



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA**

**“Aislamiento e identificación del agente causal de la enfermedad de la marchitez y languidez en cebolla (*Allium cepa* L.) y bacterias promotoras del crecimiento”**

Tesis que presenta  
**IBT Idalia Montesinos Solano**

Para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias  
en la Especialidad  
de Biotecnología de Plantas

Director de Tesis: Dr. Víctor Olalde Portugal

Asesores:

Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim

Septiembre, 2016.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, bajo la dirección del Doctor Víctor Olalde Portugal.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgarme la beca gracias a la cual fue posible realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mí y por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Jorge Ibarra Rendón por haber aceptado ser parte de mi comité evaluador y por todos los aportes realizados a este trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim por haber aceptado ser parte de mi comité evaluador y por todos los aportes realizados a este trabajo.

A mis compañeros del Cinvestav, en especial a los Tesoros: Alma, Ismael, Mariana, Rosy y Yoli, por todo el apoyo incondicional y solidaridad que siempre los ha caracterizado.

A mi madre, hermanas y familiares, por ser un fuerte pilar lleno de amor y comprensión.

A Arlet, por sus comentarios y recomendaciones en la redacción, por la ayuda en la identificación molecular y por todo el cariño brindado.

A Mariana Fernández, por todo el apoyo, confianza, sinceridad y amistad que me has brindado y a su familia por adoptarme.

Al laboratorio de Bioquímica Ecológica, en especial a Rosy, Isa, Horacio, Naieli y Migue, por compartir experiencias, por el trato amable y por la ayuda brindada en todo momento.

A Gabriel, Nadín y Rosy del laboratorio de Bioinsecticidas por el apoyo en la identificación molecular.

Al personal de Cinvestav-Irapuato por toda la atención y amabilidad brindada.

En general, a todas las personas implicadas directa o indirectamente en la realización del proyecto.

Muchas Gracias

## DEDICATORIA

A toda persona que busque siempre el conocimiento ...

A mi madre porque este logro mío es tuyo ...

A Arlet por vencer juntas los últimos obstáculos ...

## I. ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	ÍNDICE DE CONTENIDO.....	I
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	V
I.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
II.	ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	VIII
III.	ABSTRACT .....	IX
IV.	RESUMEN .....	X
1.	INTRODUCCIÓN.....	11
1.1.	Interacción planta-microorganismo.....	12
1.1.1.	Interacciones benéficas planta-microorganismo .....	12
1.1.1.1.	Mecanismos directos de promoción de crecimiento .....	12
1.1.1.2.	Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento .....	15
1.1.2.	Interacciones negativas planta-microorganismo .....	17
1.2.	Importancia del cultivo de cebolla ( <i>Allium cepa</i> L.) .....	17
1.3.	Control biológico en el cultivo de cebolla.....	18
2.	HIPÓTESIS .....	20
3.	OBJETIVOS.....	20
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	20
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1.	Descripción general del proyecto.....	21
4.2.	Aislamiento y selección de bacterias endófitas de cebolla. ....	21

4.2.1.	Toma de muestra.....	21
4.2.2.	Aislamiento de bacterias endófitas .....	21
4.2.3.	Morfología colonial.....	22
4.2.4.	Tinción Gram .....	22
4.2.5.	Antibiogramas .....	23
4.2.6.	Búsqueda de bacterias patógenas .....	23
4.2.7.	Caracterización de las bacterias aisladas .....	25
4.2.7.1.	Determinación de la enzima ACC desaminasa.....	25
4.2.7.2.	Detección de sideróforos utilizando medio agar CAS.....	25
4.2.7.3.	Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos .....	27
4.2.7.4.	Selección de bacterias posibles fijadoras de nitrógeno .....	27
4.3.	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las bacterias aisladas contra bacterias patógenas.....	28
4.3.1.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> mediante enfrentamiento directo .....	28
4.3.2.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> mediante la técnica de microgota en doble capa de agar.....	28
4.4.	Evaluación de la capacidad antagónica de bacterias seleccionadas contra las bacterias patógenas bajo condiciones de invernadero .....	29
4.4.1.	Pruebas de compatibilidad entre las bacterias con mayor respuesta antagónica .....	29
4.4.2.	Pruebas de antagonismo <i>in vivo</i> .....	30
4.5.	Identificación bacteriana utilizando técnicas moleculares .....	32
4.5.1.	Extracción de DNA genómico .....	33
4.5.2.	Determinación de la calidad de DNA genómico.....	34
4.5.3.	Iniciadores del gen 16S rDNA.....	34
4.5.4.	Amplificación del gen 16s rDNA.....	35

4.5.5.	Secuenciación de los fragmentos del gen 16s rDNA .....	35
5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Aislamiento de bacterias endófitas .....	36
5.2.	Identificación molecular de los aislados bacterianos utilizados en invernadero.....	37
5.3.	Pruebas de patogenicidad de bacterias aisladas de cebolla y cebollín	38
5.4.	Caracterización de las posibles bacterias antagonicas .....	40
5.4.1.	Determinación de la enzima ACC desaminasa .....	40
5.4.2.	Detección de sideróforos.....	41
5.4.3.	Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos .....	42
5.4.4.	Selección de bacterias posibles fijadoras de nitrógeno .....	44
5.5.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....	45
5.6.	Evaluación del efecto antagonico <i>in vivo</i> .....	46
5.6.1.	Análisis de la escala de severidad.....	47
5.6.2.	Análisis de peso húmedo y peso seco .....	49
5.6.2.1.	Peso húmedo de hoja.....	49
5.6.2.2.	Peso seco de hoja .....	52
5.6.2.3.	Peso húmedo de bulbo.....	53
5.6.2.4.	Peso seco de bulbo .....	55
5.6.2.5.	Peso húmedo de raíz .....	56
5.6.2.6.	Peso seco de raíz .....	58
6.	DISCUSIÓN .....	60
6.1.	Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas .....	60
6.2.	Pruebas de antagonismo .....	63
6.3.	Identificación de los microorganismos patógenos.....	66

7.	CONCLUSIONES .....	68
8.	PERSPECTIVAS .....	69
9.	REFERENCIAS CITADAS .....	70
	APÉNDICE I .....	74

## II. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Escala de severidad del daño de la enfermedad.....	31
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores utilizados para la identificación bacteriana .....	34
<b>Tabla 3.</b> Número de bacterias endófitas aisladas a partir de diferentes partes de cebollas y cebollines. ....	37
<b>Tabla 4.</b> Identificación molecular de las cepas utilizadas para las pruebas <i>in vivo</i> . ....	38
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de respuesta en las pruebas de patogenicidad de bacterias seleccionadas para las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....	38
<b>Tabla 6.</b> Morfología colonial y descripción de la tinción de Gram de las cepas antagónicas y cepas patógenas utilizadas en invernadero. ....	39
<b>Tabla 7.</b> Escala cualitativa de la producción de la enzima ACC desaminasa de las cepas aisladas de los diferentes órganos de cebolla y cebollín.....	39
<b>Tabla 8.</b> Escala cualitativa de la producción de sideróforos de las cepas aisladas.....	41
<b>Tabla 9.</b> Resultados cualitativos de los ensayos utilizando medio de fosfatos NBRIP. ....	42
<b>Tabla 10.</b> Respuesta de las cepas sembradas en el medio semisólido.....	44
<b>Tabla 11.</b> Análisis cualitativo de las pruebas para determinar actividad de promoción de crecimiento.....	45
<b>Tabla 12.</b> Análisis cualitativo de resultados obtenidos de las 4 cepas que presentaron mayor respuesta antagónica en los ensayos <i>in vitro</i> . ....	46
Tabla I. Descripción de la morfología colonial de aislados.....	74
Tabla II.Descripción de la morfología colonial de los aislados.....	79
Tabla III. Resultado de los antibiogramas realizados a las cepas que presentaron similitud .....	82

