

Selección *in vitro* e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnivora*

B.E. López-Valenzuela^{1,*}, A.D. Armenta-Bojórquez², S. Hernández-Verdugo³, M.A. Apodaca-Sánchez¹, J.A. Samaniego-Gaxiola⁴, K.Y. Leyva-Madrigal² y A. Valdez-Ortiz⁵

¹ Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte. Av. Japaraqui y Calle 16 s/n, C.P. 81110. Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México

² Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa; Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, C.P. 81101, Guasave, Sinaloa, México

³ Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán - El Dorado, Km 17.5, Apdo. Postal 25, Culiacán Rosales, Sinaloa, México

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental La Laguna. Carretera Torreón-Matamoros Km 17.5, C.P. 27440. Matamoros, Coahuila, México

⁵ Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortiz S/N, Culiacán, Sin., México

Resumen

Se realizaron aislamientos de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. con potencial antagonista para el control de *Phymatotrichopsis omnivora*, patógeno del suelo que causa pudrición de raíz en varias especies vegetales conocida como "pudrición texana". Los objetivos de este trabajo fueron seleccionar e identificar a nivel de especie, cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. recolectadas en el noroeste de México, que permitan tener un eficiente control de *Phymatotrichopsis omnivora*. Se seleccionaron tres aislados de *Trichoderma* por su capacidad antagonista y comportamiento *in vitro* contra *P. omnivora*. La identificación molecular de los aislados obtenidos (TB = aislado de bugambilia, TM = aislado de mango y TF = aislado de ficus) y de la cepa control (TN = aislado de nogal), arrojaron los siguientes resultados: las cepas TB y TM correspondieron a la especie *asperellum* y las cepas TF y TN a la especie *virens*. Las tres cepas evaluadas mostraron un alto potencial antagónico al compararse con la cepa control (TN) y serán consideradas en posteriores evaluaciones en invernadero. Todas las cepas mostraron las Clases 1 y 2 de antagonismo contra el patógeno (valores de 1,0 a 1,5), según la escala Baker & Cook. Adicionalmente, se obtuvieron 32 aislados de *Bacillus* spp., de los cuales cuatro fueron seleccionados por su mayor halo de inhibición contra *Phymatotrichopsis omnivora* (B6 = aislado de jatropha; B14 = aislado de mango; B18 = aislado de maíz; B21 = aislado de maíz). Los resultados de la identificación molecular a los aislados nos indicaron que las cepas B6, B14 y B18 pertenecen a la especie *cereus sensu lato*, mientras que la cepa B21 a la especie *subtilis*. Estos resultados contribuyen al control biológico de *Phymatotrichopsis omnivora* que afecta gran diversidad de plantas cultivadas.

Palabras clave: Aislados nativos, hongos fitopatógenos en suelo, hongos y bacterias antagonistas.

* Autor para correspondencia: blanca_lopez@esavf.edu.mx

<http://dx.doi.org/10.12706/itea.2015.020>

Abstract

In vitro* selection and identification of isolated of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. native to control *Phymatotrichopsis omnivora

Isolations of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. with high antagonistic potential to control *Phymatotrichopsis omnivora*, a soil pathogen responsible of root rot in several species well know as texas root rot, were realized. The aim of this study was to select and identify to a specie level, native strains collected in northern Mexico that allow them to control efficiently *Phymatotrichopsis omnivora*. Three *Trichoderma* isolates were selected for their antagonistic capacity and behavior *in vitro* against *P. omnivora*. Molecular identification of the isolates showed (TB = isolated bugambilia; TM = isolated mango; TF = isolated ficus) and the control strain (TN = isolated nogal) the following results: TB and TM strains corresponded to *asperellum* species and strains TF and TN to *virens* species. The three strains tested showed high antagonistic potential when compared to the control strain (TN) and will be considered in subsequent evaluations in greenhouses. All strains showed Classes 1 and 2 of antagonism against the pathogen (values from 1,0 to 1,5), according to the scale of Baker & Cook. At the same time, 32 isolates of *Bacillus* spp. were obtained and four were selected because of their greater zone of inhibition against *Phymatotrichopsis omnivora* (B6 = isolated jatropa; B14 = isolated mango; B18 = isolated corn; B21 = isolated corn). The results of the molecular identification of the isolates were directed to B6, B14 and B18 strains belong to the species *cereus sensu lato*, while the B21 strain to the species *subtilis*. These results contribute to biological control against *Phymatotrichopsis omnivora* that affects a great number of plants.

Key words: Isolated native plant pathogenic fungi in soil, fungi and antagonistic bacteria.

Introducción

Entre los patógenos radiculares que afectan a las plantas se encuentra *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, agente causal de la pudrición de raíz conocida como pudrición texana, que afecta a más de 2300 especies de plantas dicotiledóneas (Watson et al., 2000).

Phymatotrichopsis omnivora se distribuye ampliamente en las principales regiones agrícolas de México, particularmente en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango y Sinaloa (Samaniego-Gaxiola y Herrera-Pérez, 2003; Ramírez-Villapudúa et al., 2006). En estos estados de la República Mexicana este patógeno es un factor limitante en la producción en cultivos de algodón (*Gossypium herbaceum*), alfalfa (*Medicago sativa*), nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch), frutales y ornamentales (Olsen y Jeffrey, 1999; Ramírez-Villapudúa et al., 2006). *Phymatotrichopsis omnivora* es capaz de sobrevivir en el suelo

por un largo tiempo mediante estructuras de resistencia llamadas esclerocios. Se ha demostrado que el esclerocio y los cordones miceliales son el inicio de la infección de las raíces vegetales (Watson et al., 2000).

Este patógeno es difícil de controlar debido a que es resistente contra los principales fungicidas y fumigantes utilizados en el mercado, al largo tiempo que puede permanecer en estado latente y a la profundidad del suelo en la que se forman y permanecen sus esclerocios.

