



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS
BACTERIANAS ANTAGONISTAS DEL CRECIMIENTO DEL HONGO
PATÓGENO DEL MAÍZ, *Sporisorium reilianum*.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:

ALEJANDRA VIANEY ROJAS OLVERA

DIRECTOR: DRA. YURIDIA MERCADO FLORES

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue financiado por la Fundación Hidalgo Produce y el Fomix - PONA y T Gobierno del Estado de Hidalgo.

A Dios, por darme la vida, felicidad, fuerza y sabiduría para enfrentar cada uno de los retos que me presenta. Por permitirme lograr esta meta tan importante en mi vida, gracias por acompañarme en cada uno de mis pasos y por cruzar en mi camino a personas que han sido apoyo y compañía a lo largo de mi vida. Gracias por Amarme.

A mi Directora de Tesis, la Dra. Furidia por brindarme la confianza para elaborar este proyecto de investigación, por darme la oportunidad de recurrir a su experiencia científica y laboral, por su cariño incondicional, por una afectuosa amistad. Gracias por darme una palabra de aliento en los momentos difíciles. De verdad no sé como agradecerle tanto apoyo y cariño. MUCHAS GRACIAS.

A mis padres, Alejandro y Maty principalmente por su infinito amor, apoyo, sobreprotección y cuidados. Gracias por enseñarme y dirigirme por el camino de la educación, por su exigencia ya que gracias a ella he sido una persona responsable y estricta en mi educación. Gracias por los valores inculcados en la niñez ya que son la base de la persona y profesionalista que soy ahora. Ustedes siempre serán mi inspiración, mi fuerza para luchar y alcanzar todas mis metas. Su esfuerzo es su triunfo y el mío. LOS AMO.

A mis hermanos Néstor, Emanuel y en especial a mis dos compañeritos de vida Stephanie y Angel de Jesús, quienes para mi son una bendición de Dios. Gracias por compartir gran parte de sus vidas conmigo, por tantos momentos llenos de alegría. Gracias por esos abrazos tan llenos de amor cuando más me han hecho falta, por un TQ AMO HERMANA para darme aliento en la ardua tarea de un nuevo día y en la trayectoria profesional, Gracias por existir, son mi motivo para seguir luchando. MUCHOS NIÑOS, LOS AMO.

A mis lindos abuelitos, Lucia y Constantino, por encomendarme siempre a Dios para que hiciera de mi una persona de bien y salir adelante ante cualquier obstáculo. Por todo el tiempo que dedicaron para cuidarme y educarme. Por mostrarme lo bella que es la vida, por las palabras de aliento que me regalaron en los buenos y malos momentos de mi vida, por su apoyo incondicional en todas mis decisiones. Gracias por enseñarme el significado de la palabra FAMILIA. Gracias por demostrarme que todo esfuerzo es al final una gran recompensa, por siempre estar presentes, por tanto amor y paciencia. Son mi motor. LOS AMO.

A mi tía *Paneth*, por todo su amor, sus cuidados, su comprensión, por su incondicional apoyo, sus buenos consejos, por darse tiempo para escucharme, por siempre tener una palabra de aliento, por demostrarme lo importante que soy en su vida y a mi tía *Gaby* por cuidar de mí, por siempre acompañarme en todos los momentos importantes de mi vida, por siempre estar cuando más la he necesitado, por preocuparse por mí en todo momento, por luchar junto a mí, por ser mi cómplice y amiga, por su apoyo incondicional para llegar a esta meta, por ser el grande apoyo en la Familia y simplemente por entregarme su amor de madre. Fueron indispensables para lograr esta meta y lo son en mi vida. *LOS AMO*.

A cada uno de los miembros de la *Familia Rojas y Familia Obvera*, por sus oraciones, su confianza, amistad, cariño y amor. A cada uno de ellos les estaré agradecida toda mi vida. Este logro también es de ustedes.

A *Jorge*, quien ha estado conmigo incondicionalmente paso a paso en mi formación profesional, quien me ha dado su total apoyo para la realización de esta tesis, quien me ha exigido ser la mejor en todo momento, por sus sabios consejos y sus miles de palabras de aliento que me ayudaron a levantarme y seguir luchando. Gracias por ser parte de mi vida.

A *Milton de Jesús* por todo su apoyo, paciencia, ánimos y cariño. Gracias por existir y estar conmigo en el último paso de este proyecto. *TE AMO*.

A *Pris y Mary*, dos personitas que han sido mi apoyo total durante este agradable y difícil periodo académico, por acompañarme y no dejarme sola en la aventura de la investigación, por su cariño, por sus consejos, por ser mis compañeras, amigas y cómplices incondicionales. *LOS QUISIERO*.

A mis amigos de Laboratorio, *Paty, Ivan y Zam*, por hacer que cada minuto en el laboratorio fuera ameno, por su apoyo incondicional, ánimo y colaboración en todo momento. De corazón gracias por sus enseñanzas y ayuda. *LOS QUISIERO*.

A cada uno de los profesores que participaron en mi desarrollo profesional, sin sus conocimientos, disposición y comprensión no hubiera logrado mi objetivo. Un agradecimiento especial a mis amigos del museo de Paleontología por todo su cariño, apoyo, consejos y su valiosa amistad. *LOS QUISIERO*.

*A Jorge Alberto por el apoyo que me brindo, disposición y comprensión. Con mucho cariño
MIL GRACIAS.*

Y por último a todos mis amigos, sin dar particular, por ayudarme a crecer, madurar, por estar siempre conmigo apoyándome en todo momento, por su colaboración y ánimo, desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado su cariño y amistad.

Eternamente Agradecida: Alejandra Vianey.

DEDICATORIA

A DIOS por ayudarme a lograr esta meta.

Con todo mi cariño y amor a TODAS LAS PERSONAS que me aman, me apoyan y creen en mí.

Dios los bendiga siempre.

INDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	2
II. Antecedentes.....	6
II. I. El maíz y el carbón de la espiga.....	6
II. II. Importancia económica.....	9
III. Justificación.....	13
IV. Objetivos.....	14
V. Procedimiento experimental.....	15
V.I. Microorganismos y conservación.....	15
V.II. Medios de cultivo.....	15
V.III. Identificación molecular de <i>S. reilianum</i>	16
V.III.I. Extracción de DNA genómico de <i>S. reilianum</i>	16
V.III.II. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de <i>S. reilianum</i>	16
V.III.III. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	16
V.IV. Muestras de suelo.....	17
V.V. Aislamiento de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S reilianum</i>	17
V.VI. Caracterización de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilienum</i>	18
V.VI.I. Determinación de la morfología colonial.....	18
V.VI.II. Determinación de la morfología microscópica.....	19
V.VII. Determinación de la curva de crecimiento de las bacterias con actividad antagónica del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	19
V.VIII. Cinéticas de producción de los compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	19
V.IX. Identificación molecular de las bacterias con actividad antagónica de <i>S. reilianum</i>	21
V.IX.I. Extracción de DNA bacteriano.....	21
V.IX.II. Amplificación del 16S rDNA mediante Reacción en Cadena de la polimerasa y secuenciación.....	21
V.IX.III. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	21

V.IX.IV. Análisis de las secuencias.....	22
VI. Resultados.....	23
VI.I. Identificación molecular de la cepa de <i>S. reilianum</i>	23
VI.II. Aislamiento de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	24
VI.III. Caracterización de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	27
VI.III.I Morfología microscópica.....	27
VI.III.II Morfología colonial.....	28
VI.IV. Cinéticas de producción de los compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	31
VI.V. Identificación molecular de las bacterias con actividad antagónica del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	36
VII. Discusión.....	44
VIII. Conclusiones.....	50
IX. Literatura citada.....	51
X. Documentos en línea.....	54
XI. Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.....	55
XII. Anexo 2. Preparación de TAE 10X.....	57

Índice de figuras.

Figura 1. Imágenes del carbón de la espiga ocasionado por <i>S. reilianum</i>	7
Figura 2. Imágenes de las teliosporas de <i>S. reilianum</i>	9
Figura 3. Distribución Geográfica de <i>S. reilianum</i>	10
Figura 4. Distribución Geográfica del carbón de la espiga en el territorio nacional.....	10
Figura 5. Diseño experimental para la determinación de la actividad antagónica del crecimiento de <i>S. reilianum</i> con extractos obtenidos a partir de bacterias aisladas de suelo.....	20
Figura 6. Electroforesis del DNA de <i>S. reilianum</i>	23
Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR para la identificación de <i>S. reilianum</i>	24
Figura 8. Cepas bacterianas Gram (+) que mostraron efecto inhibitorio del crecimiento del hongo <i>S. reilianum</i>	25
Figura 9. Cepas Bacterianas Gram (-) que mostraron efecto inhibitorio del crecimiento del hongo <i>S. reilianum</i>	26
Figura 10. Curvas de crecimiento de las bacterias Gram (+) con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	31
Figura 11. Curvas de crecimiento de las bacterias Gram (-) con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	32
Figura 12. Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>S. reilianum</i> de los extractos obtenidos por filtración de las bacterias Gram (+).....	34
Figura 13. Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>S. reilianum</i> de los extractos obtenidos por filtración de las bacterias Gram (-).....	34
Figura 14. Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>S. reilianum</i> de los extractos obtenidos por esterilización por calor húmedo de las bacterias Gram (+).....	35

Figura 15. DNA total de bacterias de las cepas con actividad antagónica del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	36
Figura 16. Amplificación del 16S rDNA de las bacterias Gram positivas aisladas.....	37
Figura 17. Secuencia del gen 16SDNAr obtenida de la cepa 150.....	38
Figura 18. Secuencia del gen 16S rDNA obtenida de la cepa 160.....	38
Figura 19. Alineamientos pareados entre la cepa 150 con la cepa 160.....	40
Figura 20. Alineamientos pareados entre la cepa 150 con la cepa de <i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10078.....	41
Figura 21. Alineamientos pareados entre la cepa 160 con la cepa de <i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-23 16S.....	42

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Características coloniales del crecimiento bacteriano en medio sólido.....	18
Cuadro 2. Morfología microscópica de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	27
Cuadro 3. Morfología colonial de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de <i>S. reilianum</i>	29
Cuadro 4. Efecto de inhibición del crecimiento <i>S. reilianum</i> producido por extractos extracelulares esterilizados por filtración obtenidos en diferentes fases del crecimiento de las bacterias aisladas.....	35
Cuadro 5. Efecto de inhibición del crecimiento <i>S. reilianum</i> producido por extractos extracelulares esterilizados por calor húmedo obtenidos en diferentes fases del crecimiento de las bacterias aisladas.....	36
Cuadro 6. Resultados del análisis con el programa BLAST de la cepa 150.....	39
Cuadro 7. Resultados del análisis con el programa BLAST de la cepa 160.....	39

Resumen.

El hongo *Sporisorium reilianum* causa el “carbón de la espiga” del maíz una enfermedad de distribución mundial que ha ocasionado numerosas pérdidas económicas. En el Estado de Hidalgo este basidiomiceto fue reportado en 318 campos de cultivo de maíz y hasta ahora, no se han encontrado fungicidas efectivos para el manejo de la enfermedad.

En este trabajo se aislaron bacterias de suelos de cultivos de maíz con capacidad de inhibir el crecimiento de *S. reilianum* para ser utilizadas como alternativa en el control de la enfermedad.

Se trabajó con una cepa de *S. reilianum* aislada en Mixquiahuala, Hgo., la cual fue identificada mediante PCR. Se aislaron 300 cepas bacterias con características coloniales diferentes, de las cuales 27 mostraron capacidad de inhibir el crecimiento del hongo en estudio (18 fueron Gram negativas y nueve Gram positivas).

Con la finalidad de obtener extractos extracelulares con actividad inhibitoria de *S. reilianum* se realizaron curvas de crecimiento de cada cepa de bacterias y se tomaron muestras de la fracción extracelular en las fases de crecimiento logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria tardía. Los extractos con mayor actividad de 10 bacterias probadas fueron obtenidos en la fase estacionaria tardía de crecimiento, dos de ellos soportaron un proceso de esterilización por calor húmedo. Las dos bacterias con capacidad de producir compuestos termoestables que inhiben el crecimiento de *S. reilianum* fueron identificadas por secuenciación del gen 16S rDNA.

I. Introducción.

El maíz (*Zea mays*) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación humana y animal, y con aplicaciones importantes en la industria, es por esta razón que a nivel mundial se destinan grandes superficies agrícolas para su cultivo (Giménez *et al.*, 2002).

Este cereal frecuentemente se ve afectado por distintas enfermedades y plagas, de las cuales aquellas que son ocasionadas por hongos constituyen las más importantes (Sexton y Howlett. 2006).

El carbón de la espiga, cuyo agente causal es el basidiomiceto *Sporisorium reilianum*, es una enfermedad sistémica que ataca el maíz. El hongo penetra en la plántula y crece dentro de ella, mostrando los síntomas en la etapa de floración. Existen pocas estrategias para el control de la enfermedad en campo, la que tiene mayor aceptación es la utilización de híbridos tolerantes con poco valor comercial, y los fungicidas que se utilizan son poco efectivos. La rotación de cultivos es otra alternativa, sin embargo las teliosporas del hongo permanecen viables en el suelo por muchos años (Pérez y Badillo, 2007).