Tabla IV. Pruebas de patogenicidad. ....	83
Tabla V. Resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> .....	85
Tabla VI. Bacterias aisladas de bulbo.. ....	87
Tabla VII. Bacterias aisladas de hoja.. ....	88
Tabla VIII. Bacterias aisladas de raíz. ....	89
Tabla IX. Bacterias aisladas de hoja de cebollín. ....	90
Tabla X. Bacterias aisladas de raíz de cebollín. ....	91
Tabla XI. Resultados obtenidos de la clasificación de los tratamientos en la escala de severidad. ....	93
Tabla XII. Anova peso húmedo de hoja tratamientos con <i>Erwinia</i> sp.....	93
Tabla XIII. Prueba de Tukey peso húmedo de hoja .....	93
Tabla XIV. Anova peso seco de hoja tratamientos con <i>Erwinia</i> sp.....	94
Tabla XV. Prueba de Tukey comparaciones múltiples peso seco de hoja .....	94
Tabla XVI. Anova peso húmedo de bulbo tratamientos con <i>Erwinia</i> sp. ....	95
Tabla XVII. Prueba de Tukey peso húmedo de bulbo .....	95
Tabla XVIII. Anova peso seco de bulbo tratamientos con <i>Erwinia</i> sp.....	96
Tabla XIX. Anova peso húmedo de raíz tratamientos con <i>Erwinia</i> sp. ....	96
Tabla XX. Anova peso seco de raíz tratamientos con <i>Erwinia</i> sp.....	96
Tabla XXI. Anova peso húmedo de hoja tratamientos con <i>Bacillus</i> sp.....	96
Tabla XXII. Anova peso seco de hoja tratamientos con <i>Bacillus</i> sp. ....	96
Tabla XXIII. Anova peso húmedo de bulbo tratamientos con <i>Bacillus</i> sp. ....	96
Tabla XXIV. Anova peso seco de bulbo tratamientos con <i>Bacillus</i> sp.....	97
Tabla XXV. Anova peso húmedo de raíz tratamientos con <i>Bacillus</i> sp. ....	97
Tabla XXVI. Anova peso seco de raíz tratamientos con <i>Bacillus</i> sp.....	97

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La planta interacciona con distintos microorganismos.....	11
Figura 2. Síntesis y precursor del ACC, precursor del etileno .....	14
Figura 3. Pruebas para la identificación de bacterias patógenas .....	25
Figura 4. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> por enfrentamiento directo .....	29
Figura 5. Planta de cebolla recolectada para el aislamiento bacteriano.....	36
Figura 6. Determinación de la producción de la enzima ACC desaminasa.....	40
Figura 7. Cambio de color en el medio Agar-CAS.....	42
Figura 8. Placa de cultivo con medio de fosfatos NBRIP .....	43
Figura 9. Pruebas antagónicas <i>in vitro</i> .....	46
Figura 10. Evaluación .....	50
Figura 11. Evaluación de los controles positivos de <i>Erwinia</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp. 27 días después de la inoculación .....	52
Figura 12. Evaluación del peso húmedo de bulbo para tratamientos con <i>Erwinia</i> sp. 27 días después de la aplicación .....	55
Figura 13. Raíz de cebolla 27 días después de la aplicación de los tratamientos para el <i>Erwinia</i> sp. ....	58

## II. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparación de la escala de severidad obtenida para plantas infectadas con <i>Erwinia</i> sp. ....	48
Gráfica 2. Comparación de la escala de severidad obtenida para plantas infectadas con <i>Bacillus</i> sp. ....	49
Gráfica 3. Peso húmedo de hoja para tratamientos con <i>Erwinia</i> sp. ....	51
Gráfica 4. Peso húmedo de hoja para tratamientos con <i>Bacillus</i> sp. ....	51
Gráfica 5. Comparación del peso seco de hoja entre el control positivo de <i>Erwinia</i> sp. y los tratamientos con los antagonísticos . ....	53
Gráfica 6. Comparación de medias del peso húmedo de bulbo entre el control positivo de <i>Erwinia</i> sp. y los tratamientos con antagonísticos.. ....	54
Gráfica 7. Comparación de medias del peso seco de bulbo entre el control positivo de <i>Erwinia</i> sp. y los tratamientos con antagonísticos.. ....	56
Gráfica 8. Comparación de medias del peso húmedo de raíz entre los tratamientos con <i>Erwinia</i> sp.....	57
Gráfica 9. Comparación de medias del peso seco de raíz entre los tratamientos con <i>Erwinia</i> sp. ....	59

### III. ABSTRACT

Plants cohabite with diverse microorganisms, mostly bacteria, which can live inside (endophyte) or outside (epiphyte) the plant. This plant-microorganism interaction can be harmful for the host (pathogens); or advantageous (growth promotion or phytopathogen inhibition). These relations have been useful in farming; several reports demonstrate the efficiency of bacteria as biological control agents (BCA) towards infectious disease in plants

The causal agent of leaf wilting in onion, disease present in the state of Guanajuato, is unknown. In order to identify the bacterial pathogen and the potential of some BCA 10 onions and 10 scallions samples presenting the disease were analysed. In total, 126 cultivable endophytic bacteria from root, leaves and bulb were isolated. According with their colonial morphology, 61 were selected from which 17 were potentially pathogen.

The causal agent of leaf wilting in onion was identified as a bacterial specie from the genus *Erwinia*. Subsequently, the 44 remaining strains were characterized and tested *in vitro*, screening for potentially plant growth promoting bacteria and/or antagonist against 8 potentially pathogenic strains and the causal agent. From these essays, 4 strain were selected to the be tested in greenhouse: *Enterobacter* sp., *Pantoea eucalypti* and two *Serratia plymuthica*, one isolated form bulb and the other from leaves. The bacterium *S. plymuthica* isolated from bulb besides promoting the growth in onion roots and leavs also was an antagonist to *Erwinia* sp. This is the first report of *S. plymuthica* as an antagonist to a phytopathogenic bacterium from the genus *Erwinia*.

#### IV. RESUMEN

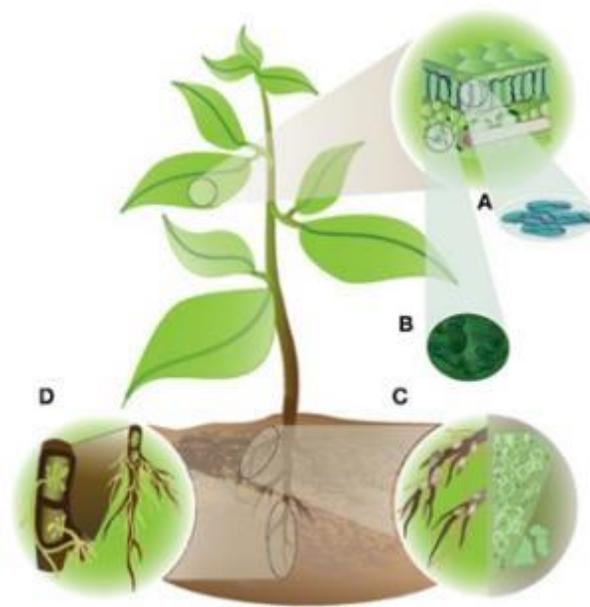
Las plantas cohabitan con diversos microorganismos, principalmente bacterias, las cuales pueden vivir dentro (endófitos) o fuera (epífitos) de la planta. Estas interacciones planta-microorganismo pueden ser perjudiciales para el hospedero, como los patógenos; o aportarle beneficios, promoviendo el crecimiento o inhibiendo la presencia de fitopatógenos. Estas relaciones han sido explotadas en el sector agrícola, y diversos estudios muestran la efectividad del uso de bacterias como agentes de control biológico (BCA) contra enfermedades infecciosas en plantas.

La marchitez y languidez de hoja es una enfermedad en cebolla presente en el Estado de Guanajuato de la cual se desconoce su agente etiológico. Con el fin de identificar la bacteria patógena y el potencial de algún BCA con uso potencial agrícola, se analizaron 10 muestras de cebolla y 10 de cebollín que presentaban la enfermedad, se aislaron 126 bacterias endófitas cultivables de raíz, hoja y bulbo en total. Partiendo de estas bacterias, posteriormente de acuerdo a su morfología colonial fueron seleccionadas 61, de las cuales 17 son potencialmente patógenas. En este proyecto se logró identificar al agente causal de la enfermedad de la marchitez y languidez como una especie perteneciente al género *Erwinia*. Posterior a la identificación de la bacteria patógena, las 44 cepas restantes fueron caracterizadas mediante pruebas *in vitro* para selecciones potenciales bacterias promotoras de crecimiento y/o antagonistas contra 8 cepas potencialmente patógenas y el agente causal. De estos ensayos se seleccionaron 4 cepas para las pruebas en invernadero: *Enterobacter* sp., *Pantoea eucalypti* y dos de la especie *Serratia plymuthica*, una aislada del bulbo y otra de la raíz. La bacteria *S. plymuthica* aislada de bulbo, además de presentar actividad antagonista contra *Erwinia* sp. en los ensayos en invernadero, promovió el crecimiento en cebolla reflejado en el aumento de peso de hoja y raíz. El presente trabajo es el primero en reportar actividad antagonista de *S. plymuthica* a una bacteria fitopatógena perteneciente al género *Erwinia*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos que se encuentran interactuando con diversos microorganismos, principalmente bacterias y hongos. En el caso de las bacterias, se calcula que en cada centímetro cuadrado de la superficie de las hojas existen en promedio  $10^6$ - $10^7$  (Vorholt, 2012), a diferencia de los hongos que se encuentran en menor proporción.