El control químico es una práctica insuficiente en la mayoría de los cultivos, además de contaminar el suelo y agua y producir resistencia en el patógeno, aumenta los costos de producción, haciendo este método inútil e incosteable para controlar la pudrición texana (Uppalapati, 2010). Por lo tanto es necesario buscar alternativas que permitan controlar o disminuir los efectos negativos que genera esta enfermedad. El control biológico es una alternativa útil, que ha sido utilizada con éxito

contra patógenos del suelo que afectan la agricultura actual (Korsten et al., 1997).

Es importante utilizar cepas de microorganismos antagonistas que sean nativas y que permitan tener mayores posibilidades de éxito por su probada adaptación al medio ambiente donde fueron obtenidas. Cervantes-Martínez et al. (2010) evaluaron *in vitro* la acción antagónica de 13 aislamientos de *Trichoderma* nativos de la Comarca Lagunera, México, frente a una cepa de *P. omnivora* e identificaron con análisis morfológico las especies de estos aislamientos, donde encontraron que las tres especies identificadas *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* presentaron un efecto antagónico marcado sobre el fitopatógeno, y concluyen que el género *Trichoderma* es una alternativa en los métodos de control para dar un manejo integrado a la pudrición texana y de ésta manera reducir el uso de productos químicos contaminantes de suelo y medio ambiente. Así mismo, De los Santos et al. (2003), aislaron cepas de *Trichoderma* nativas de la Provincia de Huelva, España, las evaluaron como biocontroladores de patógenos en el cultivo de fresa (*Fragaria xananassa* Duchesne) por un periodo de tres años, en lotes de la región donde las cepas fueron obtenidas, encontrando un control significativo comparado con el control químico, logrando bajar las poblaciones de los patógenos que afectan al cultivo. La principal estrategia para el biocontrol ha sido la identificación de microorganismos del suelo que sean antagonistas efectivos y que su uso biológico sea seguro. Alabouvette y Steinberg (2006) reportaron 32 cepas de actinomicetos simbioses de hormigas con efecto inhibidor contra diversos fitopatógenos. Martínez et al. (2008) probaron el efecto antagónico de 59 aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre el aislamiento (304-11) de *Rhizoctonia* sp. evaluando a nivel *in vitro* la competencia por el sustrato, la interacción hifal y la antibiosis, reportando que un 85,31% de sus aislados mos-

traron una alta capacidad antagónica contra el patógeno, según la escala de Bell et al (1982). Microorganismos del suelo como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. han sido ampliamente estudiados y se han propuesto como agentes de control biológico, especialmente contra fitopatógenos del suelo (Verma et al., 2007).

Trichoderma spp. utiliza diferentes mecanismos de acción antagónica como: micoparasitismo, lisis, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio y/o inducción de resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996). *Bacillus* spp. posee características como la formación de endosporas que le confieren mayor resistencia a condiciones adversas como la desecación, radiación y a los desinfectantes químicos (Butt et al., 1999). Estas características hacen que *Bacillus* sea considerada una bacteria promotora de crecimiento vegetal, además de tener un efecto protector contra patógenos del suelo (Butt et al., 1999). Se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos (Chen et al., 2006) y la fijación biológica del nitrógeno (Ooi et al., 2008). En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal (Figueiredo y Martinez, 2008) y control biológico de patógenos (Yoon et al., 2005).

Hasta la fecha, se ha demostrado que muchas cepas del género *Trichoderma* son utilizadas como biocontroladores de patógenos de suelo en varias especies cultivadas (Guigón et al., 2010; Samuels, 1996). Guigón et al. (2010) obtuvieron una inhibición *in vitro* de 28 a 37% en *Phymatotrichopsis omnivora* con *Trichoderma asperellum*. Sin embargo, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) son las especies más reportadas en control biológico de fitopatógenos del suelo y son efectivas contra *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Fusarium oxysporum*,

Phytophthora parasítica Dastur, *Phytium ultimum*, *Verticillium* spp. y *Thielaviopsis* spp., entre otros (Samuels, 1996).

También *Bacillus cereus* inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* (Chan et al., 2003). Osorio-Hernández et al. (2009) reportaron a *Bacillus* spp. como biocontrolador *in vitro* de *Fusarium*, determinando la efectividad de la bacteria al provocar el deterioro morfológico del micelio, disminuyendo significativamente el desarrollo y afectando las estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno.

Los factores clave que contribuyen al efecto antagónico de estos organismos son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y sus características fisiológicas. Sin embargo, para una adecuada comprensión de las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas se requiere de la acertada ubicación taxonómica de estos organismos (Kullnig et al., 2001). La variabilidad de las características morfológicas en las especies de *Trichoderma* y *Bacillus* hace que su clasificación sea difícil. Sin embargo, las técnicas moleculares han ayudado a una clasificación mejor entre las diferentes especies que conforman estos géneros. (Kullnig et al., 2001; Druzhinina et al., 2006).

Una herramienta útil y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* son los ensayos *in vitro* para determinar su antagonismo (Larralde et al., 2008) los cuales se utilizan principalmente como herramienta predictiva para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento, antes de efectuar estudios que requieren más tiempo y costo económico (Lo et al., 1998). Guigón y González (2004) encontraron un alto control micoparasítico contra *Phytophthora capsici* en 6 cepas aisladas de *Trichoderma* nativas de Chihuahua, México, probadas como antagonistas *in vitro*. Sin embargo, la identificación de sus cepas la realizaron sólo a nivel de género.

Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron recolectar, seleccionar *in vitro* e identificar morfológica y molecularmente a nivel de especie, aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos, obtenidos de distintos tipos de suelo y provenientes de la rizosfera de diversas especies de cultivos establecidos en el Norte de Sinaloa, México, con la finalidad de ser aprovechados en el control biológico de *Phymatotrichopsis omnivora*, patógeno que afecta diversos cultivos de importancia agrícola.

Material y métodos

Recolecta de microorganismos para el control biológico

Se recolectaron 30 muestras de suelo de la rizosfera para realizar el aislamiento de *Trichoderma* spp. y 42 muestras para el aislamiento de *Bacillus* spp. de plantas de cultivos establecidos en jardines, huertos y campos agrícolas del norte de Sinaloa. Los datos geográficos de los sitios de colecta se obtuvieron mediante GPS (Tabla 1). Las muestras embolsadas se colocaron sobre hielo para trasladarse a laboratorio y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para su posterior procesamiento.