Control biológico.

Desde el advenimiento de la agricultura el hombre ha combatido las plagas que compiten con él, por los mismos medios de supervivencia, recurriendo al uso de compuestos químicos tóxicos, denominados plaguicidas que son contaminantes que el ser humano esparce deliberadamente en el ambiente poniendo en riesgo la salud Pública. En la actualidad se utilizan más de 35,000 productos, los cuales dependiendo su objetivo pueden clasificarse en insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, molusquicidas, nematocidas y rodenticidas (Norma Oficial Mexicana NOM-035-FITO-1995; Mugica y Figueroa, 1996).

El uso indiscriminado de plaguicidas no solo contribuye a la destrucción de organismos nocivos para los cultivos, sino que también destruye e inhibe la

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

proliferación de organismos que son benéficos para plantas. Por otro lado la alta persistencia de estos compuestos tóxicos en el ambiente disminuye la calidad agroalimentaria de los vegetales que se producen (Agrios, 1999). Una alternativa eficaz para evitar el uso de compuestos químicos en el manejo fitosanitario es el control biológico, el cual se define como la destrucción total o parcial de patógenos por medio de otros organismos, proceso que frecuentemente ocurre en la naturaleza y cuya utilización en la agricultura ha ido en aumento (Agrios, 1999; Spardo y Gullino, 2004). Esa capacidad natural de los microorganismos de inhibir el crecimiento o la actividad metabólica de otros organismos, ha sido bien documentada y continúa siendo inspiración para la realización de investigaciones que contribuyan al descubrimiento de nuevas drogas y para la protección de diferentes cultivos y sus productos (Agrios, 1999; Whipps, 2001; Duffy, 2003).

Agrios (1999), señala algunos mecanismos usados por los microorganismos antagonistas que efectúan a la población de patógenos; por lo general no son muy claros, pero de manera general se mencionan los siguientes:

- Parasitismo directo y muerte del patógeno.
- Competencia con el patógeno por el alimento.
- Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por el medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.
- Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, como el etileno, liberadas por la actividad metabólica del organismo antagonista.

En años recientes el hombre ha intentado sacar ventaja de dichos antagonismos biológicos naturales y ha estado desarrollando estrategias que le permitan aplicar eficazmente el control biológico contra diferentes enfermedades de plantas. Dichos antagonistas, gracias a los antibióticos que producen, por competencia por el alimento o al parasitar directamente al patógeno, evitan que

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

este último alcance poblaciones suficientemente altas como para que se difunda ampliamente la enfermedad. (Agrios, 1999)

Muchos de los microorganismos antagonistas existen naturalmente en los suelos de los campos de cultivo y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fitopatógenos, a pesar de las actividades humanas. Sin embargo, el hombre ha hecho intentos por aumentar la efectividad de los microorganismos antagonistas, ya sea introduciendo poblaciones nuevas y más prolíficas de antagonistas, como por ejemplo *Trichoderma harzianum* y *Bacillus penetrans* en campos donde faltan y/o añadiendo enmiendas al suelo que sirven como nutrientes (o que estimulan el crecimiento) de los microorganismos antagonistas e incrementan su actividad inhibitoria sobre el patógeno. Desafortunadamente aún cuando dichos procedimientos han demostrado ser eficaces tanto en el invernadero como en el laboratorio, ninguno de ellos ha dado buenos resultados en el campo. Los nuevos microorganismos que se incorporan al suelo de un campo de cultivo no pueden competir con la microbiota que existe en él y no sobreviven durante mucho tiempo. Hasta ahora, las enmiendas aplicadas no han funcionado lo suficiente para seleccionar, mantener e incrementar únicamente las poblaciones de los antagonistas introducidos o ya presentes, es por esta razón que el control final de las enfermedades por éste método es bastante limitado. Existen otros casos en donde se ha podido controlar biológicamente con éxito a los fitopatógenos cuando los microorganismos antagonistas se utilizan para proteger directamente a las plantas de la infección causada por los patógenos (Agrios, 1999).

La acción micoparásita ha sido visualizada como crecimiento de micelio en forma de hifas alrededor del hongo que va a parasitar. El micelio penetra con una acción lítica, resultado de la destrucción, desintegración y descomposición de materiales biológicos. El micoparasitismo sería un mecanismo de acción muy efectivo por la evidencias en laboratorios. (Morales, 1997).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Se ha demostrado que *Trichoderma* spp. es una especie de hongo muy eficiente contra una amplia gama de hongos fitopatógenos como por ejemplo, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium homeoeocarpa* y *Alternaria alternata* a través de la competencia y predación. Desde 1930 se tiene reportada la capacidad antagonista de este género y gracias a este proceso se han realizado numerosos estudios para darle uso en el control de enfermedades de las plantas. (Harman, 1996).

Por otro lado la bacteria *Bacillus subtilis* es conocida por ser antagonista de muchos hongos fitopatógenos. Este antagonismo se logra por diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes; exclusión de sitio; colonización de las bacterias en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento, con la finalidad de eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato. *B. subtilis* no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas. Las cuales son utilizadas por la industria para la elaboración de insecticidas y fungicidas. Esta especie corresponde al grupo de las Gram positiva, produce endosporas y estas estructuras son termoresistentes. (Nogórska *et al.*, 2007).

En México el uso del control biológico como herramienta ha permitido avanzar en la lucha contra poblaciones de plagas, evitando el uso excesivo de compuestos químicos y consecuentemente el deterioro de los suelos agrícolas.

El control biológico en su sentido más amplio, es el proceso natural de regulación poblacional creado por la interacción de los componentes bióticos de un ecosistema. Incluye la mortalidad, la competencia entre individuos de una misma o de diferentes especies, los efectos de defensa y resistencia en organismos hospederos y los resultados directos o indirectos del ataque por organismos pertenecientes a niveles tróficos más altos (Granados, 1996).

El control biológico en la práctica es la manipulación, conservación e incremento de las poblaciones de organismos específicos benéficos para regular

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

las poblaciones de especies indeseables y así prevenir o reducir su impacto negativo en la producción y por tanto en el bienestar de los humanos. Supone el manejo de enemigos naturales como son parásitos, depredadores y patógenos para controlar la densidad poblacional de plagas de insectos, ácaros y malezas (Granados, 1996).

II. Antecedentes.

II. I. El Maíz y el Carbón de la espiga.

El maíz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial debido a que es utilizado principalmente en la alimentación de humanos y de ganado. Se ha estimado que más de 120 millones de hectáreas distribuidas en todo el mundo son utilizadas para la producción de este cereal; sin embargo, durante su cultivo y almacenamiento es susceptible a la presencia de enfermedades y plagas que se traducen en una disminución en su producción (Munkvold, 2003).

Una de las enfermedades más importantes es la ocasionada por *Sporisorium reilianum*, el agente causal del “carbón de la espiga”, la cual es distribución mundial y afecta principalmente al maíz (*S. reilianum* f. sp. *zeae*) y al sorgo (*S. reilianum* f. sp. *reilianum*) ocasionando numerosas pérdidas económicas. Este patógeno del suelo penetra a la planta durante la germinación de la semilla produciendo una infección sistémica que se manifiesta después de la floración. La característica más sobresaliente de la enfermedad es la presencia de masas carbonosas de color negro en mazorcas y en espigas; estas últimas presentan un desarrollo excesivo y deformaciones (Figura 1) (Fredericksen, 1977; Shurtleff, 1980; Matyac y Kommedahl, 1985; Martínez *et al*, 2000).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.



Figura 1. Imágenes del carbón de la espiga ocasionado por *S. reilianum*. Se observa la presencia de masas carbonosas de color negro las cuales substituyen a la mazorca y a la espiga, como se observa en los incisos A) y B), respectivamente.

S. reilianum pertenece al grupo Basidiomycota, Clase Ustilaginomycetes, Subclase Ustilaginomycetidae, Orden Ustilaginales Familia Ustilaginaceae, que incluye a los comúnmente llamados carbones. Estos infectan un gran número de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, la producción de esporas de color oscuro es su característica distintiva (Romero, 1993; Agrios, 1999).

La enfermedad carbón de la espiga se manifiesta en las espigas masculinas y mazorcas y se caracteriza por la presencia de soros que contiene esporas que substituyen la formación de polen y de grano destruyendo por completo a sus estructuras.

La infección en plántulas no presenta síntomas visibles y la infección se manifiesta por severos achaparramientos, acortamientos de entrenudos y esterilidad. Los síntomas visibles se expresan en plantas adultas, en los tejidos jóvenes activos, en yemas axilares, flores individuales de la mazorca y espigas (De León, 1984).

La incidencia del carbón de la espiga está relacionada a las condiciones ambientales y prácticas culturales. La plántula es infectada por teliosporas presentes en el suelo durante o después de la emergencia y el desarrollo de la

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

enfermedad es determinado por la humedad y temperatura del suelo, la fertilidad, el distanciamiento entre plantas y tipo de suelo (Matyac y Kommedaht, 1985).

El intervalo de temperatura óptimo para la infección es de 20 a 30° C y humedad del suelo de 15 a 25 %; la cantidad de esporas presentes en el suelo, la capacidad de infección, la virulencia del patógeno, la susceptibilidad de las variedades de maíz y la alcalinidad del suelo, influyen en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad (Mack, 1984; Romero, 1993).

Algunos carbonos pueden sobrevivir en la naturaleza, por cierto periodo de tiempo, *S reilianum* es un hongo con origen en el suelo que sobrevive en forma de teliospora (Figura 2); ataca a plántulas mediante micelio dicariótico septado y se desarrolla sistémicamente invadiendo órganos reproductivos no diferenciados (Romero, 1993). Los soros que destruyen las inflorescencias están cubiertos cada uno por peridio fungoso (tejido membranoso blanco) que se desintegra y forma células estériles esféricas o subesféricas, hialinas o amarillentas pálidas de 5 - 15 μm de diámetro. En los soros se forman bandas filamentosas de color blanco, las cuales son vestigios del sistema vascular de las inflorescencias. Las teliosporas son estructuras esféricas o subesféricas de color café amarillento pálido a rojizo oscuro o negro, equinuladas, de 9 - 12 μm de diámetro. Las teliosporas al germinar producen promicelio y esporidios laterales pequeños, hialinos y unicelulares con tipo de compatibilidad (+) y (-), aproximadamente en igual número que miden 7-15 μm de diámetro. Las teliosporas que germinan directamente en el suelo producen hifas infectivas dicarióticas. Las agallas que encierran las clamidosporas (teliosporas), se rompen con facilidad y caen al suelo, después de un periodo de reposo germinan e infectan semillas y posteriormente a plantas jóvenes. La teliospora joven sufre cariogamia, al madurar se transforma en esporas binucleadas diploides, estas esporas germinan inmediatamente o permanecen en un periodo de reposo de tres a cuatro meses (Alexopoulos, 1985).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

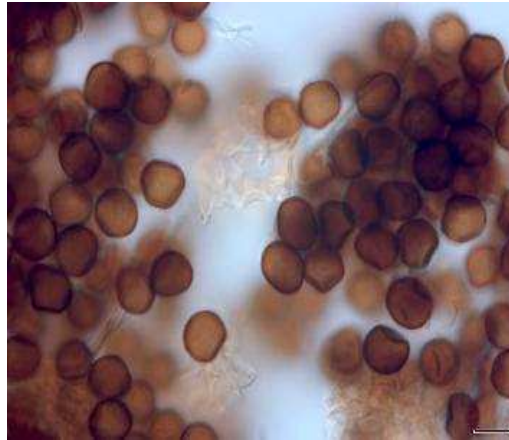


Figura 2. Imágenes de las teliosporas de *S. reilianum*, estas estructuras son el principal medio de diseminación de la enfermedad.

Varios autores mencionan que el uso de plantas resistentes es la mejor opción para el control de *S. reilianum* en maíz sembrado en condiciones de riego y temporal. En los programas de mejoramiento de maíz, se ha encontrado que genotipos de maíz que se evaluaron como resistentes al ataque de *S. reilianum* en un año, al siguiente se comportan como susceptibles y el grado de ataque varía según la zona y el año (Stromberg, 1984; Hirschhorn, 1986; Ramírez, 2000).

II.II. Importancia económica.

Todos los carbones son patógenos de plantas, existen aproximadamente 1100 especies que atacan a más de 75 familias de angiospermas y algunas especies están confinadas geográficamente a áreas pequeñas; en donde se encuentra la planta hospedadora (Alexopoulos, 1985).