Los microorganismos habitan la planta tanto en sus órganos aéreos (filósfera) como en los terrestres (rizósfera). En la filósfera, formada en su mayoría por las hojas, habitan bacterias epífitas y endófitas, las primeras viven en la superficie vegetal y las últimas principalmente en los espacios intercelulares y dentro de tejidos vasculares. A su vez, la rizósfera está conformada por las raíces y el suelo unido a éstas, extendiéndose milímetros hacia el exterior (Vorholt, 2012). A pesar de que en la filósfera ocurren interacciones entre planta-bacteria, la rizósfera ha sido mejor estudiada y caracterizada.



**Figura 1. La planta interactúa con distintos microorganismos.** Los microorganismos endófitos están presentes en los diferentes órganos de la planta. En la filósfera ocurren interacciones que involucran microorganismos como: hongos (A) y bacterias asociadas a hoja (B); en la rizósfera bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* (C) y micorrizas arbusculares (D) (modificada de Partida *et al.*, 2011. The plant as the extended phenotype of endophytes [Figura 1]).

## **1.1. Interacción planta-microorganismo**

Las interacciones entre la planta y bacterias pueden traer desde beneficios al desarrollo de la planta hasta causar daños severos e incluso la muerte. Dentro de las bacterias benéficas encontramos aquellas que son capaces de promover crecimiento en plantas (PGPB) utilizando mecanismos directos como la disponibilidad de nutrientes o la regulación de los niveles de fitohormonas, e indirectos (PGPB-biocontrol) al actuar como inhibidores de fitopatógenos (Bashan, 1997).

### **1.1.1. Interacciones benéficas planta-microorganismo**

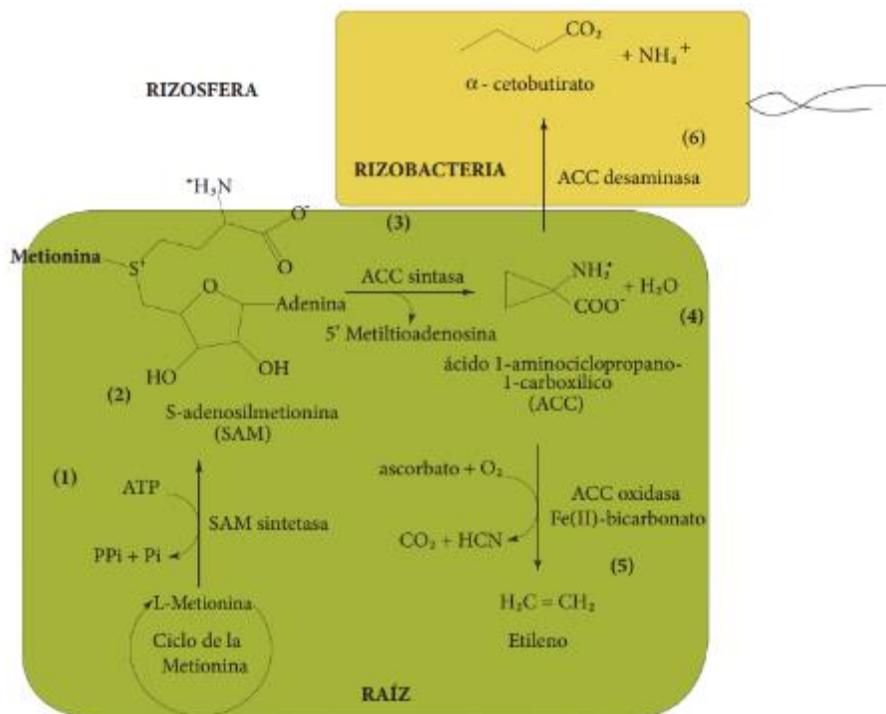
#### **1.1.1.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento**

**Solubilización de fosfato.** La asimilación de fósforo es un factor importante que limita el crecimiento en las plantas. Este elemento se presenta en su mayoría en formas insolubles, y para ser utilizado por las plantas muchas veces es necesaria la presencia de bacterias con la capacidad de solubilizar dichos fosfatos facilitándole su adquisición (Glick, 2012). Generalmente, estos microorganismos acidifican el medio al producir ácidos orgánicos con bajo peso molecular como el ácido glucónico, ácido 2-cetoglucónico, ácido láctico, isovalérico, oxálico, malónico, acético, isobutírico, succínico y glicólico (Rodríguez *et al.*, 1999). Los mecanismos para la solubilización de fosfatos se pueden enumerar en tres: la acidificación del medio que facilita la liberación de fósforo al obtener en el medio iones de  $H^+$ , estos ácidos orgánicos sirven como un amortiguador de pH y permiten que la presencia de protones para ser utilizados en la disociación de las reacciones; las reacciones de quelación que se producen por la unión de un anión o molécula polar y un catión mediante dos o más enlaces coordinados y obteniendo así un anillo de estructura compleja, los aniones de los ácidos orgánicos con los grupos carboxilos e hidroxilos son capaces de formar complejos estables con cationes como  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Al^{3+}$ , estos últimos se encuentran en la naturaleza unidos a fosfatos en formas insolubles; y por último, mediante reacciones de intercambio de ligandos el fósforo puede ser movilizado con ayuda de los aniones de ácidos orgánicos, los cuales adsorben el fosfato de asociaciones con óxidos e hidróxidos de aluminio, hierro y

calcio formando complejos con estos metales (Arcand y Schneider, 2006). Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* se han descrito entre las mejores solubilizadoras de fosfato (Rodríguez *et al.*, 1999).

**Adquisición de hierro.** Algunas bacterias son capaces de sintetizar moléculas de bajo peso que presentan una alta afinidad por el ión férrico. Estas tienen además facilidad para unirse a receptores de membranas bacterianas logrando así la adquisición de este elemento (Glick, 2012). Existen evidencias que indican que las plantas son capaces de beneficiarse utilizando el hierro de estos complejos. Vansuyt y colaboradores (2006) reportaron la capacidad de *Arabidopsis thaliana* de tomar el complejo Fe-sideróforo sintetizado por *Pseudomonas fluorescens* C7, incrementando así la presencia de hierro dentro de sus tejidos. El hierro es un elemento que se encuentra generalmente en forma de  $Fe^{3+}$  poco disponible en el medio ambiente, y al ser un elemento necesario para múltiples organismos, la competencia por el mineral se puede clasificar también como un mecanismo indirecto de promoción de crecimiento (Glick, 2012).

**Modulación de los niveles de etileno.** El etileno es una fitohormona que entre muchas otras funciones participa en la iniciación e inhibición de la elongación de raíz (Glick, 2012). Se sintetiza a partir del aminoácido L-metionina, presente en los exudados de la raíz, que es activada por el ATP y catalizada por la enzima S-adenosil-L-metionina sintetasa para obtener S-adenosil-L-metionina (SAM). SAM es convertido en 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) por la enzima ACC-sintasa. El ACC en presencia de oxígeno puede ser convertido en etileno por la enzima ACC-oxidasa, sin embargo, puede ser también metabolizada por la enzima bacteriana ACC desaminasa y convertida en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato. Esta acción reduce los niveles de etileno endógeno de la raíz, evitando la inhibición de elongación de raíz, como se muestra en la Figura 2 *Pseudomonas choroaphis* y *P. putida* son ejemplos de PGPB con esta característica (Van de Poel *et al.*, 2014).



**Figura 2. Síntesis y degradación de ACC, precursor del etileno.** La metionina es activada por el ATP para formar S-adenosilmetionina (SAM) (2) a través de la reacción catalizada por la enzima SAM sintetasa (1), la cual es inducida durante la senescencia o por condiciones de estrés ambiental. SAM es convertida a ACC (4) mediante la enzima ACC sintasa (3) que utiliza piridoxal-5-fosfato como cofactor. A partir del ACC el etileno es sintetizado por la enzima dependiente de hierro, ACC oxidasa (5), paso en el que además del etileno también se producen CO<sub>2</sub> y HCN. Esta reacción es dependiente del oxígeno y su síntesis se incrementa con el aumento de CO<sub>2</sub>. El hierro (II) actúa como cofactor y el ascorbato como cosustrato. La función de la enzima ACC desaminasa es convertir el ACC presente en los exudados de raíz en α-cetobutirato (α-CB) y amonio (6), metabolitos comunes en plantas y otros organismos (tomado de Esquivel, 2013. Reacción de la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en el contexto de las reacciones de síntesis y degradación del ACC, precursor del etileno [Figura 1]).