Aislamiento e identificación de *Trichoderma*

Para el aislamiento de *Trichoderma* se utilizó el medio de cultivo reportado por Papavizas y Davey (1959). Se mezcló dextrosa, peptona, extracto de levadura, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extracto de bilis de buey, propionato de sodio, agar y agua destilada hasta completar 1 L. El medio fue esterilizado a 20 N/m² durante 15 minutos a 120 °C, y posteriormente se añadió amoxicilina como antibiótico. Cuando el medio estuvo a una temperatura de 40 a 45 °C se transfirió a placas Petri. Antes de que se solidificara, se sem-

Tabla 1. Datos geográficos de ubicación de las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* seleccionadas
 Table 1. Geographic location data of selected *Trichoderma* and *Bacillus* strains

Aislado	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)
<i>Trichoderma</i>			
TB, aislado de bugambilia	25°49'15,6" N	109°02'06,9" O	8
TF, aislado de ficus	25°34'25,0" N	108°27'54,2" O	16
TM, aislado de mango	25°35'14,0" N	108°31'49,8" O	4
<i>Bacillus</i>			
B14, aislado de mango	25°55'28,8" N	109°17'13,0" O	10
B06, aislado de jatropha	25°32'48,2" N	108°29'04,3" O	16
B18, aislado de maíz	25°56'57,6" N	109°08'37,7" O	15
B21, aislado de maíz	25°49'33,7" N	109°01'23,4" O	14

braron 50 mg de suelo en cada placa y se incubaron hasta crecer el micelio característico del género *Trichoderma*.

Los aislados del género *Trichoderma* fueron sembrados en placas Petri en medio de cultivo PDA (patata dextrosa agar), y se identificaron morfológicamente mediante el reconocimiento de sus estructuras macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento). Posteriormente, se prepararon muestras frescas de micelio sobre portaobjetos y se añadió un marcador WGA (no. Cat. W11261, Life Technologies, Eugene, OR, EE. UU.) para observar sus estructuras microscópicas (hifas, esporas, clamidosporas) en un microscopio epifluorescente (LEICA TCS SP5X, BIO-OPTIC, Argentina). Las características macro y microscópicas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972); Bisset (1991) y Von Arx (1981). Los aislados (monoconidiales) puros se criopreservaron a -20 °C en tubos con PDA más CaCO₃ y glicerol al 15% para su posterior análisis de identificación molecular a nivel género y especie.

Aislamiento e identificación de *Bacillus*

El aislamiento de cepas bacterianas se realizó mediante el método utilizado por Ohba y Aizawa (1986) con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de cada muestra de suelo obtenida del rizoplaneo de raíces de cada planta y se le adicionó solución salina estéril (NaCl 0,85%). Se agitó en vortex durante 1 minuto y se pasteurizó a 80 °C en baño maría durante 20 minutos; posteriormente se sembró 1 ml de inóculo en 9 ml de infusión de patata (IP) estéril. Se incubó a 37 °C durante 24 horas; después se pasteurizó de nuevo a 80 °C durante 20 minutos y se sembró de inmediato en placas de Petri conteniendo agar nutritivo (AN); las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para identificar morfológicamente a *Bacillus*, se sembraron los aislados en placas con medio de cultivo AN. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. De las placas con crecimiento se tomaron muestras seleccionando las colonias con características del género *Bacillus* de acuerdo al Manual de Clasificación de Bergey (Claus y Berkeley, 1986). Posteriormente se

pasaron a placas por agotamiento para su purificación. Los aislados se sometieron a una prueba de tinción de Gram y se observaron con un microscopio biológico para comprobar la pureza y determinar las características micromorfológicas y tintoriales de los mismos, así como la presencia de esporas. Además se realizó una prueba hemolítica bacteriana. Los aislados puros se crioconservaron a -20 °C en tubos con LB (Luria Bertani) y glicerol al 15%.

Tinción de Gram y prueba de hemólisis bacteriana

La prueba de tinción se hizo mediante la técnica de Hans Christian Gram (1884) al total de los aislados (López-Jácome *et al.*, 2014). La prueba de hemólisis se hizo con la técnica utilizada por Cowan y Steel (1993).

Selección de *Trichoderma* spp. para el control de *P. omnivora* *in vitro*

Se evaluaron cuatro tratamientos (tres aislados y una cepa identificada de *Trichoderma*

como control), con cuatro repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar. Cada repetición consistió en una placa Petri. La cepa de *Trichoderma* utilizada como control, ha sido utilizada con éxito en el control biológico de *P. omnivora* en el cultivo de nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch) en Coahuila, México (datos sin publicar). Se realizó una prueba de antagonismo mediante confrontaciones duales de ambos microorganismos en placas Petri con medio de cultivo PDA. Se tomaron discos de 5 mm de diámetro con micelio del antagonista (*Trichoderma*) y del patógeno (*P. omnivora*) y se colocaron en los extremos de la placa Petri aproximadamente 6 cm de separación uno de otro. Los discos con el micelio se incubaron a 23±4 °C. Para evaluar el efecto antagónico de las cepas contra el patógeno, se midió el crecimiento de cada organismo durante 7 días con un calibrador Vernier. Los datos obtenidos se transformaron en una escala de capacidad antagónica (Bell *et al.*, 1982) (Tabla 2) de *Trichoderma* spp. *in vitro*.