S. reilianum es un hongo patógeno de distribución mundial (Figura 3) causa pérdidas importantes en países como Australia, Nueva Zelanda, URS, Sur de África, sureste de Europa, E. U. Y México, principalmente donde se practica intensivamente el cultivo de maíz; en los trópicos esta enfermedad presenta un mayor índice de infección, debido a las condiciones óptimas para el crecimiento del patógeno (Agrios, 1999).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

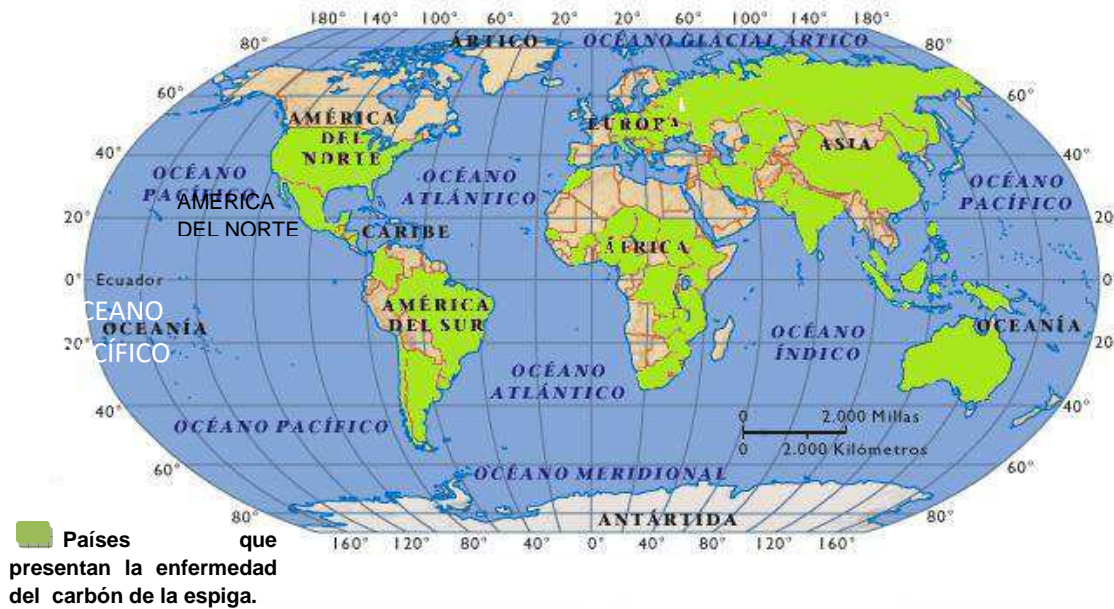


Figura 3. Distribución Geográfica de *S. reilianum*.

En México, la enfermedad se encuentra presente en los estados de Jalisco, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla, México y Veracruz (Figura 4); ataca principalmente a maíz de ciclo tardío en siembras de humedad residual y de temporal (Fuentes, 1962).



Figura 4. Distribución Geográfica del carbón de la espiga en el territorio nacional.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

La enfermedad que causa este hongo tiene un fuerte impacto en la economía de los productores disminuyendo sus ganancias considerablemente ya que es factible que con un 40% de afectación se tenga una pérdida total del ingreso neto.

En la década de 1960, se cuenta con reportes de afección de maíces criollos en el Valle del Mezquital, Hgo. A mediados de los 70's surgió como respuesta el híbrido H-133, que se mantuvo sin problemas hasta 1985, año en el que hubo daños de consideración, motivos por el cual fue remplazado por el H-135. Fue hasta 1998 cuando resurgió este problema fitosanitario en tres híbridos de maíz en los municipios de Tula y Francisco I. Madero. En 1999 productores reportaron daños en 10 parcelas y seis híbridos, principalmente en el municipio de Francisco I. Madero, San Salvador, Mixquiahuala y Tlaxcoapan.

El problema se fue acrecentando y en el año 2000 se atendieron reportes de 99 parcelas, 19 genotipos y 14 municipios, observándose un incremento considerable en ese año.

De acuerdo con los resultados de la evaluación del ciclo agrícola P.V. 2001, de los 22 municipios del Distrito de Desarrollo Rural se muestrearon 20, de los cuales 17 de ellos resultaron con algún grado de afección, sobresaliendo: Tlaxcoapan, Tlahuelilpan, Mixquiahuala, Atitalaquia, Tula de Allende, San Salvador y Fco. I. Madero (Pérez, 2002).

Existen algunos factores que limitan el uso de controladores biológicos como la menor competitividad con respecto al control químico; uno de los más importantes es el nivel sociocultural del agricultor.

Las condiciones de control cultural más aconsejables de poner en práctica para evitar o disminuir el ataque de *S. reilianum* son:

- En superficies pequeñas o parcelas con poca incidencia del carbón de la espiga, quitar las espigas enfermas y enterrarlas a una profundidad de 1m, fuera del territorio agrícola.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

- No arrojar espigas con carbón a los canales de riego.
- Sembrar semillas que estén tratadas con Triadimenol, ingrediente activo que reduce hasta en un 30% la incidencia del carbón de la espiga.
- Emplear materiales tolerantes al carbón de la espiga.
- Ajustarse a las fechas de siembra que muestran menor incidencia de carbón de la espiga.
- Evitar periodos prolongados de estrés de humedad al inicio del cultivo y durante la floración.
- Manejo adecuado de maquinas, lavado de materiales con agua a presión. (Pérez y Bobadilla, 2002).
- Fumigar o desinfectar la maquinaria agrícola principalmente las cosechadoras (antes de trabajar el terreno), pues son un vehículo de transporte de las esporas a terrenos agrícolas no infestados. (Pérez, 2002).

La implementación de estas medidas, en conjunto con un buen control biológico, es la base del manejo integrado eficiente de esta enfermedad.

III. Justificación.

El carbón de la espiga del maíz es una de las enfermedades que ocasiona numerosas pérdidas económicas, impactando año con año a la superficie sembrada con este cereal. Para combatir el problema los productores agrícolas utilizan variedades de maíz resistentes a la enfermedad y el uso de fungicidas que además de ser costosos contaminan los suelos agrícolas.

Dada la importancia que *S reilianum* ha adquirido recientemente en el Estado de Hidalgo, en este trabajo se realizó la búsqueda e identificación de bacterias que inhiben el crecimiento de este basidiomiceto, con el fin de ser utilizadas como una alternativa natural compatible con el medio ambiente en el control de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Efectuar la búsqueda, identificación y caracterización de bacterias antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz *Sporisorium reilianum* de muestras de suelo donde se cultiva maíz, en el municipio de Mixquiahuala, Hidalgo.

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar una cepa de *S. reilianum* aislada en el Estado de Hidalgo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica.
- Aislar bacterias a partir de suelos de cultivos de maíz con capacidad antagónica del crecimiento de los hongos *S. reilianum*.
- Determinar la morfología microscópica y colonial de las bacterias aisladas con capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos en estudio.
- Obtener extractos extracelulares con capacidad antagónica del crecimiento de los hongos en estudio a partir de los cultivos de las bacterias aisladas en diferentes fases del crecimiento.
- Identificar por métodos moleculares las bacterias con potencial para ser utilizadas en el control biológico de *S. reilianum*.

V. Procedimiento experimental

V.I. Microorganismos y conservación.

La cepa utilizada en este trabajo fue *S. reilianum* donada por el Dr. Gerardo Leyva Mir de la Universidad Autónoma de Chapingo, aislada de la localidad de Cinta Larga municipio de Mixquiahuala, Hgo.

Los microorganismos fueron conservados a largo plazo a temperatura ambiente en tubos con medio YPD inclinado con aceite mineral. Se realizaron resiembras periódicas en placas con YPD para tener disponible la cepa en cualquier momento.

Las cepas de bacterias aisladas se conservaron en glicerol al 25 % a una temperatura de -80°C.

V.II. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- Caldo Luria
- B de King
- Agar Soya Trypticaseína, TSA
- Agar Papa Dextrosa, PDA
- Caldo Papa Dextrosa, PDB
- Extracto de Levadura Peptona y Dextrosa YPD
- Agar Blando YPD

La formulación y preparación de cada medio de cultivo se encuentran en el Anexo 1.

V.III. Identificación molecular de *S. reilianum*.

V.III.I. Extracción de DNA genómico de *S. reilianum*.

La extracción del DNA genómico de *S. reilianum* se realizó por el método descrito por Hoffman y Winston (1987). La concentración y la calidad del DNA se determinó espectrofotométricamente, realizando lecturas a 260 nm y por la relación As260/As280, respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro Jenway (Peltier controller 6405uv/vis).

Las muestras de DNA fueron diluidas hasta obtener una concentración de 200 pg/μl para la realización de la PCR.

V.III.II. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *S. reilianum*.

Se realizó la identificación molecular de una cepa de *S. reilianum* del Estado de Hidalgo siguiendo la metodología descrita por Xu *et al*; (1999), utilizando el termociclador Axygen Maxigen.

V.III.III Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA y los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, en regulador TAE 10X (Anexo 2) a 80 V. Los geles se tiñeron en TAE con bromuro de etidio a una concentración de 0.2μg/ml, y se observaron con luz UV.

V.IV. Muestras de suelo.

Se colectaron muestras de suelo rizosférico y no rizosférico de cultivos de maíz de la localidad de Cinta Larga municipio de Mixquiahuala, Hgo., los cuales fueron conservadas a 4° C.

V.VI. Aislamiento de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

El aislamiento de bacterias se realizó mediante diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}) a partir de una suspensión de 10 g de suelo en 90 ml de agua destilada estéril. De las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-8} se tomó 0.1 ml y se inoculó por espatulado en placas con medio B de King por duplicado, las cuales posteriormente fueron incubadas a 28°C durante 48 horas. Se tomaron las cepas bacterianas que presentaron características coloniales diferentes y se conservaron en medio PDA.

Para la selección de bacterias con actividad antagonista, la cepa de *S. reilianum* se sembró en forma de césped en placas de YPD, para lo cual a partir de un cultivo en fase logarítmica en medio YPD, se tomó 0.1 ml y se adicionó a 3 ml de agar blando YPD; esta mezcla se agitó y se vertió en la placa con el mismo medio, en la cual el inóculo fue distribuido uniformemente. Posteriormente, cada cepa bacteriana aislada fue sembrada por picadura en el césped mediante la utilización de palillos estériles, teniendo cuidado de no sembrar más de 4 unidades formadoras de colonias. Las placas fueron incubadas a 28°C, durante 72 horas.

Las cepas con capacidad de inhibir el crecimiento de *S. reilianum* fueron seleccionadas por su capacidad en producir halos de inhibición.

Las cepas que mostraron actividad antagónica del crecimiento fueron conservadas a -80°C en glicerol al 25%.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

V.VI. Caracterización de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Las bacterias seleccionadas se sembraron por estría cruzada en medio TSA y se incubaron de 24 a 48 horas a 28° C; posteriormente, se determinó la morfología colonial y microscópica de cada cepa.

V.VI.I. Determinación de la morfología colonial.

Se realizaron observaciones al microscopio estereoscópico de las colonias aisladas crecidas en medio TSA de cada una de las bacterias y posteriormente se describieron sus características según el Cuadro I.

Cuadro I. Características coloniales del crecimiento bacteriano en medio sólido.

Característica	Descripción			
Tamaño	Diámetro en milímetros			
Forma	Puntiforme		Irregular	
	Circular		Rizoide	
	Filamentosa		Aguja	
Elevación	Plana		Pulvinada	
	Elevada		Umbonada	
	Convexa		Umbilicada	
Margen	Entero		Lacerado	
	Ondulado		Filamentosa	
	Lobulado		Enrulada	
Color	Blanco, amarillo, sepia, negro y otros.			
Luz reflejada	Brillante y mate			
Luz transmitida	Translúcida y opaca			
Consistencia	Butirosa, viscosa, membranosa, quebradiza y otras			

V.VI.II. Determinación de la morfología microscópica.

La morfología microscópica se determinó mediante la observación de frotis teñidos por la técnica de Gram (Hucker y Conn, 1927). Los resultados fueron corroborados mediante la reacción de KOH de la siguiente manera.

En un portaobjetos limpio se colocó una gota de solución de KOH al 3%. Posteriormente, se tomó con un asa estéril una porción del cultivo bacteriano y se mezcló con la gota durante unos segundos posteriormente se levantó lentamente el asa. La reacción fue considerada positiva sí se apreciaba la formación de un hilo, indicando que las bacterias pertenecen al grupo de las Gram negativas, por el contrario, si no se apreciaba la formación del hilo la reacción es negativa y la cepa pertenece al grupo de las Gram positivas.

V.VII. Determinación de las curvas de crecimiento de las bacterias con actividad antagonista de *S. reilianum*.

Se determinaron las curvas de crecimiento en medio PDB de cada una de las bacterias en estudio mediante el incremento en la absorbancia a 600 nm como se describe a continuación.

A partir de un preinóculo de 12 horas, se inocularon matraces de 500 ml con 100 ml de medio ajustando el cultivo a una absorbancia de 0.2 a 600 nm, posteriormente, se incubaron a 28°C en agitación (200 rpm.) y se tomaron lecturas cada dos horas. Con los datos obtenidos se construyeron las gráficas de las curvas de crecimiento.