**Fijación biológica de nitrógeno (BNF).** Algunas PGPB tienen una capacidad alta de fijación de nitrógeno utilizando para ello asociaciones simbióticas con plantas. Las bacterias obtienen energía en forma de hidratos de carbono proporcionado por su hospedera mientras la planta se beneficia del nitrógeno. Mediante la formación de nódulos en raíz, bacterias como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* crean condiciones estrictamente controladas de presencia de oxígeno (Glick, 2012). Otras especies como *Azorhizobium caulinodans* descrita por

Cocking (2003) forman nódulos tanto en raíz como en tallo de algunos cereales, colonizando espacios intercelulares entre células epidérmicas y xilema, formando la asociación simbiótica.

#### **1.1.1.2. Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento**

Las PGPB que son capaces de realizar actividades de biocontrol hacia fitopatógenos son conocidos como microorganismos antagonistas. Éstos pueden ya sea generar una competencia por la colonización de la superficie de plantas y/o incluir una serie de mecanismos como la producción de aleloquímicos, principalmente antibióticos, enzimas líticas y sideróforos (Lim *et al.*, 1990).

**Antibiosis.** La síntesis de diferentes antibióticos capaces de evitar la proliferación de organismos patógenos es un mecanismo utilizado por bacterias promotoras de crecimiento en plantas (Glick, 2012). Amphisin, 2,4-diacetilfloroglucinol, oligomicina A, fenazina, pyoluteorin, pirrolnitrina, tensina, tropolona, y lipopéptidos cíclicos producidos por el género *Pseudomonas* son ejemplos de estos compuestos (Compant *et al.*, 2005).

**Producción de enzimas líticas.** Existe un gran número de bacterias capaces de secretar enzimas que rompen la pared celular de una gran cantidad de hongos patógenos. Algunos ejemplos son las quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3 glucanasas, proteasas y lipasas (Compant *et al.*, 2005). Se ha comprobado que *Pseudomonas stutzeri* produce quitinasas y laminarinasas extracelulares capaces de destruir el micelio de *Fusarium solani* (Lim *et al.*, 1991).

**Competencia por hierro.** Como se mencionó anteriormente, las PGPB son capaces de producir sideróforos que se unen al  $Fe^{3+}$  y facilitan su adquisición a la planta. Los sideróforos son moléculas de bajo peso (de 400 a 1500 Da) y presentan, a diferencia de los producidos por hongos, una alta afinidad por  $Fe^{3+}$  (con una  $K_a$  de  $10^{23}$  a  $10^{52}$ ) y por los receptores de membranas (Glick, 2012). Estas PGPB evitan la proliferación de hongos fitopatógenos al agotar la presencia de hierro, en

contraste, las plantas no son afectadas ya que son capaces de transportar y utilizar el complejo Fe-sideróforo de bacterias (Lodewyckx *et al.*, 2002).

**Colonización de superficies.** Algunas evidencias indican que la proliferación de bacterias no patógenas en la superficie de plantas puede disminuir la incidencia de enfermedades. Durante la colonización, estas bacterias no patógenas utilizan los nutrientes disponibles del medio, dificultando el crecimiento de fitopatógenos. Lodewyckx y colaboradores (2002) demostraron que existe una reducción en la enfermedad causada por el fitopatógeno *P. syringae* al realizar tratamientos en *A. thaliana* utilizando *Sphingomonas* sp. aislado de hojas como tratamiento preventivo.

**Detoxificación y degradación de factores de virulencia.** La capacidad de infección de bacterias patógenas está regulada por un mecanismo de comunicación bacteria-bacteria conocido como *quorum sensing*. El *quorum sensing* le permite a la bacteria cambiar entre dos programas de expresión de genes: una que se ve favorecida a una baja densidad de células, y otra que es beneficiada a una densidad alta de células en un grupo de bacterias. Este mecanismo involucra la producción, liberación y detección de señales químicas llamadas autoinductores (Dong *et al.*, 2003). Algunas PGPB son capaces de interrumpir las señales de *quorum sensing* de patógenos, degradándolas y bloqueando al mismo tiempo la expresión de genes de virulencia (Compant *et al.*, 2005). N-Acyl homoserina lactona (AHLs) es un regulador de funciones biológicas como producción de antibióticos, formación de biopelícula y factor de expresión de virulencia. Algunas especies de *Bacillus* son capaces de producir enzimas que degradan este regulador, como AHL-lactonasa, que evita la formación del factor de virulencia y disminuye la infección de patógenos dentro de la planta (Dong *et al.*, 2003; Enya *et al.*, 2007).

**Resistencia sistémica inducida (IRS).** Un mecanismo de defensa en plantas es la resistencia sistémica inducida, caracterizado por ser rápida, eficiente y no presentar síntomas visibles. Las PGPB son capaces de iniciar la IRS mediante la estimulación de formación de hormonas vegetales como etileno y jasmonato, y moléculas

bacterianas como proteínas flagelares, pioverdina, quitina,  $\beta$ -glucanos, lipopéptidos cíclicos surfactantes y ácido salicílico (Glick, 2012; Compant *et al.*, 2005; Van Loon *et al.*, 1998).

### **1.1.2. Interacciones negativas planta-microorganismo**

Por otro lado, las plantas sufren de estrés provocado por agentes bióticos como bacterias y hongos. Al igual que las PGPB, las bacterias fitopatógenas son capaces de colonizar plantas y liberar toxinas, alimentándose de éstas y provocando la muerte (necrotróficas) o completando su ciclo de vida manteniendo a su hospedero vivo por determinado tiempo (biotróficas). La infección se puede generar en aberturas naturales como lenticelas, estomas e hidátodos y por heridas en diferentes órganos. Las respuestas de defensa en planta se presentan, por lo general por organismos biotróficos, y su inducción ocurre mediante la activación de genes de resistencia (R) (Dangl *et al.*, 2001)

### **1.2. Importancia del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.)**

El género *Allium* está ampliamente distribuido entre el Ecuador y el Trópico de Cáncer, y la región con mayor variabilidad se extiende desde la cuenca del Mediterráneo a Paquistán y Asia central (Fritsch *et al.*, 2002). Las especies más importantes incluye cebollín (*A. schoenoprasum*), ajo (*A. sativum*) y cebolla (*A. cepa* L.), siendo esta última la segunda hortaliza más importante. La producción mundial de cebolla es de 1,100 millones de toneladas sembradas en una superficie de 4.2 millones de hectáreas.

México es el décimo segundo productor del mundo (FAO, 2013), ocupando el 1% de la superficie sembrada y volumen global. En el territorio nacional, representa la tercera hortaliza más importante sembrada: al año la superficie de siembra alcanza las 44 mil hectáreas y con una cosecha de 1.3 millones de toneladas. El 90% de la producción nacional es ocupada por la cebolla blanca, 7% a la cebolla morada, 2% a la cebolla amarilla y el 1% son cebollines. Al año, 380 mil toneladas de cebolla

son exportadas del país y se calcula que cerca de 60 mil toneladas (6%) son importadas para consumo (SAGARPA, 2013).

Debido a la alta demanda de la producción de cebolla, el control de plagas y fitopatógenos representa un gran desafío para los productores. Las principales bacterias patógenas al género *Allium* registradas en el país son *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* y *Xanthomonas axonopodis* pv. *alli* (INIFAP, 2010). El control químico de plagas ha ocasionado daños importantes a la salud del hombre, al medio ambiente, organismos benéficos para la agricultura y ha provocado que muchos organismos generen resistencia. En años recientes, el uso de ciertos plaguicidas químicos ha sido prohibido y a otros más se les ha restringido su uso, y se prevé que esta tendencia irá en aumento. En el país, el Manejo Integrado de Plagas (MIP) se ha implementado como una estrategia de control basada en la interacción de las poblaciones de las especies en el ecosistema, y cuya principal característica es el uso de competidores naturales contra organismos fitopatógenos (SAGARPA, 2014).

### **1.3. Control biológico en el cultivo de cebolla**

Diversos estudios muestran la efectividad del uso de bacterias capaces de controlar enfermedades causadas por microorganismos. Reiter y colaboradores (2002) examinaron el impacto en la población de bacterias endófitas de papa al infectarse con *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Observaron que el 38% de bacterias endófitas presentaron actividad antagónica contra *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Enya y colaboradores (2007) aislaron bacterias cultivables asociadas a hoja de tomate y evaluaron su potencial como agentes de control biológico (BCA) contra hongos fitopatógenos. Las bacterias pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Pantoea* presentaron mayor actividad antifúngica.