Tabla 2. Escala de capacidad antagónica *in vitro* para *Trichoderma* spp. de Baker y Cook, utilizada por Bell *et al.* (1982)
Table 2. Scale capacity *in vitro* antagonistic *Trichoderma* spp. Baker and Cook, used by Bell *et al.* (1982)

Grados de la Escala	Características de cada grado de la escala
Grado 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Grado 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
Grado 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo
Grado 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Grado 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Selección de *Bacillus* spp. contra *P. omnivora* *in vitro*

Se efectuaron dos ensayos para seleccionar los aislados bacterianos con capacidad antagónica. En el primer bioensayo se probaron los 32 aislados bacterianos en placas Petri en los medios de cultivo patata dextrosa agar (PDA) y agar nutritivo (AN). Se colocaron cuatro aislados distintos tomados al azar en una placa Petri y se incubaron a 37 °C. Se hicieron cuatro réplicas de cada combinación de aislados.

En el segundo ensayo se utilizaron los 20 aislados que presentaron halo de inhibición contra el patógeno. Los medios de crecimiento fueron los mismos utilizados en el primer ensayo. La siembra de los aislados bacterianos se hizo en confrontación dual con el patógeno. Se utilizaron 5 repeticiones en un diseño experimental completamente al azar.

Análisis estadístico

Los resultados para la selección de cepas nativas de *Trichoderma* se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba Wilcoxon/Kruskal-Wallis (Rank sums) empleando el Sistema de Análisis Estadístico (Programa JMP and SAS software versión 6.1, 2004) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan ($P < 0,05$) del mismo programa. En la selección de *Bacillus* se realizó un análisis de varianza de dos vías empleando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS versión 9.1, 2003) y para la comparación de medias se realizó una prueba de Duncan ($P < 0,05$).

Identificación molecular

Extracción de ADN

Los aislados bacterianos y fúngicos se cultivaron en 5 ml de LB y PD Broth, respectivamente, y se incubaron a 28 °C en agitación (200 rpm) durante 24 h. Se centrifugó 1 ml de cada cul-

tivo y la biomasa obtenida se utilizó para realizar la extracción de ADN con el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y a través de la relación de absorbancia A260/A280 en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de los aislados bacterianos se amplificó el gen 16S empleando los oligonucleótidos F2C y C. En el caso de los aislados fúngicos, se amplificaron las regiones ITS con el juego de oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo 1 µl de ADN molde (aproximadamente 10 ng), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos y 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Brasil, Cat. No. 11615-050). El programa utilizado para la amplificación del gen 16S consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, alineamiento a 55 °C durante 1 minuto, extensión de 1 minuto a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El programa utilizado para la amplificación de las regiones ITS consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 56 °C durante 30 segundos, extensión de 30 segundos a 72 °C y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN, Cat. No. 28106), siguiendo las instrucciones del fabricante y finalmente se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron bidireccionalmente en un secuenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems, EE. UU.). El gen 16S se secuenció con los oligonucleótidos U1 y C, mientras que las regiones ITS se secuenciaron con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. Las secuencias fueron editadas en el software CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) y comparadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast.

Para realizar el análisis filogenético se utilizó el software MEGA 6,0 (Tamura et al., 2013). Las secuencias fueron alineadas utilizando el alineador MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en MEGA 6,0. El alineamiento resultante fue sometido a una prueba de ajuste de modelos de sustitución nucleotídica en MEGA 6,0, con el fin de seleccionar el modelo con mejor ajuste a los datos. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura 2 parámetros y el método de Neighbour-joining. La tasa de variación entre sitios fue modelada por una distribución gamma (cuatro categorías). La robustez de la topología de los árboles se evaluó con 1,000

réplicas bootstrap. Las secuencias de *Geobacillus kaustophilus* y *Gibberella zeae* se utilizaron para enraizar los árboles.

Resultados y discusión

Aislamiento, selección e identificación de *Trichoderma* spp.

De las 30 muestras de suelo colectadas para el aislamiento de *Trichoderma* spp. se aislaron tres cepas (TB = *Trichoderma* aislado de bugambilia, TF = *Trichoderma* aislado de ficus, TM = *Trichoderma* aislado de mango). No hubo diferencias entre las tres cepas en su capacidad antagónica contra *Phymatotrichopsis omnivora* ($X^2 = 4,2304$; $P = 0,2376$). Al final de la evaluación (7 días) el 100% de las cepas aisladas se ubicaron en los grados 1 y 2 de la escala de Bell et al. (1982) (Tabla 2), mostrando valores de efectividad de 1,0 a 1,5 (Tabla 3). Lo anterior coincide con lo encontrado por Martínez et al. (2008), quienes evaluaron *in vitro* 59 cepas de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia* sp. y obtuvieron que el 81,35% de las cepas en estudio se ubicaron en los grados 1 y 2 de la misma escala de referencia, al igual que Bell et al. (1982) al obtener *in vitro* resultados similares con más del 65% de diferentes cepas

Tabla 3. Capacidad antagónica de *Trichoderma* contra *P. omnivora* *in vitro*
Table 3. Antagonistic capacity of *Trichoderma* against *P. omnivora* *in vitro*

Aislado, escala Baker y Cook (Grado 1-5) ¹	Capacidad antagónica
TB, aislado de bugambilia	1,0 a
TF, aislado de ficus	1,5 a
TM, aislado de mango	1,0 a
TN, aislado de nogal (control)	1,25 a

¹ Según Bell et al. (1982).

Letras iguales no son diferentes (Duncan $P \leq 0,05$).

de *Trichoderma* spp. nativas ubicadas en el grado 1 frente a *R. solani*. Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden con lo encontrado por De los Santos et al. (2003), quienes encontraron un potencial antagonístico en cepas de *Trichoderma* nativas de la Provincia de Huelva, España, para controlar poblaciones de patógenos que afectan el cultivo de fresa (*Fragaria xananassa* Duchense).

Las tres cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en este estudio mostraron un alto potencial antagonístico al compararse con la cepa control (TN), lo que indica que los aislados nativos del noroeste de México son potencialmente una fuente importante para el control biológico de *P. omnivora* (Figura 1).