V.VIII. Cinéticas de producción de los compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Una vez determinadas las curvas de crecimiento de cada cepa de bacterias se realizaron cultivos en matraces de 500 ml con 100 ml de medio PDB bajo las mismas condiciones que se especifican en el apartado V.6. Se tomaron muestras

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

de 10 ml en los tiempos en lo que los microorganismos se encontraban en las fases; logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria tardía de crecimiento. Cada muestra fue centrifugada a 5000 rpm. a 4° C y se dividió en dos alícuotas, una de ellas fue esterilizada por calor húmedo y la otra por filtración utilizando un filtro de 0.22 µm de poro. Posteriormente, para cada muestra se determinó su actividad antifúngica, para lo cual la cepa de *S. reilianum* fue sembrada en forma de césped en placas con YPD. Una vez distribuido el inóculo se colocaron cuatro tubos de plástico estériles sin fondo de 0.8 cm de alto X 0.5 cm de diámetro, colocados a una distancia de 2.5 cm con respecto al centro de la caja de Petri, en donde se adicionaron 200 µl del extracto (Figura 5). Las placas fueron incubadas a 28° C durante 48 horas y se compararon contra un testigo al cual en lugar de extracto se adicionaron 200 µl de medio PDB.

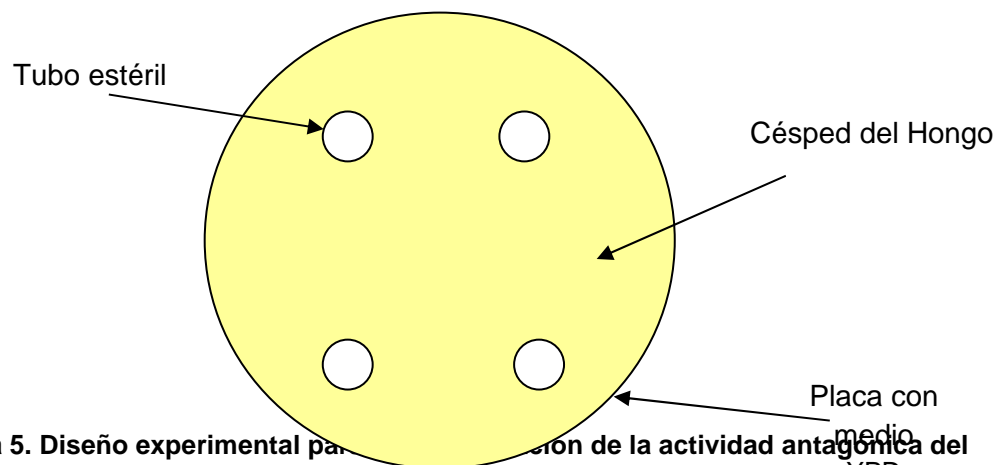


Figura 5. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antagonista del crecimiento de *S. reilianum* utilizando los extractos obtenidos a partir de bacterias aisladas de suelo.

V.IX. Identificación Molecular de las bacterias con actividad antagonista de *S. reilianum*.

V.IX.I. Extracción de DNA bacteriano.

La extracción del DNA bacteriano se realizó por el método descrito por Sambrook *et al*; (1989). La concentración y la calidad del DNA se determinó espectrofotométricamente, realizando lecturas a 260 nm y por la relación As260/As280, respectivamente.

V.IX.II. Amplificación del 16S rDNA mediante reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación.

Para la amplificación del gen 16SDNAr de las bacterias aisladas se utilizaron los iniciadores universales 8F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R 5'- GTTACCTTGTTACGACTT-3'. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes; desnaturalización inicial 5 min a 95° C , 30 repeticiones de 30 seg a 95° C, 30 seg a 54° C y 30 seg a 72° C, y finalmente 10 min a 72° C para la extensión final. Los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, USA) y posteriormente secuenciados mediante un servicio externo.

V.IX.III. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA y los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, en regulador TAE 1X a 80 V. Los geles se tiñeron en TAE con bromuro de etidio (10 mg/ml), y se observaron con luz UV utilizando un fotodocumentador de imágenes.

V.IX.IV. Análisis de las secuencias.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y comparadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 27 de Febrero de 2009.

VI. Resultados.

VI.I. Identificación molecular de las cepas de *S. reilianum*.

La cepa de *S. reilianum* utilizada en este trabajo fue identificada mediante PCR específica como describe Xu *et al*; (1999), para lo cual se realizó la extracción del DNA total del hongo el cual resultó ser de buena calidad como se muestra en la Figura 6.

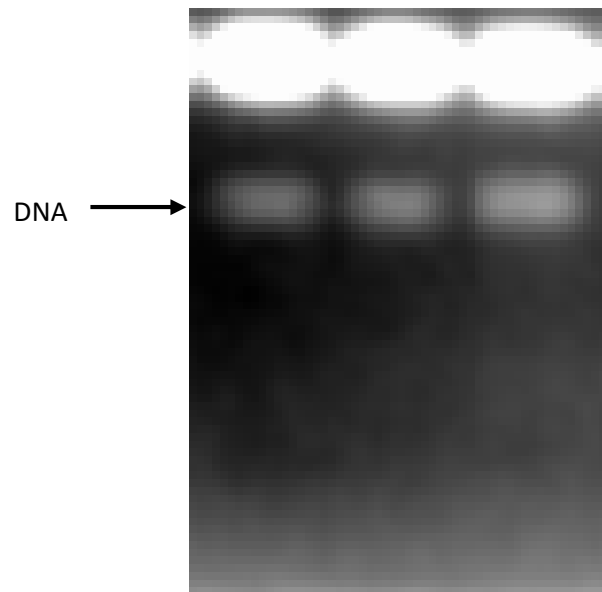


Figura 6. Electroforesis del DNA de *S. reilianum*.

A partir de la PCR específica se obtuvieron dos amplificados de 952 pb y de 962 pb utilizando dos pares de iniciadores específicos SR1 y SR2, respectivamente (Figura 7).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

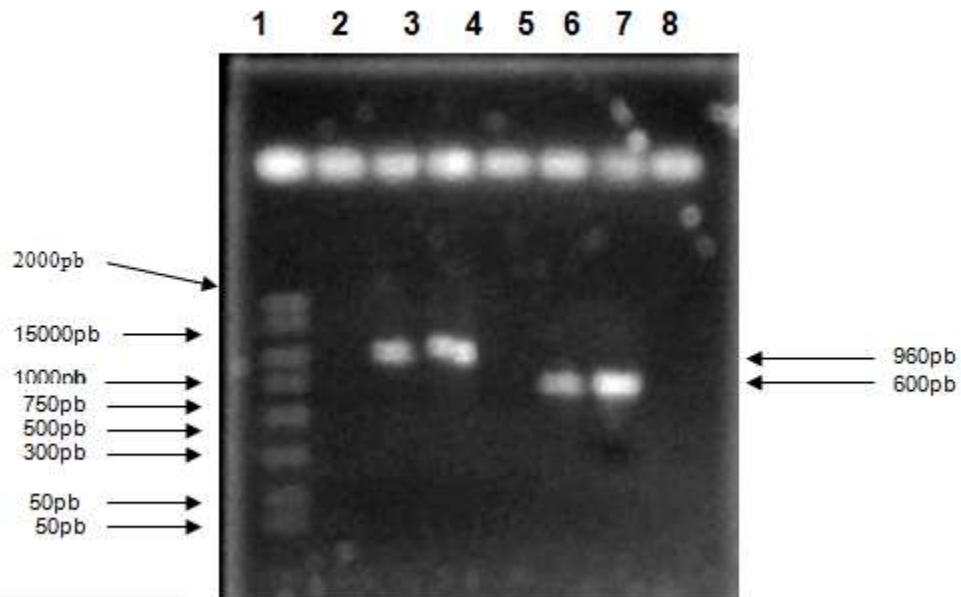


Figura 7. Electroforesis de los productos de PCR para la identificación de *S. reilianum*. Carril 1: Marcador de talla molecular DNA, PCR DNA Marker 50-2000pb Amresco, Carriles 3 y 4: Amplificación con los iniciadores SR1, Carriles 6 y 7: Amplificación con los iniciadores SR3. En cada uno de los carriles utilizados se colocaron 3µl del producto de la PCR.

VI.II. Aislamiento de las cepas bacterianas con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Se aislaron 300 cepas bacterianas de suelos de cultivo de maíz, de las cuales sólo 27 presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum* (Figuras 8 y 9).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

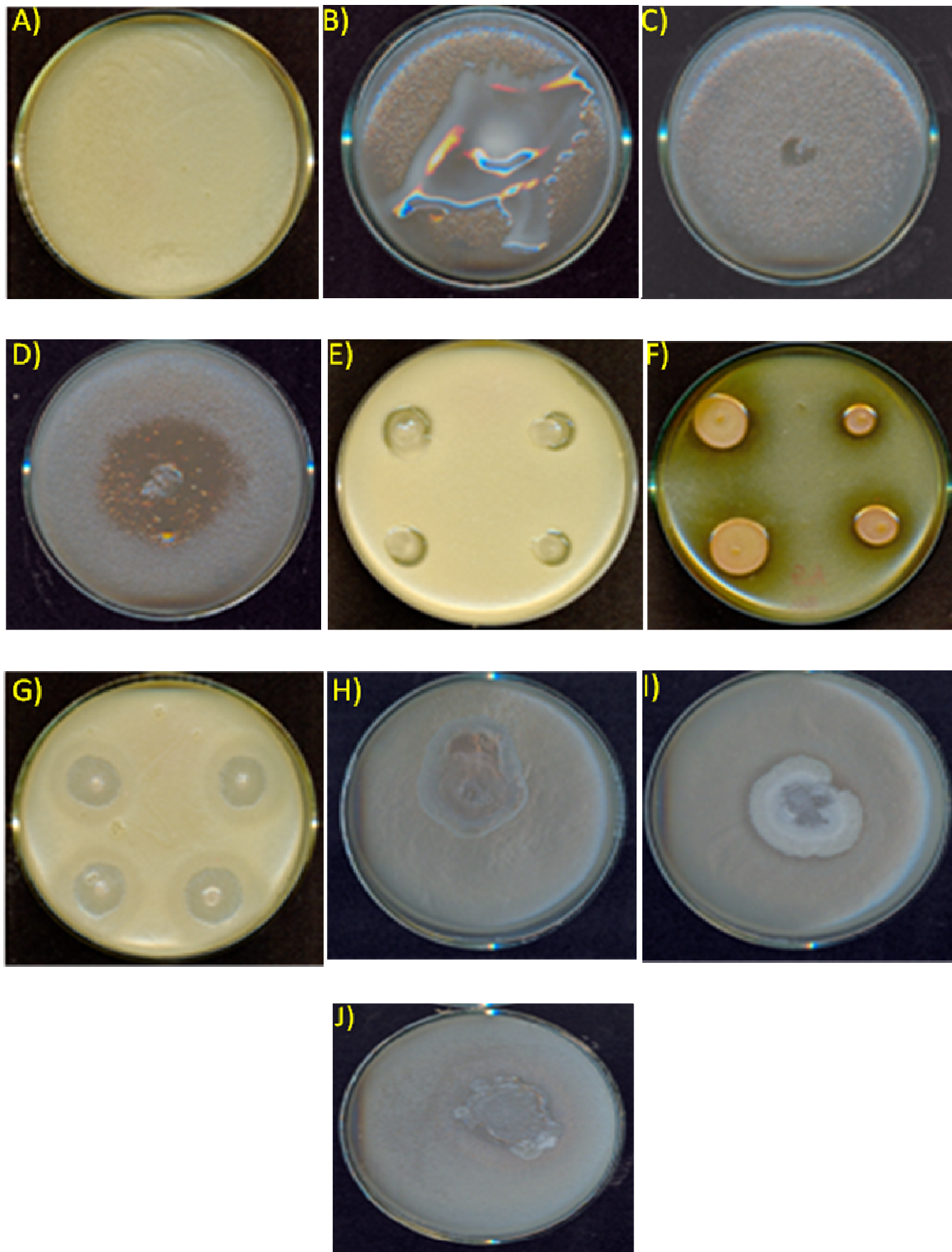


Figura 8. Cepas bacterianas Gram (+) que mostraron efecto inhibitorio del crecimiento del hongo *S. reilianum*. A) Testigo, B) Cepa 1, C) Cepa 12, D) Cepa 49, E) Cepa 53, F) Cepa 54, G) Cepa 64, H) Cepa 135, I) Cepa 150, J) Cepa 160. En cada una de las placas se puede observar el halo de inhibición.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