Karthikeyan y colaboradores (2008) aislaron microorganismos asociados a la hoja de cebolla, para posteriormente utilizarlos como BCA contra la enfermedad del tizón causada por *Alternaria palandui*. Lograron aislar *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viride* como antagonistas que posteriormente

utilizaron como consorcio, observaron una reducción de la enfermedad del 42.44% y un incremento en altura de plantas y rendimiento del bulbo.

Otros trabajos realizados en cebolla se han enfocado al control de enfermedades que afectan durante su almacenamiento, como el desarrollado por Abdallah y colaboradores (2013), quienes aislaron actinomicetos de suelo que posteriormente utilizaron para el control de bacterias causantes de la pudrición *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Burkholderia cepacia*. La bacteria *Streptomyces coelicolor* usada como antagonista redujo la incidencia de la enfermedad durante el almacenamiento, además de un incremento en pigmentos fotosintéticos, tamaño y número de hojas.

Las bacterias aisladas de plantas son ampliamente utilizadas para control biológico de microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, la mayoría es enfocada a la supresión de infecciones causadas por hongos, por lo cual la búsqueda de antagonistas a bacterias fitopatógenas es un área en desarrollo.

Actualmente, en los municipios de Tarimoro y Salvatierra del estado de Guanajuato los productores de cebolla se enfrentan a una enfermedad bacteriana caracterizada por la languidez y marchitez foliar, similar a la enfermedad del tizón bacteriana causada por *Xanthomonas* sp. y *Pantoea ananas* (Gitaitis, 1997; Roumagnac, 2000), que permite a la planta llegar a la madurez y disminuye el rendimiento de bulbo. Además, el control con pesticidas no tuvo efecto sobre el patógeno. Teniendo como precedente la información anterior, la meta de este trabajo está enfocada en aislar la población bacteriana endófito cultivable presente en cebolla y así encontrar el agente causal de la marchitez foliar y, a su vez, identificar y evaluar potenciales agentes de control biológico.

## **2. HIPÓTESIS**

En la comunidad bacteriana de la cebolla coexisten bacterias patógenas y sus bacterias antagónicas las cuales potencialmente se pueden utilizar en el control biológico.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la comunidad endofítica bacteriana cultivable de un campo de cebolla (*Allium cepa* L.).

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Identificar el agente causal de la marchitez y languidez en plantas de cebolla.
2. Seleccionar y caracterizar bacterias antagónicas nativas presentes en los diferentes órganos de cebolla.
3. Evaluar en invernadero el efecto antagónico de las diferentes cepas sobre la(s) bacteria(s) fitopatógena(s).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Descripción general del proyecto.**

Para la elaboración del proyecto, éste se dividió en tres etapas. La primera etapa consistió en el aislamiento y caracterización de bacterias endofíticas de las muestras colectadas. Durante la segunda etapa se realizó la búsqueda de bacterias patógenas y posibles antagonistas. La última etapa fue la identificación de las bacterias utilizadas como antagonistas y patógenas.

## **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA**

### **4.2. Aislamiento y selección de bacterias endófitas de cebolla.**

#### **4.2.1. Toma de muestra**

Utilizando un muestreo por cuadrantes se colectaron al azar diez cebollas y diez cebollines de dos terrenos de siembra que mostraron enfermedad. El sitio de muestreo se localiza en la comunidad de Charco Largo, Tarimoro, Gto., con coordenadas de 20°15'44.4"N, 100°49'08.3"W.

El muestreo se realizó extrayendo la planta completa, se guardaron en bolsas de polietileno y se almacenaron en el cuarto frío 4°C hasta su procesamiento.

#### **4.2.2. Aislamiento de bacterias endófitas**

Para la obtención de las bacterias endófitas de las muestras, se tomaron tejidos de hoja, bulbo y raíz. Se desinfectaron utilizando etanol al 70% (10 minutos), hipoclorito de sodio al 1% (5 minutos) y, por último, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Una vez seca la muestra, se seleccionaron cinco explantes de 1 cm aproximadamente y se posicionaron en 4 cajas petri por cada tejido de la muestra, que contenían dos medios de cultivo: medio Agar B de King composición por litro: 20 g de proteosa de peptona, 1.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15 mL de glicerol, 15 g de agar bacteriológico, y medio agar YDC (Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar), composición por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de glucosa y 17 g de agar bacteriológico. Se colocaron en una incubadora a 28°C de 24 a 48 horas. Las bacterias que crecieron

alrededor de cada explante se sembraron en placas con los medios antes mencionados y se procedió a realizar aislamientos sucesivos hasta obtener las colonias puras.

Con la finalidad de verificar la pureza de los aislados y de seleccionar cepas diferentes, se realizaron descripciones de la morfología colonial, tinciones de Gram y antibiogramas a todas las cepas obtenidas.

#### **4.2.3. Morfología colonial**

Las cepas fueron resembradas en los medios de cultivo utilizados durante el aislamiento por estría cruzada para obtener colonias aisladas, y se describieron diez características de las colonias:

- a) Diámetro. Chica (0.1-0.3 cm), mediana (0.3-0.5 cm), grande (0.5 cm en adelante).
- b) Forma. Circular, irregular, filamentosa.
- c) Borde. Entero, aserrado, ondulado, filamentoso.
- d) Elevación. Convexa, plana, umbonada.
- e) Luz transmitida. Opaca, transparente.
- f) Luz reflejada. Brillosa, mate.
- g) Superficie. Lisa o rugosa.
- h) Aspecto. Seco, húmedo.
- i) Color. Amarillo, blanco, transparente.
- j) Consistencia. Blanda, dura, mucosa.

#### **4.2.4. Tinción Gram**

Las bacterias previamente aisladas fueron sometidas a tinciones Gram conforme al siguiente protocolo:

1. Se realizaron preparaciones en portaobjetos de todas las cepas aisladas.
2. Una vez seca cada preparación, se añadió una gota de cristal violeta durante un minuto y después se lavó con agua. Todas las bacterias fueron teñidas en este paso.
3. Posteriormente se añadió lugol durante un minuto y al término se lavó con agua.

4. Se añadió una mezcla de etanol:cetona 1:1 durante treinta segundos, decolorando las bacterias Gram negativas, y se lavó con agua.
5. Por último, se agregó un colorante secundario, en este caso safranina que tiñó las bacterias Gram negativas previamente desteñidas, durante 30 segundos, y se lavó con agua.

Una vez secas las muestras, los portaobjetos fueron observados al microscopio con el objetivo 100X. Las bacterias Gram positivas se observaron de color morado, y las bacterias teñidas color rojas fueron identificadas como Gram negativas.

#### **4.2.5. Antibiogramas**

Con la finalidad de diferenciar y seleccionar las bacterias que presentaron la misma morfología colonial y tinción de Gram, se realizaron antibiogramas utilizando multidiscos combinados BIO-RAD, Cat. 71080380 impregnados con los siguientes antibióticos: Amikacina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalotina (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Dicloxacilina (1 µg), Enoxacina (10 µg) Eritromicina (15 µg) Gentamicina (10 µg), Netilmicina (30 µg), Penicilina (10 U) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (25µg). Se realizaron suspensiones de  $1 \times 10^7$  UFC/mL en tubos con agua estéril. Posteriormente, de cada suspensión se tomó una alícuota de 0.1 mL y se extendió con ayuda de una varilla de vidrio sobre la superficie de una placa que contenía medio BK y agar nutritivo sólido. Sobre el césped de bacterias se colocó el multidisco previamente mencionado. Las cajas se refrigeraron por 1 hr y después se incubaron a 28°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó una lectura del diámetro de los halos de resistencia generados.

#### **4.2.6. Búsqueda de bacterias patógenas**

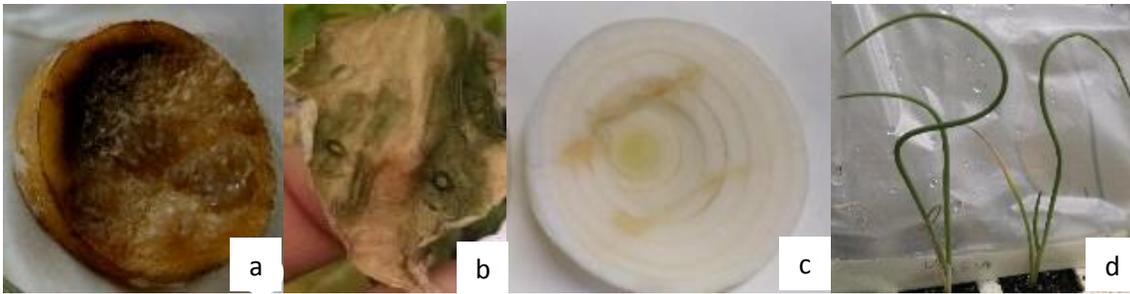
Para la selección de la(s) posible(s) bacteria(s) patógena(s) se realizaron cuatro pruebas diferentes utilizando técnicas convencionales y en cebolla.