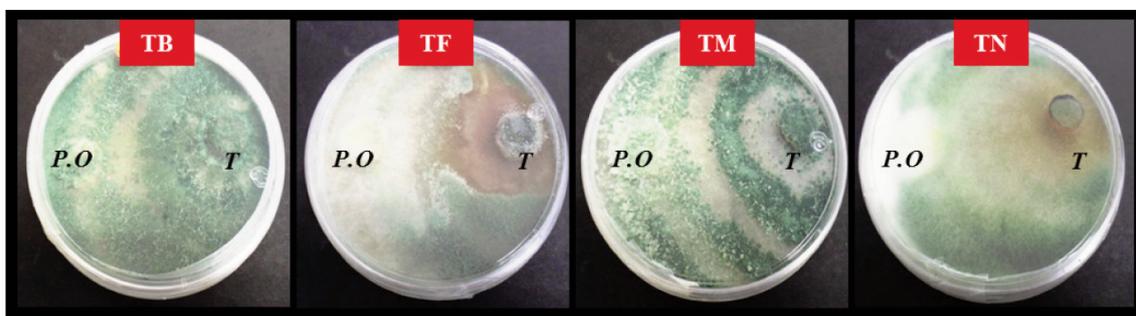


Figura 1. Las 3 cepas de *Trichoderma* (TB = aislado de bugambilia, TF = aislado de ficus, TM = aislado de mango) (disco = T) seleccionadas *in vitro* contra *P. omnivora* (disco = P.O) + (TN = aislado de nogal = cepa-control).

Figure 1. The 3 strains of *Trichoderma* (TB = isolated from bugambilia, TF = isolated from ficus, TM = isolated from mango) (disc = T) selected *in vitro* against *P. omnivora* (disk = PO) + (TN = isolated from walnut = strain-control).

Identificación morfológica y molecular de *Trichoderma* spp.

El análisis morfológico efectuado con el microscopio biológico mostró que los cuatro aislados utilizados en nuestro experimento pertenecen al género *Trichoderma*. Los cuatro aislados presentaron micelio septado, conidióforo hialino muy ramificado, fialides individuales o en grupos, conidios ovoides o subglobosos en racimos de color verde fuerte a verde olivo y clamidosporas intercalares o solitarias verdes (Figura 2), estructuras típicas del género *Trichoderma*. Sin embargo durante su desarrollo, la colonia del aislado TM pigmentó el medio de cultivo PDA de color amarillo-café. Esto sugiere que el aislado TM puede pertenecer a la especie *asperellum*.

Las secuencias obtenidas de los aislados fúngicos se compararon en la base de datos GenBank. Los resultados indicaron que los aislados TB y TM registraron porcentajes de identidad entre 99 y 100% con *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma viride*, respectivamente. Mientras que los aislados TN y TF registraron porcentajes de identidad de 99 y 100% con *Trichoderma virens*, respectivamente. El árbol de distancia generado con éstas secuencias confirmó la identidad de los aislados TB y TM como *Trichoderma asperellum*, mientras que los aislados TF y TN fueron confirmados como *Trichoderma virens* (Figura 3). Estos resultados indican que el género *Trichoderma* presenta variación interespecífica en la región del noroeste de México. Otros estudios que han colectado aislados de *Trichoderma* para eva-

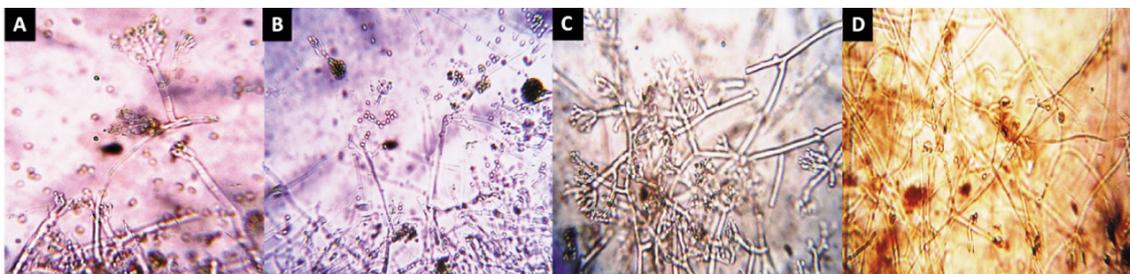


Figura 2. Estructuras morfológicas de los aislados: A) TB = *Trichoderma* aislado de bugambilia, B) TF = *Trichoderma* aislado de ficus, C) TM = *Trichoderma* aislado de mango y D) TN = *Trichoderma* aislado de nogal. Imágenes tomadas en Microscopio biológico con objetivo 10X.
 Figure 2. Morphological structures of isolates: A) TB = *Trichoderma* isolated of bougainvillea, B) TF = *Trichoderma* isolated of ficus, C) TM = *Trichoderma* isolated of mango and D) TN = *Trichoderma* isolated of walnut. Pictures taken in biological microscope with 10X objective.

luarlos como control biológico de patógenos del suelo no han detallado la identificación a nivel de especie (Guigón y González, 2004).

Aislamiento, selección e identificación de *Bacillus* spp.

Se obtuvieron un total de 32 aislados bacterianos. En las pruebas de inhibición 12 aislados no presentaron efectividad antagónica contra el patógeno *P. omnivora*. Por lo tanto, se seleccionaron los 20 aislados que mostraron efecto antagónico y con ellos se efectuaron las pruebas de antagonismo en los medios de cultivo PDA y AN.

En el análisis de varianza de dos vías mostró diferencias entre los 20 aislados ($X^2 = 1,98$, $P = 0,014$). No hubo diferencias entre los dos medios de cultivo ni en la interacción ($X^2 = 1,96$, $P = 0,163$) lo que indica que los aislados se comportaron de manera similar en los dos medios.

Las medias del halo de inhibición, considerando los dos medios de cultivo, varió entre los aislados desde 2,43 (B14) hasta 1,67 cm (B32) (Tabla 4). El tratamiento B14 presentó un halo de inhibición mayor que las cepas

B17, B22, B12, B33, B20 y B32 ($P < 0,05$; Tabla 4). Con la intención de probar el efecto de control biológico se seleccionaron los primeros cuatro aislados de *Bacillus* (B14 = *Bacillus* aislado de mango, B21 = *Bacillus* aislado de maíz, B6 = *Bacillus* aislado de jatropha y B18 = *Bacillus* aislado de maíz) para posteriores trabajos de investigación.