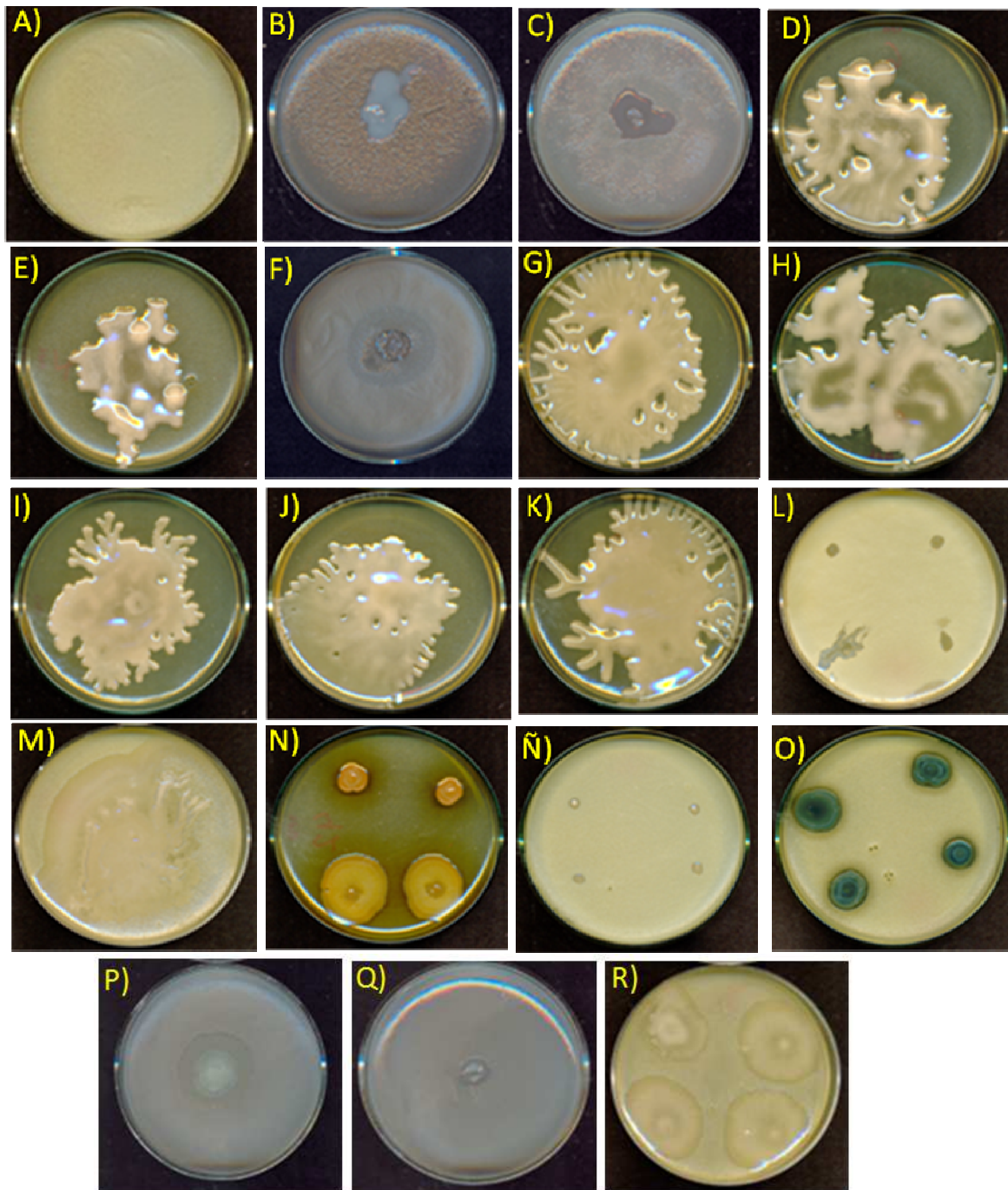


Figura 9. Cepas Bacterianas Gram (-) que mostraron efecto inhibitorio del crecimiento del hongo *S. reilianum*. A) Testigo, B) Cepa 3, C) Cepa 5, D) Cepa 6, E) Cepa 7, F) Cepa 11, G) Cepa 14, H) Cepa 15, I) Cepa16, J) Cepa 18, K) Cepa 20, L) Cepa 38, M) Cepa 39, N) Cepa 42, Ñ) Cepa 47, O) Cepa 51, P) Cepa 66, Q) Cepa 115, R) Cepa 151. En esta imagen se observa que en algunas placas las bacterias han inhibido completamente el crecimiento del hongo en estudio, en algunas otras placas el halo de inhibición es más reducido.

VI.III. Caracterización de las cepas bacterianas con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

VI.III.I. Morfología microscópica.

Para determinar la morfología microscópica de las bacterias que presentaron actividad inhibitoria del crecimiento del hongo en estudio se realizaron tinciones de Gram de las cuales 9 resultaron ser Gram positivas y 18 Gram negativas (Cuadro II). Estos resultados fueron corroborados mediante la reacción del KOH como se describe en el procedimiento experimental.

Cuadro II. Morfología microscópica de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Cepa	Gram	KOH	Morfología
UT 1	(+)	(-)	Cocos
UT 3	(-)	(+)	Cocos
UT 5	(-)	(+)	Bacilos
UT 6	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 7	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 11	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 12	(+)	(-)	Bacilos largos
UT 14	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 15	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 16	(-)	(+)	Bacilos
UT 18	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 20	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 38	(-)	(+)	Bacilos
UT 39	(-)	(+)	Bacilos cortos

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Cuadro II. Continuación. Morfología microscópica de las bacterias con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Cepa	Gram	KOH	Morfología
UT 42	(-)	(+)	Cocos
UT 47	(-)	(+)	Cocobacilos
UT 49	(+)	(-)	Bacilos
UT 51	(-)	(+)	Bacilos
UT 53	(+)	(-)	Bacilos
UT 54	(+)	(-)	Cocobacilos
UT 64	(+)	(-)	Bacilos
UT 66	(-)	(+)	Bacilos cortos
UT 115	(-)	(+)	Bacilos
UT 135	(+)	(-)	Bacilos
UT 150	(+)	(-)	Bacilos
UT 151	(-)	(+)	Bacilos
UT 160	(+)	(-)	Bacilos

VI.III.II. Morfología colonial.

Se encontró que todas las cepas bacterianas aisladas presentaron características coloniales diferentes como se muestra en la Cuadro III.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

VI.IV. Cinética de producción de los compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.

Se realizaron las curvas de crecimiento en medio PDB de cada una de las cepas aisladas. (Figuras 10 y 11). De los resultados obtenidos se seleccionaron los tiempos en los que cada cepa se encontraba en las fases logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria tardía del crecimiento, para obtener una muestra de la fracción extracelular, la cual fue esterilizada por filtración con la finalidad de eliminar las bacterias y medir únicamente el efecto de inhibición del crecimiento de *S. reilianum* de las sustancias que se producen.

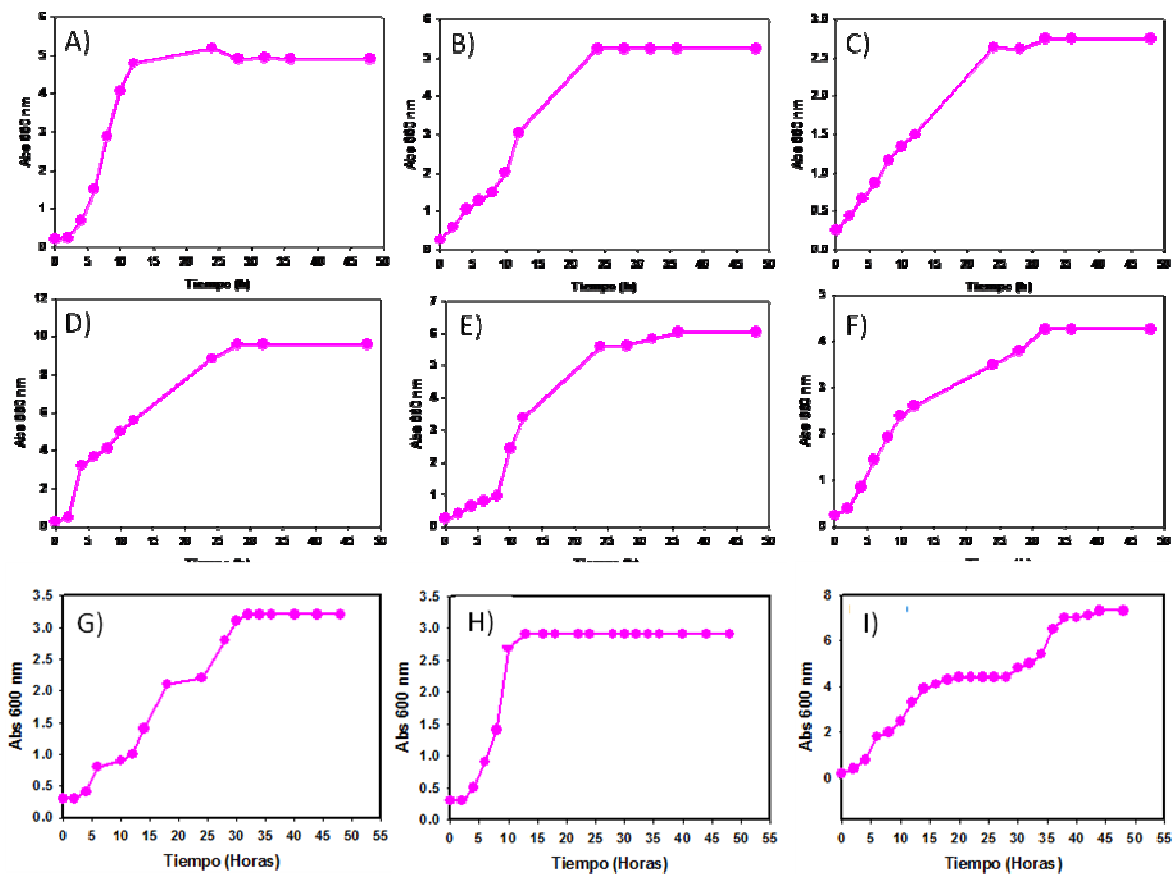


Figura 10. Curvas de crecimiento de las bacterias Gram (+) con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*. A) Cepa 1, B) Cepa 12, C) Cepa 49, D) Cepa 53, E) Cepa 54, F) Cepa 64, G) Cepa 135, H) Cepa 150 e I) Cepa 160. Se observa claramente la Fase Logarítmica, Estacionaria Temprana y Tardía.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

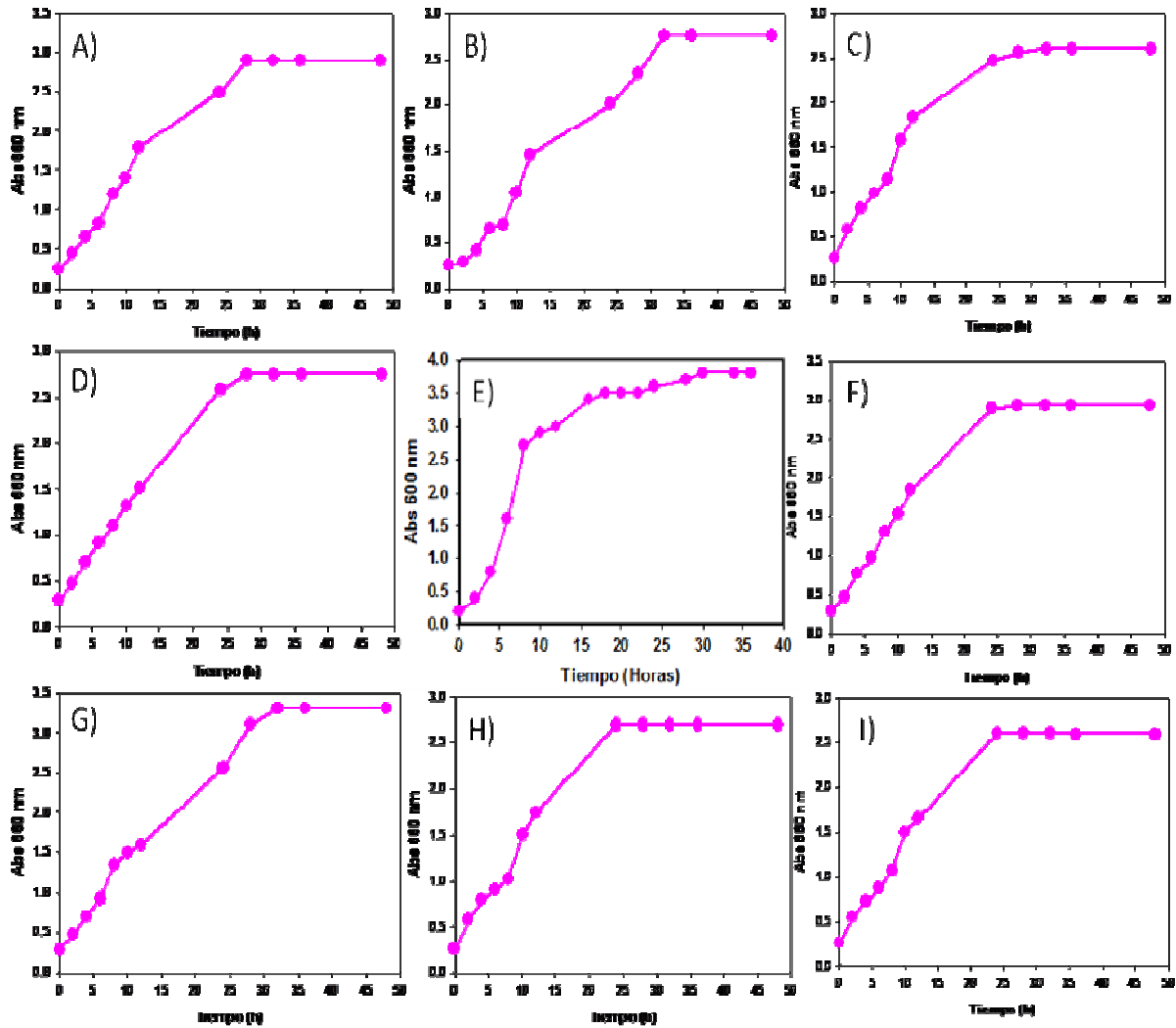


Figura 11. Curvas de crecimiento de las bacterias Gram (-) con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*. A) Cepa 3, B) Cepa 5, C) Cepa 6, D) Cepa 7, E) Cepa 11, F) Cepa 14, G) Cepa 15, H) Cepa 16 e I) Cepa 18. Se observa claramente la Fase Logarítmica, Estacionaria Temprana y Tardía.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