- a) **Pudrición en rodaja de papa.** Previo a la obtención de las rodajas, se desinfectó la superficie realizando lavados con etanol 70% (10 minutos), hipoclorito de sodio 1% (5 minutos) y agua destilada estéril (tres lavados). Posteriormente, se colocaron dos rodajas de papa en una cámara húmeda, se utilizaron cajas petri con papel filtro húmedo estériles. En cada rodaja se

hicieron dos incisiones con un bisturí a lo largo, y con un asa bacteriológica se colocó la bacteria a evaluar, todo en condiciones estériles. Para cada cepa se realizó por duplicado y se colocó un control negativo. Se incubaron a 28° C durante 24 hrs.

- b) Hipersensibilidad en hoja de tabaco.** Se realizaron diluciones de las bacterias a una concentración de  $10^8$  UFC/mL en agua estéril. Utilizando jeringas de 5 mL sin aguja, se inocularon las diluciones en hojas de *Nicotiana benthamiana*, previamente desinfectadas con un algodón y etanol al 70%. Para cada cepa la prueba se realizó por duplicado, y se observaron cambios en las hojas cada tres días durante dos semanas.
- c) Pudrición en rodaja de cebolla.** Se colocaron dos rodajas de cebolla previamente desinfectadas en una caja petri con papel filtro húmedo en condiciones de esterilidad. Se realizaron dos cortes con un bisturí a lo largo de la rodaja y posteriormente se colocó la bacteria a evaluar con un asa bacteriológica. Se incubó a 28°C durante 24 hrs. La desinfección se realizó de la misma forma que para la prueba de pudrición en rodaja de papa.
- d) Respuesta en hoja de cebolla.** Se realizaron diluciones bacterianas a una concentración de  $10^8$  UFC/mL en agua estéril y se inocularon con una jeringa de 0.5 mL en la base de las hojas de cebolla crecidas por 2 meses. Se colocó un control negativo con agua destilada, se dejaron incubar en condiciones de humedad durante una semana.

Se realizaron escalas de porcentaje de respuesta en los diferentes ensayos: en el caso de pudrición en rodaja de papa, el máximo porcentaje se le otorgó a las bacterias que fueron capaces de cubrir toda la superficie de la rodaja, coloración negra y presencia de un olor desagradable (Figura 3a); para las pruebas de hipersensibilidad en hoja de tabaco se calificó como el 100% a las cepas que provocaron una máxima respuesta en la hoja (Figura 3b); para la respuesta en rodaja de cebolla se consideró como el máximo a las bacterias que presentaron un mayor crecimiento (Figura 3c); y por último, el inóculo en hoja de cebolla se evaluó tomando en cuenta el grado de marchitez de hoja (Figura 3d).



**Figura 3. Pruebas para la identificación de bacterias patógenas.** En el ensayo en rodaja de papa se observó la capacidad de crecimiento y pudrición de las diferentes cepas: **a)** respuesta positiva a pudrición en papa (cepa M3Rib); **b)** respuesta positiva a la marchitez en hoja de tabaco (cepa M3FCc); **c)** rodaja de cebolla, el color amarillo indica crecimiento bacteriano (cepa M3RGe); **d)** hoja de cebolla con puntas amarillas (cepa M3FCc).

#### **4.2.7. Caracterización de las bacterias aisladas**

Todas las bacterias obtenidas durante el aislamiento fueron sometidas a las siguientes pruebas para evaluar su efecto promotor de crecimiento.

##### **4.2.7.1. Determinación de la enzima ACC desaminasa.**

Cada bacteria aislada fue sembrada en placas con medio sólido mínimo de sales DF (Dworkin y Foster, 1958) cuya composición por litro es la siguiente: 4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g  $\text{NaHPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg  $\text{FeSO}_4$ , 10 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg  $\text{MnSO}_4$ , 50 mg  $\text{CuSO}_4$ , 10 mg  $\text{MoO}_3$ , 70 mg  $\text{MgSO}_4$ , glucosa 0.2%, ácido glucónico 0.2%, ácido cítrico 0.2% y 17 g de agar grado bacteriológico Difco; se esterilizó en condiciones de calor húmedo durante 20 minutos a  $121.5\text{ }^\circ\text{C}$  y presión de  $15\text{ lb/in}^2$ . Una vez solidificado el medio en cajas petri, se suplementó con 0.1 mL de ACC 3 mM por extensión con varilla de vidrio (Sigma Chemical Company, St. Louis MO) como única fuente de nitrógeno, esterilizado por filtración a través de una membrana Millipore tipo GS de  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  de diámetro. Se incubó a  $28^\circ\text{C}$  por 2 días, y se evaluó el crecimiento en el medio en una escala del 0 al 5, donde el 5 fue asignado a las cepas con mayor crecimiento, y 0 a las cepas que no fueron capaces de crecer.

##### **4.2.7.2. Detección de sideróforos utilizando medio agar CAS.**

Para diferenciar entre bacterias que son capaces de producir sideróforos de aquellas que no lo hacen, se utilizó medio agar CAS (Alexander & Zuberer, 1991).

La preparación del medio se realizó partiendo de 4 soluciones, esterilizadas por separado antes de realizar la mezcla.

- a) Solución 1 o solución indicadora Fe-CAS. Se mezclaron 10 mL de una solución 1mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (en HCl 10mM) con 50 mL de una solución acuosa de CAS (Cromo azurol S; Sigma Chemical Company, St. Louis MO) con una concentración de 1.21 mg/mL. La mezcla púrpura oscuro resultante se adicionó lentamente y con agitación constante a 40 mL de una solución acuosa de HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio, Fluka Biochemika, Switzerland) a una concentración de 1.82 mg/mL. La solución azul oscuro que resultó, se esterilizó en autoclave utilizando calor húmedo y se enfrió a 50°C. Los reactivos en la solución indicadora se deben preparar minutos antes de preparar el agar CAS (Alexander & Zuberer, 1991).
- b) Solución 2 o solución reguladora. Se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES (piperazina-N, N'-bis [2-ácido etanosulfónico]; Sigma Chemical Company, St. Louis MO) en 750 mL de una solución salina que contenía 0.3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de NaCl y 1.0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Se ajustó el pH a 6.8 con KOH 50% y se adicionó agua hasta alcanzar un volumen de 800 mL. Se agregaron 15 g de agar bacteriológico, se esterilizó a condiciones de calor húmedo y se enfrió a 50°C.
- c) Solución 3. Se adicionaron en 70 mL de la siguiente composición: 2g de glucosa, 2 g manitol, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11 mg  $\text{CaCl}_2$ , 1.17 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.04 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1.0 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Se esterilizó y se dejó enfriar a 50°C.
- d) Solución 4. Consistió en preparar 30 mL de casaminoácidos al 10% (p/v) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) esterilizados por filtración a través de una membrana Millipore tipo GS de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La solución 3 se adicionó a la solución reguladora junto con la solución de casaminoácidos. La solución indicadora fue adicionada hasta el final, con suficiente agitación para mezclar los ingredientes, pero evitando la formación de burbujas.

Todos los medios y reactivos se prepararon con agua destilada desionizada (Alexander & Zuberer, 1991).

Los aislados bacterianos se sembraron por triplicado por el método de estría cruzada sobre el medio agar CAS y se incubaron a 28°C por 48 hrs. Después de dicho tiempo se observó el desarrollo de halos naranjas alrededor de las colonias, lo cual es indicativo de la liberación de hierro a partir del complejo colorido Fe-CAS por parte de los sideróforos bacterianos.

Para determinar si los aislados bacterianos son capaces de producir sideróforos, se sembraron por duplicado utilizando el método de estría simple en cajas petri con el medio Agar CAS. Se incubaron a 28°C por 48 hrs. Se observó si había halos naranja-café alrededor de la colonia, que nos indicó la liberación de hierro a partir del complejo Fe-CAS por la presencia de sideróforos bacterianos. Se utilizó una escala del 0 al 5, asignando el valor de 5 a las cepas que presentan un mayor halo y de 0 en las que no lo tuvieron.

#### **4.2.7.3. Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos**

Para determinar qué cepas son capaces de solubilizar fosfatos se utilizó el medio de fosfatos del National Botanical Research Institute (NBRIP) que contiene: 10 g de glucosa, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de KCl, 0.1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 17 g de agar bacteriológico, mezclado en 1000 mL de agua destilada; se esterilizó en autoclave con calor húmedo.