Tinción de Gram y prueba de hemólisis bacteriana

Para corroborar la posible pertinencia al género *Bacillus*, se efectuó una prueba de tinción. En esta prueba, los 20 aislados bacterianos seleccionados mostraron resultados de tinción violeta indicando que son Gram positivas (+), relacionadas con distintos grupos bacterianos incluyendo los del género *Bacillus*. En la prueba de hemólisis, todas mostraron lisis hemolítica tipo gamma (γ), lo que nos indica, que no son patogénicas para el humano y no se corre riesgo alguno de causar daño al ser liberadas al medio ambiente y utilizarlas como inóculo para el control de enfermedades en plantas.

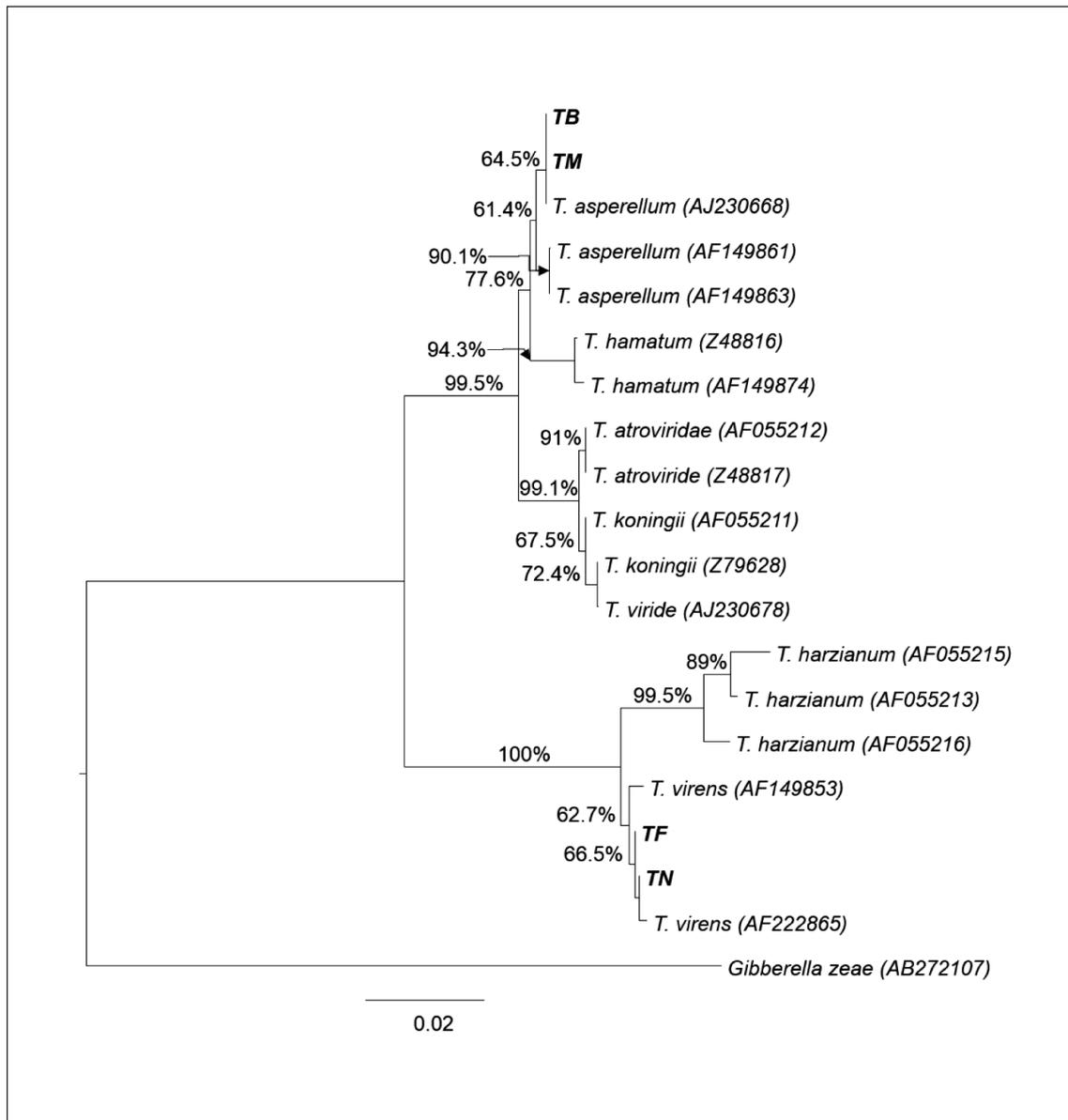


Figura 3. Árbol de distancia (Neighbour-Joining) derivado de las secuencias del ADN ribosomal (ITS1, 5.8S e ITS2) de cuatro aislados de *Trichoderma* y 16 secuencias de referencia. TB: aislado de bugambilia; TF: aislado de ficus; TM: aislado de mango; TN: aislado de nogal (cepa-control).

Figure 3. Distance tree (Neighbour-Joining) derived from ribosomal DNA sequences (ITS1, 5.8S, and ITS2) four *Trichoderma* isolates and reference 16 sequences. (TB = isolated from bugambilia; TM = isolated from mango; TF = isolated from ficus and the TN = isolated from walnut = strain-control).

Tabla 4. Medias del halo de inhibición de los aislados de *Bacillus* vs. *P. omnivora* en los dos medios de cultivo utilizados

Table 4. Means test zone of inhibition of the isolates of *Bacillus* vs. *P. omnivora* in the two culture media and different isolates of *Bacillus*

Aislado	Halo de inhibición (mm)
14	2,43 a
21	2,42 ab
6	2,40 ab
18	2,27 abc
15	2,23 abc
42	2,20 abc
13	2,10 abc
23	2,03 abc
27	2,00 abc
40	1,97 abc
1	1,95 abc
8	1,87 abc
7	1,87 abc
31	1,85 abc
17	1,82 bc
22	1,76 c
12	1,75 c
33	1,75 c
20	1,68 c
32	1,67 c
<i>F</i>	1,98
<i>P</i>	0,014

Letras iguales no son diferentes (Duncan, $P \alpha \leq 0.05$).

