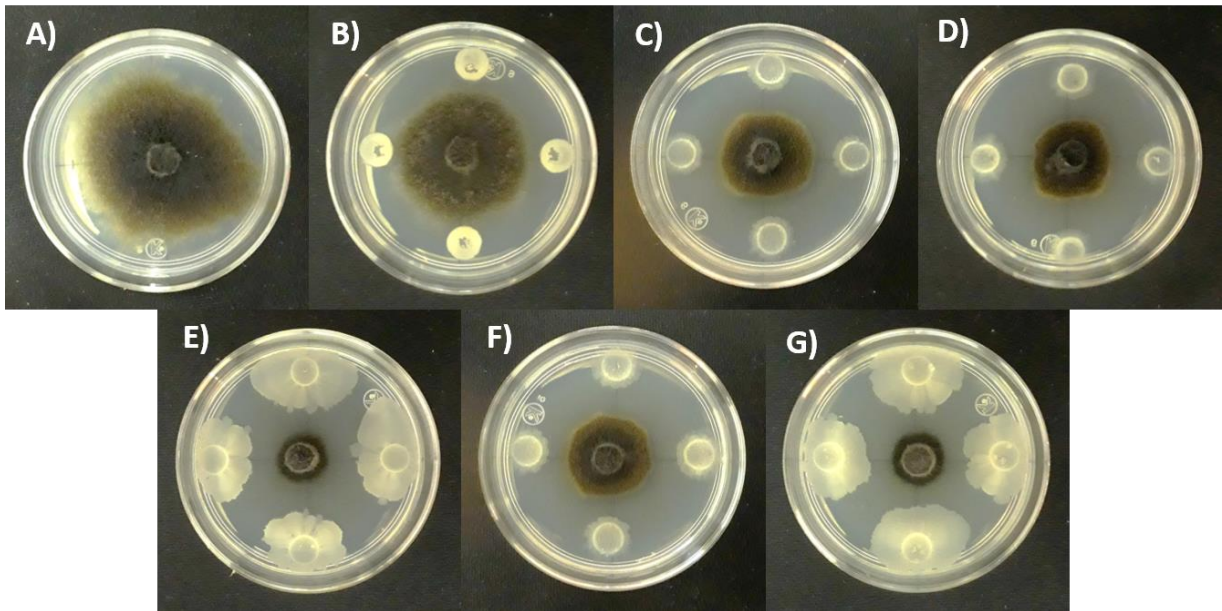
Anexo 6. Cultivos dual bacterias – *Sclerotium rolfsii* **A)** BN20, **B)** BA105, **C)** BA100, **D)** BA95, **E)** BR56, **F)** Control Sr.



Anexo 7. Evidencia fotográfica del ensayo de an antagonismo *in planta*.



Anexo 9. Efecto de biocontrol *in vitro* a *M. phaseolina* a los 7 días post formulación.



Anexo 8. Efecto de biocontrol *in vitro* a *M. phaseolina* a los 21 días post formulación.