Las bacterias a evaluar fueron sembradas por estría sencilla (4 cepas por placa petri) e incubadas durante 48 hr a 28 °C. A las cepas que fueron capaces de crecer formando halos en el medio se les asignaron valores del 0 al 5, donde 5 pertenecían a las bacterias que formaron los halos más grandes.

#### **4.2.7.4. Selección de bacterias posibles fijadoras de nitrógeno**

Se utilizó el medio semisólido libre de nitrógeno (medio NFB) que contiene 0.5 g de ácido L-málico, 0.2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g de NaCl, 0.02 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4 mL de Fe-EDTA (citrato férrico de plantas) al 1.64%, 2 mL de elementos traza, 2 mL de azul de bromotimol al 0.5% (w/w en etanol), 4 g de KOH, 1 mL de solución de vitaminas, 1.85 g de agar, disueltos en 1000 mL de agua destilada, se

ajustó el pH 6.8 con KOH. Las muestras fueron sembradas por duplicado utilizando la técnica de picadura aproximadamente 0.5 cm de profundidad en tubos con este medio, fueron incubados a 28 °C durante 4 días o hasta la aparición de un crecimiento denso o la formación de una película bajo la superficie (Döbereiner, 1994).

## **SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA**

### **4.3. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las bacterias aisladas contra bacterias patógenas**

#### **4.3.1. Pruebas de antagonismo *in vitro* mediante enfrentamiento directo**

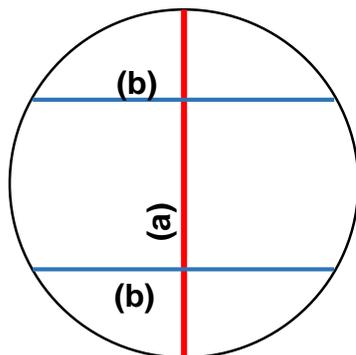
Para llevar a cabo las pruebas de antagonismo por enfrentamiento directo, se utilizaron cultivos bacterianos de 24 a 48 hrs de crecimiento de las bacterias patógenas seleccionadas y a las bacterias previamente caracterizadas para realizar las pruebas de antagonismo. La técnica de enfrentamiento directo consistió en sembrar el microorganismo patógeno por estría sencilla a la mitad de la placa, y posterior a esto se colocaron dos estrías paralelas entre ellas y perpendiculares a la bacteria patógena (Figura4, en cajas petri con medios B de King y Agar Nutritivo para las bacterias aisladas previamente en medio YDC. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 hrs. Se observó el crecimiento bacteriano en cada intersección de las estrías para determinar las cepas que inhibieran el crecimiento de las bacterias patógenas.

#### **4.3.2. Pruebas de antagonismo *in vitro* mediante la técnica de microgota en doble capa de agar**

Se utilizó la técnica de microgota en doble capa de agar para observar el efecto antagónico de las cepas aisladas, para ello se realizaron diluciones bacterianas de las cepas patógenas y las cepas a evaluar en tubos con 9 mL de solución salina 0.85% w/v a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente al patrón 0.5 escala de McFarland.

La técnica consistió en colocar 100 µL de la bacteria patógena en una caja petri con un soporte definido y se sembró por extensión con varilla de vidrio, se añadieron

aproximadamente 10 mL del mismo soporte cubriendo toda la superficie de la placa, y posterior a la solidificación se colocaron 5 gotas de la posible bacteria antagonica.



**Figura 4. Prueba de antagonismo *in vitro* por enfrentamiento directo.** Se colocó una estría sencilla del microorganismo patógeno (a), perpendicular a éste se colocó una estría sencilla por duplicado (b).

Después de una hora se incubaron a 28°C de 24 a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se evaluó el efecto antagonico mediante la aparición de halos de inhibición alrededor de las gotas.

#### **4.4. Evaluación de la capacidad antagonica de bacterias seleccionadas contra las bacterias patógenas bajo condiciones de invernadero**

Para las pruebas de antagonismo en invernadero se seleccionaron las dos bacterias que provocaron mayor daño a las plantas de cebolla durante los ensayos de patogenidad, y cuatro bacterias que tuvieron una mayor respuesta antagonica durante la evaluación de antagonismo *in vitro*. Previo al ensayo en invernadero, se realizaron pruebas de compatibilidad entre las cuatro cepas antagonicas seleccionadas.

##### **4.4.1. Pruebas de compatibilidad entre las bacterias con mayor respuesta antagonica**

Con el objeto de utilizar un consorcio con las bacterias antagonicas a evaluar, se realizaron pruebas de compatibilidad para las cepas que tuvieron una mayor inhibición al enfrentarse con las 9 bacterias patógenas en los ensayos *in vitro*. Se utilizó la prueba de enfrentamiento directo previamente descrito. Cada ensayo fue

realizado por triplicado. Las cajas se llevaron a incubar a 28°C durante 24 horas. Se evaluó si hubo inhibición o no en el cruce de las estrías.

#### **4.4.2. Pruebas de antagonismo *in vivo***

Para evaluar la capacidad antagónica de las 4 bacterias previamente aisladas se utilizaron cebollas de 4 meses de edad. Se estableció un diseño experimental bajo condiciones de invernadero para 18 tratamientos con 6 repeticiones para cada uno, para un total de 108 unidades experimentales compuestas cada una por una planta de cebolla (3 y 4 meses de edad), sembradas en mezcla de suelo general previamente esterilizada (composición 1:2:3:1:1 de suelo lama, suelo de hoja, Sunshine mezcla 3, perlita y vermiculita).

Se realizaron suspensiones de las bacterias patógenas en tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Cada unidad fue inicialmente inoculada por inyección en la base de la hoja de cebolla utilizando jeringas Terumo® con la dilución del patógeno y se incubaron en condiciones de humedad.

Posterior a la infección (48 horas) en la planta, se realizó la aplicación por aspersión de las suspensiones  $1 \times 10^8$  UFC/mL del microorganismo antagonista y del consorcio antagonista a evaluar. Se realizaron 18 tratamientos: el patógeno 1 fue enfrentado con los 4 mejores antagonistas por separado y en consorcio, al igual que el patógeno 2, los controles establecidos fueron: negativo (agua estéril), controles positivos de las cepas patógenas, antagonistas y del consorcio de antagonistas. Se utilizaron 6 repeticiones para cada tratamiento. Las plantas fueron regadas cada 72 h 14 días después de la primera aplicación de los microorganismos antagonistas, y se realizó una segunda aplicación por aspersión utilizando las mismas concentraciones iniciales.

Se realizaron registros de las plantas sobre la longitud de la parte aérea y se tomaron fotografías al inicio del experimento, posterior a la aplicación de los antagonistas el registro se realizó cada 4 días. Al término del experimento, 26 días después del primer tratamiento con los antagonistas, se procedió a evaluar cada planta utilizando una escala de severidad de la enfermedad realizada en base al

daño provocado por los agentes etiológicos, clasificados en una escala del 1 al 5 como se observa en la Tabla 1. Para determinar si la severidad de la enfermedad disminuyó en las diferentes aplicaciones de los antagonistas, se utilizó la prueba estadística para datos no paramétricos Kruskal-Wallis (Apodaca *et al.*, 2001).

Para el análisis estadístico también se obtuvieron peso fresco y peso seco de la parte aérea, raíz y bulbo. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de una vía y determinar si existió diferencia significativa durante el experimento. Posteriormente, se utilizó la prueba de Tukey para la comparación múltiple entre tratamientos y el control positivo de los patógenos

**Tabla 1.** Escala de severidad del daño de la enfermedad, después de 28 días de la aplicación de los tratamientos de los microorganismos antagonistas a evaluar.

NIVEL	DESCRIPCIÓN	FOTOGRAFÍA
1	Hojas verdes, oscuras y turgentes	
2	Hojas cloróticas, puntas secas con borde amarillo menor a 1 cm	

3	Hojas cloróticas y blandas, puntas de hojas secas con borde amarillo mayor a 1 cm	
4	1 o 2 hojas que presentan más del 70 % deshidratadas	
5	Muerte por enfermedad	

#### 4.5. Identificación bacteriana utilizando técnicas moleculares

La identificación de las especies utilizadas se realizó mediante la secuenciación de la subunidad 16s ribosomal del rDNA a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual se realizó mediante el siguiente orden.