Identificación morfológica y molecular de los aislados bacterianos

Los 20 aislados bacterianos se identificaron morfológicamente, y de acuerdo al Manual de Clasificación de Bergey (Claus y Berkeley, 1986), mostraron las características típicas del género *Bacillus*, como son: colonias blanquecinas, opacas, aplanadas de bordes irregulares y características microscópicas típicas: formas bacilares y formadoras de endosporas.

Los cuatro aislados seleccionados (B6, B14, B18 y B21) se analizaron con técnicas moleculares. Las secuencias obtenidas de los aislados bacterianos se compararon en la base de datos GenBank. Tres de los aislados bacterianos (B6, B14 y B18) presentaron altos porcentajes de similitud (99-100%) con varias especies del género *Bacillus*, especialmente aquellas que son más cercanas filogenéticamente (*B. cereus*, *B. mycooides*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*). Esta separación no muy clara entre estas cuatro especies coincide con la propuesta de que todas estas especies puedan agruparse en una sola denominada *B. cereus*, sin embargo, la discusión en la comunidad investigadora de *B. cereus* sugieren que es poco probable que la clasificación de organismos del grupo *B. cereus sensu lato* sean agrupados dentro de una sola especie en el futuro previsible (Maughan y Van der Auwera, 2011).

El aislado B21 registró 99% de similitud con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tequilensis*. Con el análisis filogenético se logró confirmar la identidad del aislado B21 como *Bacillus subtilis*, mientras que los aislados B6, B14 y B18 no pudieron identificarse hasta nivel de especie, sin embargo se les pudo asociar al grupo *Bacillus cereus sensu lato* (Figura 4). Estos resultados indican la presencia de variación interespecífica del género *Bacillus* en el noroeste de México.

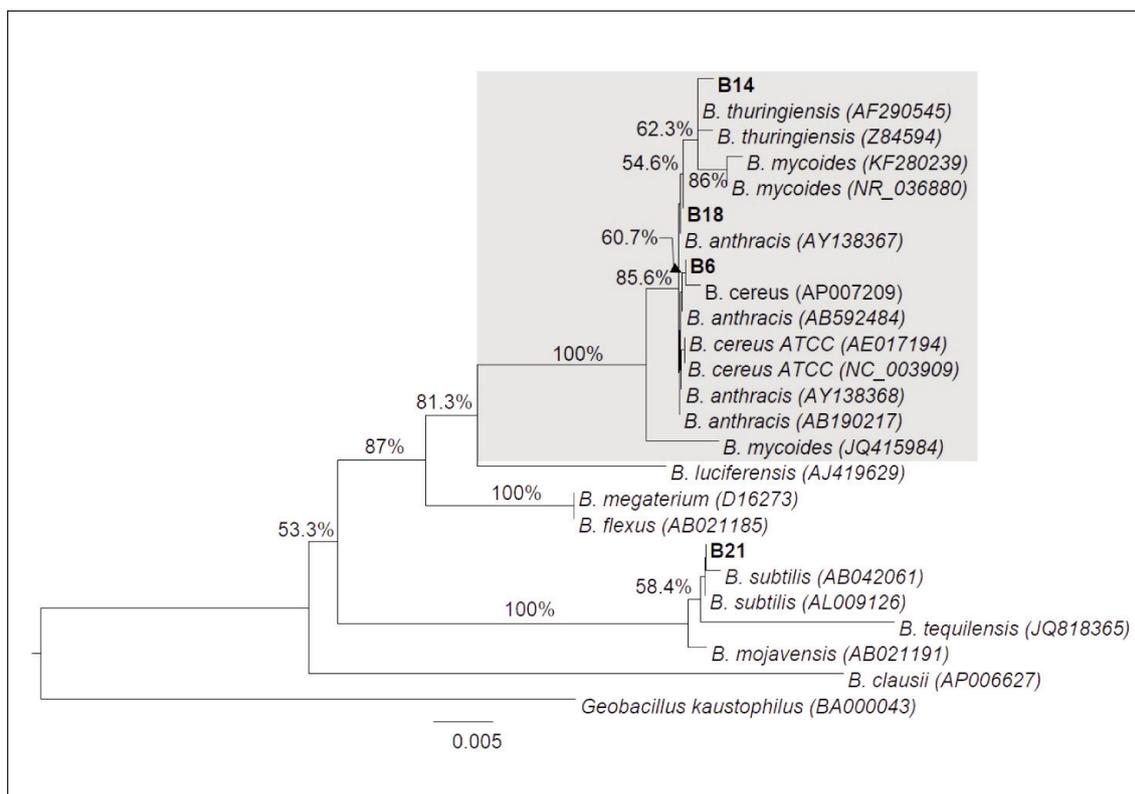


Figura 4. Árbol de distancia (Neighbour-Joining) derivado de secuencias parciales del gen 16S de cuatro aislados de *Bacillus* y 21 secuencias de referencia. (B14: aislado de mango; B06: aislado de jatropha; B18: aislado de maíz; B21: aislado de maíz).
 Figure 4. Distance tree (Neighbour-Joining) derived from partial sequences of the 16S gene of four isolates of *Bacillus* and reference 21 sequences. (B6 = isolated jatropha; B14 = isolated mango; B18 = isolated corn; B21 = isolated corn).