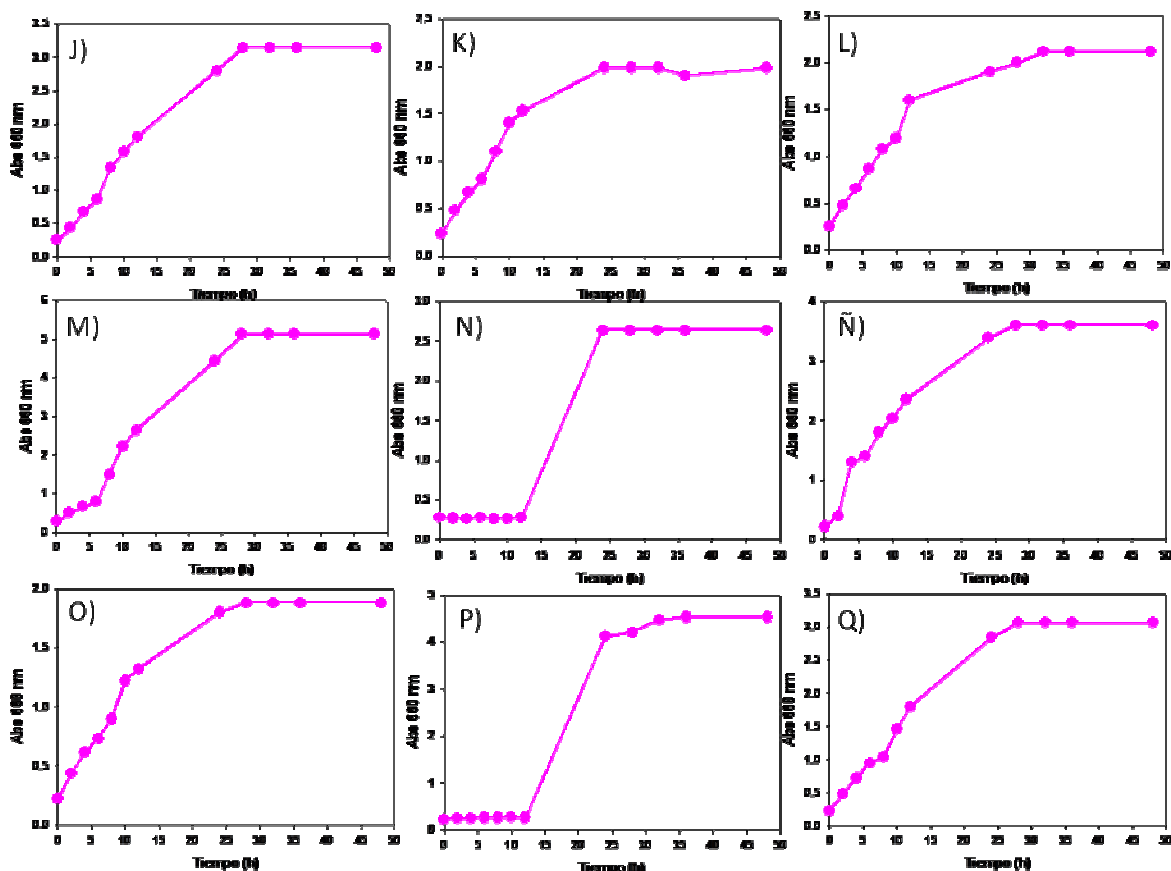


Figura 11. Continuación. Curvas de crecimiento de las bacterias Gram (-) con actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*. J) Cepa 20, K) Cepa 38, L) Cepa 39, M) Cepa 42, N) Cepa 47, Ñ) Cepa 51, O) Cepa 66, P) Cepa 115 y Q) Cepa 151. Se observa claramente la Fase Logarítmica, Estacionaria Temprana y Tardía.

Como se muestra en las Figuras 12 y 13, sólo de 10 cepas se lograron obtener extractos con actividad inhibitoria de *S. reilianum*, del resto aunque se obtuvieron las muestras, estas no mostraron ningún efecto sobre el hongo (Cuadro IV).

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

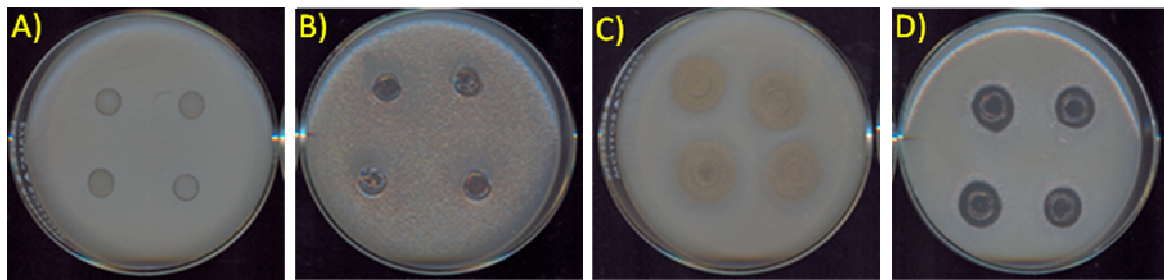


Figura 12. Efecto inhibitorio del crecimiento de *S. reilianum* de los extractos obtenidos por filtración de las bacterias Gram (+). A) Testigo, B) Cepa 1 en Fases Estacionaria Tardía, C) Cepa 150 en Fase Estacionaria Temprana, D) Cepa 160 en Fase Estacionaria Tardía.

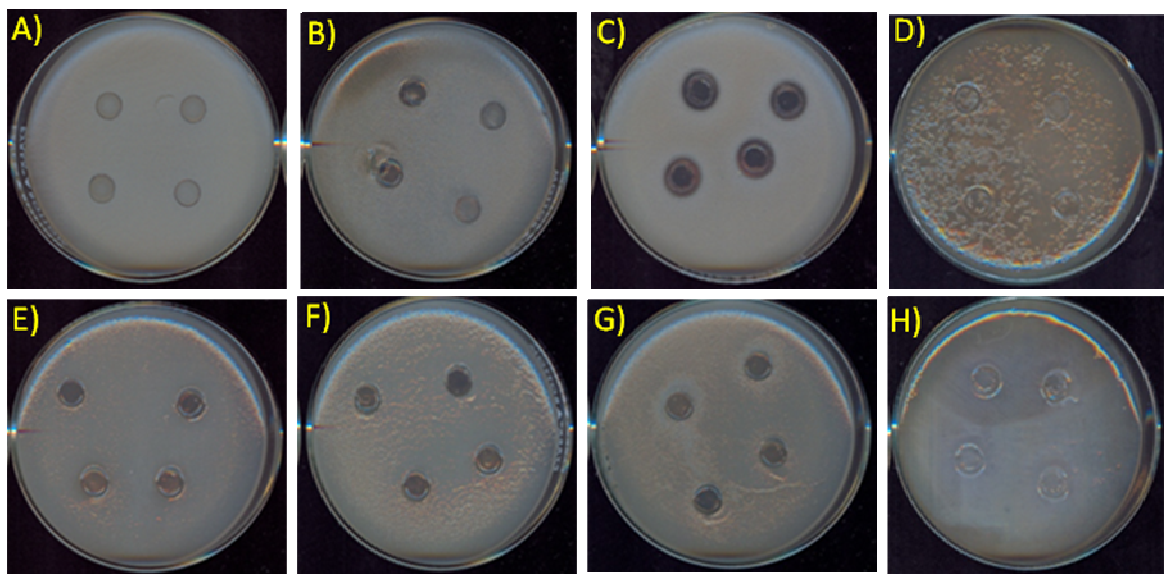


Figura 13. Efecto inhibitorio del crecimiento de *S. reilianum* de los extractos obtenidos por filtración de las bacterias Gram (-). A) Testigo, B) Cepa 5 en Fases logarítmica, C) Cepa 11 en Fase Estacionaria Tardía, D) Cepa 14 en Fase Logarítmica, E) Cepa 20, F) Cepa 38, G) Cepa 39 y H) Cepa 66 en la Fase Estacionaria Tardía.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Cuadro IV. Efecto de inhibición del crecimiento *S. reilianum* producido por extractos extracelulares esterilizados por filtración obtenidos en diferentes fases del crecimiento de las bacterias aisladas.

Bacteria	Inhibición en cm.			
	Testigo	Fase Logarítmica	Estacionaria Temprana	Estacionaria Tardía
UT 1	0.0	0.0	0.0	1.0
UT 5	0.0	1.0	0.0	0.0
UT 11	0.0	0.0	1.2	1.9
UT 14	0.0	1.0	0.0	0.0
UT 20	0.0	0.0	0.0	1.0
UT 38	0.0	1.0	1.0	1.0
UT 39	0.0	1.0	1.0	1.0
UT 66	0.0	0.0	3.5	4
UT 150	0.0	0.0	1.9	1.1
UT 160	0.0	0.0	1.3	1.4

De todas las muestras con actividad inhibitoria, dos de ellas obtenidas a partir de las cepas bacterianas 150 y 160 soportaron un proceso de esterilización por calor húmedo manteniendo su actividad (Figura 14 y Cuadro V).

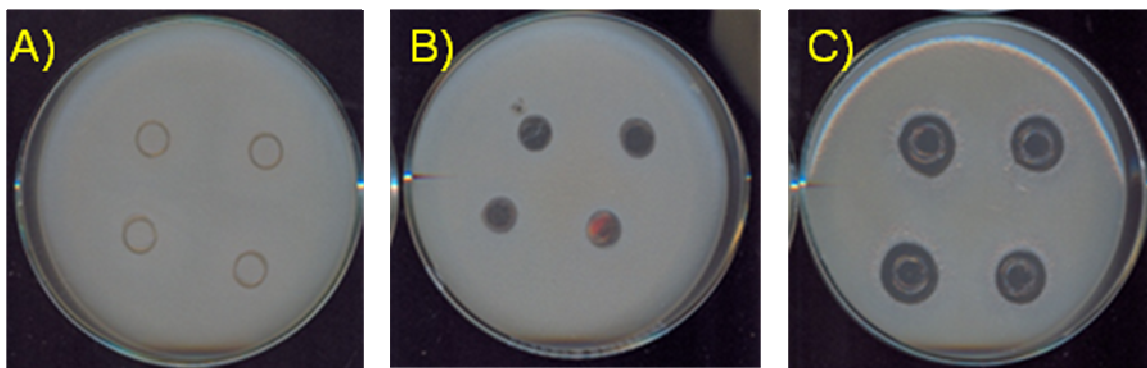


Figura 14. Efecto inhibitorio del crecimiento de *S. reilianum* de los extractos obtenidos por esterilización por calor húmedo de las bacterias Gram (+). A) Testigo, B) Cepa 150 y C) Cepa 160 en Fase Estacionaria Tardía.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

Cuadro V. Efecto de inhibición del crecimiento *S. reilianum* producido por extractos extracelulares esterilizados por calor húmedo obtenidos en diferentes fases del crecimiento de las bacterias aisladas.

Bacteria	Inhibición en cm.			
	Testigo	Fase Logarítmica	Estacionaria Temprana	Estacionaria Tardía
UT 150	0.0	0.0	0.0	1.0
UT 160	0.0	0.0	1.0	1.5

VI.V. Identificación molecular de las cepas bacterianas con actividad antagonista del crecimiento de *S. reilianum*.

Según los resultados anteriores las cepas 150 y 160 resultaron ser las más atractivas para ser utilizadas en el control de *S. reilianum* debido a que los extractos obtenidos a partir de ellas fueron termoestables, y por cuestiones de presupuesto únicamente se realizó la identificación molecular de estas dos cepas.

Como se muestra en la Figura 15, el DNA extraído de las bacterias en estudio resultó ser de buena calidad, ya que se observa una banda definida de alto peso molecular con ligera degradación.

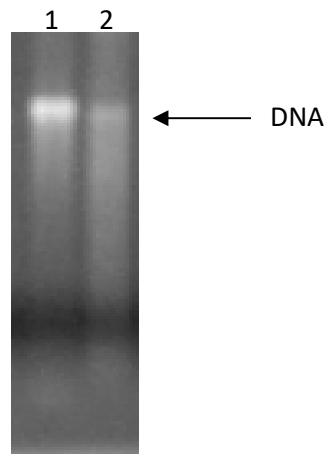


Figura 15. DNA total de bacterias de las cepas con actividad antagónica del crecimiento de *S. reilianum*. Carril 1: 150 y Carril 2: 160. En cada uno de los carriles fueron colocados 3µl de la misma muestra.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

El DNA extraído fue utilizado para la amplificación del gen 16S rDNA; para las dos cepas bacterianas se obtuvo el amplificado esperado de 1500 pb (Figura 16).

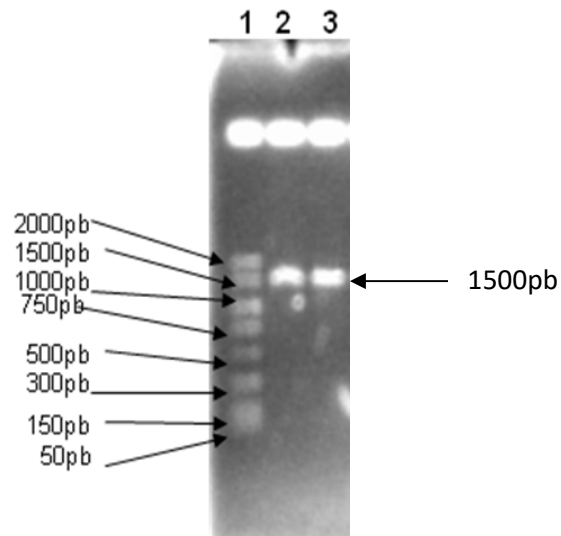


Figura 16. Amplificación del 16S rDNA de las bacterias Gram positivas aisladas. 1: Marcador de peso molecular DNA, PCR DNA Marker 50-2000pb Amresco, Carril 2: 150 y Carril 3: 160.

En cada uno de los carriles utilizados se colocaron 3µl del producto de la PCR.

Los fragmentos fueron secuenciados y las secuencias obtenidas (no se secuenciaron completos los genes) se muestran en las figuras 17 y 18.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

SECUENCIA DE LA CEPA 150

```

ATNCCACCGATCGATAGGTGTCGGATTTGGGCGTAAGGGCTCGCAGGCGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAACTGGGGAACCTTGTAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
CTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG
GGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGTTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGC
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA
GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAA
ATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGGTACACCCGAAGTCG
GTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCCGGAGTGGGACGATGATTGGGGA
GCNTNNNCNAGGGAAAAAANNNNNNNNNNNNNNA
    
```

Figura 17. Secuencia del gen 16SDNAr obtenida de la cepa 150. Se amplificó un fragmento de 952pb del gen 16S rDNA mediante la utilización de iniciadores universales. El producto de la PCR fue purificado y secuenciado.

SECUENCIA DE LA CEPA 160

```

NNNNAAATAAAAAACGATCGTAGTTTACGCTTATCCGGCGTAAACGCTAG
CAGTGTGATTTCTTGAGCCTGATGCGAAAGCTACCGGGTCACCCGGGAGG
GTCAATTGGAACTGAGGAACTTGTAGTGTGAAGAGGAGAGTGAATTCAC
CGTGTAGCGCTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGT
GTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
GCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACC
CGAAGTCGGTGGGTAACCTTTATGAAGCAGCCGCCAAAGTGGACAGAT
GATTGGGTGAGCTCCCACCAGGATAGGANNNNNCNCNNCCCCCGNCGNNN
NN
    
```

Figura 18. Secuencia del gen 16S rDNA obtenida de la cepa 160. Se amplificó un fragmento de 962pb del gen 16S rDNA mediante la utilización de iniciadores universales. El producto de la PCR fue purificado y secuenciado.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

La comparación de las secuencias en la base de datos del GenBank mediante el software BLAST mostró que las cepas 150 y 160 tienen un 99 y 97% de similitud, respectivamente, con secuencias del gen 16S rDNA de dos cepas de *B. subtilis* (Cuadro VI y VII).

Cuadro VI. Resultados del análisis con el programa BLAST de la cepa 150.

Especies	% de Identidad	Tamaño de la secuencia alineada
<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10078 16S ribosom	99.46	927
<i>Bacillus subtilis</i> strain CICC10048 16S ribosom	99.46	927
<i>Bacillus</i> sp. BM2 16S ribosomal RNA gene	99.35	928
<i>Bacillus subtilis</i> strain MSB10 16S ribosomal	99.35	928
<i>Bacillus</i> sp. DN2.6 16S ribosomal RNA gene	99.35	928
<i>Bacillus subtilis</i> strain S51 16S ribosomal RNA	99.35	928
<i>Bacillus subtilis</i> strain WD20 16S ribosomal RNA	99.35	928
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain sdg-26 16Sr	99.35	928
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain sdg-31 16Sr	99.35	928
<i>Bacillus subtilis</i> strain TCCC11429 16S ribosom	99.35	928

Cuadro VII. Resultados del análisis con el programa BLAST de la cepa 160.

Especies	% de Identidad	Tamaño de la secuencia alineada
<i>Bacillus subtilis</i> strain HDYM-23 16S ribosomal	97.21	931
<i>Bacillus subtilis</i> strain C90 16S ribosomal RNA	97.2	930
<i>Bacillus</i> sp. ZJUT-K15 16S ribosomal RNA gene	97.2	930
<i>Bacillus subtilis</i> strain QF-02 16S ribosomal	97.3	936
<i>Bacillus</i> sp. 50-3 16S ribosomal RNA gene	97.2	930
<i>Bacillus subtilis</i> strain Pab02 16S ribosomal	97.2	930
<i>Bacillus</i> sp. Aero1-1 gene for 16S rRNA	97.3	926
<i>Bacillus subtilis</i> strain ZJ06 16S ribosomal RN	97.2	930
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain LSC04 16S r	97.2	930
<i>Bacillus subtilis</i> isolate C9-1 16S ribosomal	97.2	930

VII. Discusión.

El uso del control biológico en el manejo de enfermedades y plagas agrícolas representa una alternativa eficaz con respecto al uso de pesticidas, las cuales frecuentemente son acumulados en las plantas, además de ser letales para organismos benéficos presentes en el suelo (Nogórska *et al*; 2007). El desafío actual en el desarrollo de esta práctica es la identificación de nuevas fuentes genéticas, químicas y biológicas, lo cual requiere de la participación de grupos multidisciplinarios los cuales buscan aportar alternativas que además de ser eficientes en el manejo fitosanitario sean compatibles con el medio ambiente (Gillican, 2008). Aunque se han estudiado diferentes microorganismos para ser utilizados como agentes de control biológico, existen importantes evidencias del papel de los antibióticos producidos por bacterias aisladas de suelo como supresores o inhibidores del desarrollo de fitopatógenos (Raaijmakers *et al*; 2002). En esta vertiente, en el presente trabajo se planteó la idea de utilizar bacterias aisladas de suelos de cultivos de maíz para el tratamiento del carbón de la espiga ocasionado por *S. reilianum*.

De las 300 cepas de bacterias aisladas, sólo 27 inhibieron el crecimiento del hongo en estudio mediante la producción de sustancias extracelulares difusibles en el agar. En general las bacterias Gram negativas mostraron mayor efecto de inhibición con respecto a las Gram positivas; sin embargo, aunque se realizó la obtención mediante esterilización por filtración de extractos de todas las bacterias, solo 10 de ellos mostraron actividad inhibitoria, la mayoría obtenidos de la fase estacionaria de crecimiento de siete bacterias Gram negativas (Cepa 5, 11, 14, 20, 38, 39 y 66) y tres Gram positivas (Cepa 1, 150 y 160), lo que indica que los compuestos producidos son metabolitos secundarios.

Se han reportado numerosas especies bacterianas utilizadas en el control de hongos fitopatógenos, debido a que presentan actividad anti-fúngica, mediante la producción de enzimas líticas extracelulares, sideroforos, antibióticos y metabolitos volátiles como el ácido cianhídrico (HCN) (Walker *et al*; 2001; Manwar

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

et al; 2004; Nagarajkumar *et al*; 2004; Compnat *et al*; 2005; Kishore *et al*; 2005; Sharifi-Therani *et al*; 2005; Afsharmanesh *et al*; 2006). Probablemente algunas de las bacterias aisladas en este trabajo, producen anti fúngicos volátiles o enzimas que pierden durante el proceso de obtención de los extractos y por esta razón no fue posible observar un efecto inhibitorio. Por otro lado, se puede suponer que es necesaria la presencia del antagonista debido a que la o las sustancias responsables de la inhibición se pudieran encontrar asociadas a las envolturas bacterianas.

Los extractos con mayor actividad antagónica fueron aquellos obtenidos a partir de las Gram positivas. Dentro de este grupo bacterias se han reportado algunas especies del género *Bacillus* que son utilizadas como agentes de control biológico tales como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*, así como algunas especies de otros géneros tales como, *Brevibacillus brevis*, los cuales inhiben el crecimiento de diferentes hongos patógenos de plantas debido a que son capaces de producir una gran variedad de antibióticos (Munimbazi y Bullerman, 1998; Kim y Chung, 2004; Souto *et al*; 2004; Stein, 2005).

Se observó que los extractos obtenidos de dos cepas bacterianas (150 y 160), mantenían su actividad antagónica aún después de ser sometidos a un proceso de esterilización por calor húmedo. Se ha descrito que algunas especies de *Bacillus* producen antibióticos con un amplio espectro de acción, los cuales son estables a temperaturas altas y mantienen su actividad en un amplio intervalo de pH, dichos compuestos son lipopéptidos cíclicos con carácter anfipático, los cuales se dividen en tres grupos; surfactinas, iturinas y fengicinas. La clasificación se basa en el tamaño de la cadena del ácido graso que poseen en su estructura y su producción se asocia al principio y durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano (Munimbazi y Bullerman, 1998; Nogórska *et al*; 2007). Probablemente las actividades detectadas en las cepas antes mencionadas corresponden a este tipo de compuestos, los cuales tienen potencial para ser utilizados en campo en el

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

manejo del carbón de la espiga debido su estabilidad en diferentes condiciones de temperatura.

Mediante técnicas moleculares e informáticas se encontró que las cepas bacterianas 150 y 160 pertenecen al género *Bacillus* con afinidad a dos cepas de *B. subtilis*. La actividad antagónica de estas cepas concuerda con lo reportado para otros aislados con actividad anti fúngica (Nogórska *et al*; 2007), sin embargo, no se había reportado la utilización de este microorganismo en control de *S. reilianum*, por lo cual el presente trabajo sienta un precedente importante.

El alineamiento pareado que se realizó entre la secuencia de la cepa 150 con la secuencia de la cepa 160 mostró que existe un 96% de similitud, lo cual podemos interpretar que son especies muy semejantes. Al realizar el alineamiento de la secuencia de la cepa 150 con la secuencia de la cepa *Bacillus subtilis* CICC10078 mostró una afinidad del 99%, lo cual demuestra que se su similitud es significativa. El resultado del alineamiento de la secuencia de la cepa 160 con la secuencia de la cepa *Bacillus subtilis* HDYM-23 16S mostró que existe una similitud de 97%. Se podría pensar que se trata de la misma especie y que por cuestiones del proceso de mutación ha cambiado su genotipo y por ello hay ciertas diferencias.

Tomando en cuenta de que el rDNA de las cepas 150 y 160 no se secuenció en su totalidad (un 60% aproximadamente, la cual corresponde a la primera parte de ambas cepas) lo cual las convierte en secuencias parciales, cabe la posibilidad de que al tenerlo completo, la afinidad cambie por completo en las dos cepas y su afinidad se incline a otra u otras especies de bacterias.

La ventaja en la utilización de las cepas de *B. subtilis* 150 y 160 reportadas en este trabajo, es que tienen la capacidad de formar endosporas, que son estructuras de resistencia que permanecen en el suelo durante periodos prolongados; pueden ser producidas a nivel industrial fácilmente y a bajo costo (Stein, 2005). Esto podría ser conveniente en la elaboración de formulados, los cuales, podrían contener los extractos para comenzar el manejo de la enfermedad

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

en el campo, además de estar suplementados con las esporas para ayudar a la permanencia del agente de control biológico en los suelos previniendo futuras infecciones en los cultivos.

Esta especie no patógena vive naturalmente en asociación con las raíces de plantas superiores y es capaz de mantener un contacto estable con las plantas y de cierta forma promover su crecimiento. A esto se le puede sumar la capacidad de colonización, producción de compuestos biológicamente activos y su habilidad para formar endosporas, es por esta razón que *B. subtilis* como otros miembros del género *Bacillus* son potencialmente usados como agentes de biocontrol. Hasta el momento no se han realizado estudios que demuestren que este microorganismo, afecte a la microbiota existente en las plantas hospederas y en los suelos agrícolas.