Conclusiones

Las dos especies identificadas en los tres aislados de *Trichoderma* mostraron altos y similares niveles de antagonismo contra *Phymatotrichopsis omnivora*. La especie *Trichoderma asperellum* predominó en el control de crecimiento de *P. omnivora*, aunque no es de las especies más reportadas en el control biológico contra fitopatógenos. La eficiencia de las cuatro cepas de *Bacillus* probadas en el control biológico de *P. omnivora* fue similar en los dos medios de cultivo (PDA y AN) es-

tudiados. Las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* nativas del noroeste de México, mostraron efectividad antagónica en el control de pudrición texana (*P. omnivora*) a nivel *in vitro*, por lo tanto, prometen ser potenciales microorganismos de control biológico contra este patógeno en evaluaciones posteriores a nivel invernadero o campo ya que al ser nativas de la región donde serán evaluadas, pueden tener mayores posibilidades de éxito por su probada adaptación al medio ambiente en el que fueron obtenidas.

Bibliografía

- Alabouvette C, Steinberg C (2006). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. pp. 123-144. In: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T., (eds). *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*, Springer, Netherlands. pp 123-144.
- Barnett HL, Hunter BB (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3th. Ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company. Minneapolis. 241 p.
- Bell D, Well H, Markham C (1982). "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Bisset J (1991). A revision of the genus *Trichoderma* II. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- Butt TM, Harris J, Powell K (1999). The European scene opportunities for biopesticides. In: *Biopesticides: use and delivery*, vol. 5. Humana Press, Totowa, N. J. pp. 23-44.
- Cervantes-Martínez R, Hernández-Hernández V, González-Cervantes G, Favela-Chávez E, Álvarez-Reyna VP (2010). Antagonismo de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. aisladas en la Comarca Lagunera contra *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar. *Revista Agraria-Nueva Época-Año VII*. 7(1,2,3): 34-40.
- Chan WT, Chen CS, Wang SL (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*. 47: 102-108.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W, Young CC (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*. 34: 33-41.
- Claus D, Berkeley RC (1986). «Genus *Bacillus* Cohn 1872», *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams y Wilkins Edit., Baltimore, EE.UU. pp. 1105-1139.
- Cowan ST, Steel KJ (1993). *Manual of the Identification of Medical Bacteria*. 3th. Ed. Cambridge University Press. 168 p.
- De la Garza JL (1996). *Fitopatología General*. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín Nuevo León. 515 p.
- De los Santos B, Barrau C, Blanco C, Arroyo F, Porrás M, Medina JJ, Romero F (2003). Relationship between *Trichoderma* soil populations and strawberry fruit production in previously fumigated soils. *Plant Pathology*. HortScience, 38: 400-1402.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Figueiredo MVB, Martínez CR (2008). Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Microbiology Biotechnology*. 24 :1187-93.
- Guigón C, Guerrero V, Vargas F, Carvaja E, Ávila GD, Bravo L, Ruocco M, Lanzuise S, Woo S, Lorito M (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. 28(2): 87-96.
- Guigón C, Gonzalez PA (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y Promotoras de Crecimiento en el Cultivo de Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. 22(1): 117-124.
- Korsten L, De Villiers EE, Wehner FC1, Kotzé JM. (1997). Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81 (5): 455-459.
- Kullnig CM, Krupica T, Woo SL, Mach RL, Rey M, Benitez T, Lorito M, Kubicek CP (2001). Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* 105: 769-772.

- Larralde CC, Santiago MR, Sifuentes RA, Rodríguez LI, Rodríguez PM, Shirai K, Narváez ZJ (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 167-177.
- Lo CT, Nelson EB, Hayes CK, Harman GE (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88: 129-136.
- López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Rafael Franco-Cendejas R (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Artículo de Revisión. *Investigación en Discapacidad* 3(1): 10-18.
- Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños HA, Cruz A (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal* 23(2): 118-125.
- Maughan H, Van der Auwera G (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 789-797.
- Ohba M, Aizawa K (1986). Insect Toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Japan. *Journal Invertebrate Pathology* 47(1): 12-20.
- Olsen M, Jeffrey C (1999). Disease and Production Problems of Cotton in Arizona. Plant Disease Publications. Cooperative Extension, College of Agriculture & Life Sciences, The University of Arizona. Az Press. 1124 p.
- Ooi TC, Ariff AB, Halimi MS, Shamsuddin ZH (2008). Growth kinetics of diazotrophic *Bacillus sphaericus* UPMB cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Malaysian Journal of Microbiology* 4(2): 15-25.
- Osorio-Hernández E, Rodríguez-Herrera R, Hernández-Castillo FD (2009). *Trichoderma* spp. una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *Ciencia Cierta* 17: 18-20.
- Papavizas GC, Davey ChB (1959). Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. *Soil Science* 88: 112-117.
- Ramírez-Villapudua J, Sáinz-Rodríguez RA, Quiñónez-Felix JA (2006). Cultivo, Enfermedades y Plagas del Mango, bajo el Sistema Convencional y Orgánico. Gobierno del Estado de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 3th Foro Estatal de Ciencia y Tecnología. Investigación para el desarrollo. 8 y 9 de Diciembre 2006. Culiacán, Sinaloa. pp. 1-2.
- Samaniego-Gaxiola JA, Herrera-Pérez T (2003). Producción de nuez en nogales (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) atacados por *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennébert. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 323-330.
- Samuels GJ (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100: 923-925.
- SAS Institute (2003). Statistical Analysis System version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- SAS Institute (2004). Statistical and Graphical Guide. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Uppalapati SR, Young CA, Marek SM, Mysore KS (2010). *Phymatotrichum* (cotton) root rot caused by *Phymatotrichopsis omnivora* retrospects and prospects. *Molecular Plant Pathology* 11(3): 325-334.
- Verma M, Brar SK, Tyag RD, Surampalli RY, Valero JR (2007). Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1-20.
- Von Arx JA (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer, Vaduz, Suiza, Alemania. 424 p.
- Watson WT, Kenerley CM, Appel DN (2000). Visual and infrared assessment of root colonization of apple trees by *Phymatotrichum omnivorum*. *Plant Disease* 84: 539-543.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocol: a guide to methods and application. Academic Press. Nueva York. pp. 315-320.

Yoon TM, Han JS, Yoo ID, Rajkarnikar A, Kim WG, Yang YY (2005). Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. Journal of Applied Microbiology 99(1): 213-21.

(Aceptado para publicación el 12 de febrero de 2015)