Como ya ha sido mencionado anteriormente *S. reilianum* se encuentra en el grupo de los Ustilaginales que esta constituido por diferentes hongos fitopatógenos que ocasionan enfermedades en monocotiledóneas de todo el mundo. A pesar de los tratamientos químicos aplicados a semillas y cultivos y a la existencia de variedades de resistentes, estos hongos, han sido considerados como la causa potencial del carbón de las plantas (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Agrios, 1999).

Dentro de este grupo de basidiomicetos el hongo *Ustilago maydis* o cuitlacoche (del náhuatl *cuitlatl*, excremento y *chochini*, dormir) tiene importancia a nivel mundial por ser el agente causal del carbón común del maíz una enfermedad que bajo ciertas condiciones ocasiona numerosas pérdidas económicas; sin embargo, en la parte central de México el carbón que invade al maíz dulce, es considerado un platillo exquisito desde el periodo pre-colombino y ha sido introducido recientemente a platillos de alta cocina con bastante aceptación. (Herrera y Ulloa, 1990; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998).

A diferencia de *S. reilianum* que infecta arriba de un 80 % de las plantas en campo (White 1999), *U. maydis* afecta del 1 al 5 % (Shurtleff 1980), por lo tanto la

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

primera es considerada una de las enfermedades con importancia económica para el cultivo el maíz. En el caso de *U. maydis* aunque es un fitopatógeno, su popularidad como hongo comestible ha ido en aumento al ser más rentable su producción que la del maíz (Pataky y Chandler 2003), en este contexto, se pueden identificar dos problemáticas diferentes, por un lado la capacidad destructiva de *S. reilianum*, es motivo de búsqueda de estrategias que permitan controlar la enfermedad para evitar pérdidas en la producción de maíz, y por el otro, la importancia de *U. maydis* como hongos comestible, ha sido permitido avanzar en el diseño de metodologías para la producción de este basidiomiceto de manera artificial. Dado lo anterior y por los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de las bacterias con actividad antifúngica aisladas debe de ser restringido en función de los intereses de los productores agrícolas, haciendo una planeación a mediano y largo plazo en la aplicación de los microorganismos, debido a que muy probablemente las bacterias tengan un efecto inhibitorio en el desarrollo de *U. maydis*, por lo tanto los suelos destinados a la producción de este hongo comestible no deben ser tratadas con los agentes de control biológico.

Es importante mencionar, que las bacterias fueron aisladas de una región del estado de Hidalgo, con problemas serios de carbón de la espiga, en donde la producción de maíz es la más importante con respecto a la de cuiltlacoche, en este caso a los productores les interesa que el inóculo de *S. reilianum* en suelo sea disminuido para evitar las pérdidas económicas en la producción de este cereal.

El control de *S. reilianum* en campo incluye la utilización de híbridos de maíz resistentes a la enfermedad, así como la rotación de cultivos; sin embargo, los híbridos presentan susceptibilidad a otras enfermedades, además de no ser preferidos por los agricultores. Por otro lado, aunque la rotación de cultivos podría dar buenos resultados, deberán de pasar varios años para disminuir el inóculo del hongo en el suelo a niveles aceptables. Hasta la fecha no se conocen fungicidas efectivos contra esta especie de hongos, en este caso el control biológico representa una excelente opción y las cepas de *B. subtilis* 150 y 160 aisladas en

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

este trabajo tienen potencial para su utilización como herramienta adicional en el manejo fitosanitario del carbón de la espiga del maíz.

A partir de este trabajo pueden realizarse diversos estudios que permitan la determinación del aislamiento y caracterización de los compuestos con actividad antifúngica producidos por las cepas bacterianas aisladas, así como su efectividad en campo para el diseño de metodologías de transferencia en el manejo integrado del carbón de la espiga.

VIII. Conclusiones.

- Se identificó la cepa de *S. reilianum* del Estado de Hidalgo, mediante PCR específica, con la finalidad de tener la seguridad de trabajar con la cepa correcta.
- Se aislaron un total de 300 cepas bacterianas a partir de muestras de suelos de cultivos de maíz de las cuales 27 cepas mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de *S. reilianum*.
- Se determinó la morfología microscópica y colonial de las 27 cepas que mostraron actividad antagónica, de las cuales 18 fueron Gram negativas y nueve Gram positivas.
- A partir de las bacterias aisladas se obtuvieron 10 extractos extracelulares con actividad inhibitoria del crecimiento del hongo en estudio mediante un proceso de esterilización por filtración, de los cuales siete fueron producidos por bacterias Gram negativas y tres por Gram positivas. De todos los extractos obtenidos dos resistieron un proceso de esterilización por calor húmedo lo que indica que el o los compuestos con actividad son termoestables, los cuales fueron producidos por bacterias Gram positivas. La mayoría de los extractos fueron obtenidos en la fase estacionaria de crecimiento lo que indica que son metabolitos secundarios.
- Las cepas 150 y 160 productoras de extractos termoestables con actividad fueron identificadas como *B. subtilis* mediante la amplificación, secuenciación y análisis de la secuencia obtenida del gen 16S rDNA.
- Las cepas bacterianas encontradas en este trabajo tienen potencial para ser utilizadas en el control del carbón de la espiga del maíz ocasionado por *S. reilianum*.

IX. Literatura citada.

1. Afsharmanesh, H., M. Ahmadzadeh y A. Sharifi-Tehrani. 2006. Biocontrol of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off by fluorescent pseudomonads. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 71 :1021-9.
2. Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Editorial Limusa, México. 3ª Edición, pp. 493-495.
3. Alexopoulos, C. J. y C.H. Mims. 1985. Introducción a la micología. Ediciones Omega, S. A. Plató, Barcelona. pp. 638.
4. Bischoff, J., M. Domrachev, S. Federhen, C. Hottton, d. Leipe, S. Sarma, V. Soussov, L. Sun y S. Turner. National Center for Biotechnology Information. Disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Consultado 27 de febrero de 2009.
5. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément y E.A. Barka. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteris for Biocontrol of Planta Disease: Principles, Mechanims of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4951-4959.
6. De León, C. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. 4ª. Edición. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 446-447
7. Duffy, B. 2003. Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 501-538.
8. Fredericksen, R. A. 1977. Head smut of corn and sorghum. *Proc. Corn Sorghum Res. Conf.* 32: 89-104
9. Fuentes, F. S. 1962. Estudios cobre algunos métodos de prevención contra *Sphacelotheca reiliana* (Kuhn) Clint del maíz en la zona de el Bajío, México. (Ustilaginales, Ustilaginaceae). Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. pp. 62.
10. Gillican C.A. 2008. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 27: 741-756.
11. Giménez, M.P., Laguna, I. G., Avila, A. O., de Remes, A. M., Virla, E., Borgogno, C., Nome, C. F. y S. Paradell. 2002. Difusion del Corn Stunt Spiroplasma del maíz (*Spiroplasma kunkelii*) y del vector (*Dalbulus maidis*) en la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía.* 0041-8676,
12. Granados, D.S; López, R G.F. 1996. Agroecología. UACH. México.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

13. Harman, G. 1996. *Trichoderma* for Biocontrol of plant Pathogens: From Basic Research to Comercialized Products. (On – line). Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html>. Consultado 17 de noviembre de 2008.
14. Herrera, T. y M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Autónoma de México, Edit. Fondo de la Cultura Económica. México D. F. pp. 294-301.
15. Hirschhorn, E. 1986. Las Ustilaginales de la flora Argentina. Publicación especial. Comisión de Investigaciones Científicas. La Plata Argentina. pp. 530
16. Kim, P.I. y K.C. Chung. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotricum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett.* 234 :177-183.
17. Kishore, G.K., S. Pande y A.R. Podile. 2005. Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Can J Microbiol.* 51 :123-32.
18. Mack, H. J., Baggett, J. R., y P. A.Koepsell. 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19(1):77-78.
19. Manwar, A.V., S.R. Khandelwal, B.L. Chaudhari, J.M. Meyer y S.B. Chincholkar. 2004. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* 118: 243-51.
20. Martínez, C., A. Jauneau, C. Roux, C. Savy y R. Dargent. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp.zeae. *Protoplasma.* 213: 83-92.
21. Matyac, C. A. y T. Kommedahl. 1985. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reilianum* on corn. *Phytopathology.* 75: 577-581.
22. Morales, A. 1997. Botrys en vides. Chile Hortofruticola. 45: 13-16.
23. Mugica, A.V. y L. J. Figueroa. 1996. Contaminación ambiental causas y control. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 345 pag.
24. Munimbazi, C. y L.B. Bullerman. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J Appl Microbiol.* 84 :959-68.
25. Munkvold, G.P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol.* 41: 99-116.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

26. Nagarajkumar, M., R. Bhaskaran y R. Velazhahan. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol Res.* 159: 73-81.
27. Nogórska, K., M. Bikowski y M. Obuchowski. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochim Pol.* 54: 495-508.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-035-1995. Diario Oficial de la Federación. Jueves 16 de enero de 1997.
29. Pablo, J. y M. Bobadilla. 2007. Carbón de la espiga de maíz, Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2006 Valle del Mezquital, Hgo. Tríptico informativo. SAGARPA e INIFAP.
30. Pataky, J.K. and M.A. Chandler. 2003. Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: Timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia* 95:1261–1270.
31. Pérez, J. 2002. Carbón de la espiga del maíz descripción, síntomas y prevención. Tríptico informativo. INIFAP.
32. Raaijmakers, J. M., M. Vlami y J.T. de Souza. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81: 537-547.
33. Ramírez, D. J. L., Sánchez, G. J. J. y B. M. Chuela. 2000. Selección recurrente en la población de maíz subtropical PABGT-CE. *Agrociencia* 34(1):33-39.
34. Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Pag. 347.
35. Ruíz-Herrera J. y A. D. Martínez-Espinoza. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *Internat. Microbiol.* 1: 149-158.
36. Sexton, C. A. y J. B. Howlett. 2006. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eucariot Cell.* 5: 1941-1946.
37. Sharifi-Tehrani, A., M. Shakiba, M. Okhovat y Z. Zakeri. 2005. Biological control of *Tiarosporrella phaseolina* the causal agent of charcoal rot of soybean. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 70 :189-92.
38. Shurtleff MC. 1980. Compendium of corn diseases. 2nd ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press. 105 p.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

39. Shurtleff, C. M. 1980. Compendium of corn disease. *American Phytopathological Society*. Pag. 105
40. Souto, G.I., O.S. Correa, M.S. Montecchia, N.L. Kerber, N.L. Pucheu, M. Bachur y A.F. García. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J Appl Microbiol.* 97 :1247-56.
41. Spardo, D. y M. L. Gullino. 2004. State of the art future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. *Int J Food Microbiol.* 91: 185-194.
42. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56 :845-57.
43. Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Widels, C.E., y J. L. Geadelman. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68:880-884.
44. Walker, R., C.M. Innes y E.J. Allan. 2001. The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. *Lett Appl Microbiol.* 32 :346-8.
45. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Biol.* of 52: 487-511.
46. White, D.G. (ed.). 1999. Compendium of corn diseases, 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN. p. 78.
47. Xu, M.L., A.E. Melchinger y T. Lübberstedt. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by Dot Blot Hybridization and PCR-Based assays. *Spotlight on diagnosis.* 83: 390-395.

X. Documentos en línea.

1. http://maizedoctor.cymmyt.org/imagenes/stories/wheat_doctor/extended_info/head_smut.jpg

XI. Anexo 1. Preparación de los medios de cultivo

Caldo Luria

Triptona 10g

Extracto de levadura 50g

Cloruro de Sodio 10g

Sulfato de Magnesio 0.125g

Agua destilada 1000ml.

B de King

Fosfato de Potasio dibásico 1.5g

Bactopeptona 20g

Agar bacteriológico 1.5g

Sulfato de Magnesio 1.5g

Glicerol 15ml

Agua destilada 1000ml.

TSA

Agar Soya Tripticaseina 40g

Agua destilada 1000ml.

PDA

Agar Dextrosa Papa 39g

Agua destilada 1000ml.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas antagonistas del crecimiento del hongo patógeno del maíz, *Sporisorium reilianum*.

PDB

250g de papa se pusieron a hervir con 800ml de agua durante 20 minutos, se filtraron para eliminar la papa, la infusión fue suplementada con 10g de Glucosa y aforada a 1000ml de agua destilada.

YPD

Extracto de levadura 1%

Peptona de gelatina 2%,

Dextrosa 2%.

Agua destilada 1000ml.

AGAR BLANDO YPD

Extracto de levadura 1%

Peptona de gelatina 2%

Dextrosa 2%

Agar 0.52gr.

Agua destilada 1000ml.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120Lb/pul² a 121° C por 15 minutos.

XII. Anexo 2.**Preparación de TAE 10X**

Trisma Base48.4 g

Ácido acético glacial10.9 ml

EDTA2.92 g

Agua desionizada1000 ml