#### 4.5.1. Extracción de DNA genómico

Con la finalidad de obtener el DNA genómico de los aislados bacterianos, se utilizaron inóculos en 3 mL de medio BK líquido incubados a 28 °C durante 48 hrs. Se centrifugó un volumen de 1.5 mL en tubos Eppendorf® a 8000 rpm durante 5 minutos para formar una pastilla celular. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 500 µL de amortiguador J (Tris-HCl 1M, EDTA 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 8), se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. La pastilla nuevamente en 300 µL de amortiguador J que contenía 40 mg/mL de lisozima y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente se adicionaron 20 µL de SDS 10%, se homogenizó por inversión seis veces y se dejó incubar 20 minutos a 70°C. Terminado el tiempo de incubación, se dejó llegar lentamente a 50 °C para después adicionar 5 µL de RNAasa (10 mg/mL) y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL), se colocaron en incubación a 60°C durante 1 hr 30 minutos. Al término se agregaron 50 µL de NaCl 5M y se dejó agitar suavemente en hielo durante 15 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se colocaron en tubos Eppendorf® y se le agregó el mismo volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico frío (proporción 25:24:1 v/v), se homogenizó por inversión 6 veces y se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se recuperó nuevamente el sobrenadante y se colocaron en tubos Eppendorf® a los cuales se le adicionaron cloroformo-alcohol isoamílico frío (proporción 24:1 v/v), se mezclaron por inversión 6 veces y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó adicionando el mismo volumen de isopropanol 100% frío y se colocaron a -20°C durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 300 µL de etanol 70% frío para lavar de sales la pastilla formada, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue eliminado nuevamente y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El DNA obtenido se resuspendió en 20 µL de agua mQ estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

#### 4.5.2. Determinación de la calidad de DNA genómico

El DNA genómico obtenido se colocó en un gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1x), para teñir el DNA se utilizó un colorante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed Biotium®. En cada pozo del gel se colocaron 3 µL de GelRed con 5 µL de DNAg y para la migración de los fragmentos se realizó la electroforesis en una cámara Owl Separation Systems® utilizando una fuente de poder modelo PAB 350-0.2 Kikusio Electronics Corp.® a 100 V durante 30 minutos, en solución amortiguadora TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.0). Para su visualización se utilizó un fotodocumentador BioRad® modelo GelDoc XR+ y analizado con el programa Image Lab® Software versión 4.1. Después de determinar la presencia de DNA genómico, se cuantificó y determinó la calidad utilizando el equipo NanoDrop 2000c®, los valores en los rangos de absorbancia 260/280 nm fueron cercanos a 1.8, en el caso de 260/230 se encontraban entre 2.0-2.2, los cuales fueron indicativos de la pureza del DNA (valores menores indicaban la presencia de contaminantes proteicos). Las concentraciones de DNA genómico mayores a 500 ng/µL fueron diluidas hasta obtener una concentración entre 100 y 500 ng/µL.

#### 4.5.3. Iniciadores del gen 16S rDNA

Para amplificar el gen 16s rDNA se utilizaron los iniciadores universales 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Frank *et al.*, 2008). (Tabla 2).

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para la identificación bacteriana

Iniciador	Secuencia (5' -> 3')	Posición <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	56
1494R	TACCTTGTTACGACTT	1492- 1513	56

<sup>a</sup>Numeración de acuerdo al gen *rrs* de *Escherichia coli*.

<sup>b</sup>Temperatura de alineamiento (Frank *et al.*, 2008).

#### **4.5.4. Amplificación del gen 16s rDNA**

Se utilizaron muestras de DNA genómico con concentraciones previamente mencionadas como templado de DNA para amplificar el gen 16S rDNA de cada muestra utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En las reacciones con los iniciadores ya descritos, se obtuvo un fragmento de 1500 pb que posteriormente se utilizó para su secuenciación. Para las reacciones de PCR se utilizaron 2.5  $\mu$ L de solución amortiguadora 10x, 0.75 de  $MgSO_4$  50 mM, 0.5  $\mu$ L de dNTP's 10mM, 0.5 de cada uno de los iniciadores 20 pM, DMSO 1  $\mu$ L, 0.1  $\mu$ L de Taq Polimerasa Platinum 5U/ $\mu$ L, 2 $\mu$ L de DNA genómico (100 a 500 ng) y 17.15  $\mu$ L de agua mQ estéril para una reacción de 25 $\mu$ L. Las condiciones utilizadas para todas las reacciones fueron: 2 min a 95°C; 30 ciclos de 40 s a 95°C, 30 s a 56°C, 1 min a 72°C; 7 min a 72°C utilizando el termociclador SelectCycler de BioProducts®. Por último, los productos de la reacción de mantuvieron a 4°C. Para la visualización de los productos amplificados por PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%. En cada pozo del gel se colocaron 2  $\mu$ L de GelRed con 5  $\mu$ L del producto de PCR, y en el primer pozo se colocaron 2  $\mu$ L de marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder de la marca Invitrogen, los fragmentos fueron migrados en cámara de electroforesis a 100 V por 30 min en solución amortiguadora TAE 1x. Para su visualización se utilizó un fotodocumentador BioRad® modelo GelDoc XR+ y analizado con el programa Image Lab.

#### **4.5.5. Secuenciación de los fragmentos del gen 16s rDNA**

Los productos de PCR amplificados fueron enviados a la empresa MacroGen Usa® para su secuenciación. Se enviaron 35 $\mu$ L del segmento de DNA amplificado a una concentración de 20 a 40 ng/ $\mu$ L según las especificaciones de la empresa.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Aislamiento de bacterias endófitas

Como se mencionó en la sección anterior, se utilizaron diez muestras de cebolla y diez de cebollín que presentaron síntomas de marchitamiento y languidez en hoja tomadas al azar de cultivos pertenecientes al municipio de Tarimoro, Guanajuato (Figura 5).



**Figura 5. Planta de cebolla recolectada para el aislamiento bacteriano.** Las muestras utilizadas presentaban diferente grado de enfermedad, los síntomas observados fueron marchitez y languidez foliar.

Se lograron aislar 85 bacterias endófitas de cebolla y 41 bacterias endófitas de cebollín, de las cuales se seleccionaron 61 cepas que presentaron morfología colonial (Tabla 3).

**Tabla 3.** Número de bacterias endófitas aisladas a partir de diferentes partes de cebollas y cebollines.

Muestra	Hoja	Bulbo	Raíz
Cebolla	15	16	12
Cebollín	10	NA*	8

\*No aplica

De las 61 bacterias seleccionadas, las cepas que presentaron morfología colonial, forma celular y respuesta a la tinción de Gram similares fueron sometidas a antibiogramas, utilizando multidiscos combinados BIO-RAD (Cat. 71080380). Dos aislados de hoja etiquetados M3FCc y M3FCa obtuvieron respuestas similares a los antibióticos, sin embargo, en los ensayos de patogenicidad M3FCc se comportó como patógeno, por lo cual se consideraron como dos cepas diferentes.

Al realizar la tinción de Gram a las cepas de interés, obtuvimos 29 bacterias Gram positivas y 32 Gram negativas, y fueron descritas en base a su morfología colonial. En la Tabla 4 se muestra la morfología colonial de las bacterias utilizadas como antagonicas y de las dos patógenas seleccionadas para el estudio de invernadero.

## **5.2. Identificación molecular de los aislados bacterianos utilizados en invernadero**

La secuenciación de la región 16s ribosomal permitió realizar un análisis tipo blast de las secuencias en la base de datos NCBI para determinar la identificación taxonómica de las cepas utilizadas durante los experimentos en invernadero (Tabla 4).

**Tabla 4.** Identificación molecular de las cepas utilizadas para las pruebas in vivo.

Bacteria	Clave	Nombre	Longitud*	Cobertura**	Identidad***
Patógeno1	M3FCc	<i>Erwinia</i> sp.	689	100%	96%
Patógeno 2	M3RGe	<i>Bacillus</i> sp.	734	100%	99%
Antagónico 1	M3BAb	<i>Serratia plymuthica</i>	895	100%	98%
Antagónico 2	M3FBg	<i>S. plymuthica</i>	893	100%	98%
Antagónico 3	M3FAa	<i>Enterobacter</i> sp.	678	99%	100%
Antagónico 4	M3BJa	<i>Pantoea eucalypti</i>	851	99%	94%

\*Longitud en nucleótidos de la secuencia consulta

\*\* Porcentaje de cobertura de la secuencia consulta

\*\*\*Porcentaje de identidad de la cobertura de la secuencia consulta

### 5.3. Pruebas de patogenicidad de bacterias aisladas de cebolla y cebollín

Se obtuvieron 17 bacterias que respondieron positivo a una o más pruebas de patogenicidad, 15 aisladas de cebolla (2 de bulbo, 5 de hoja y 8 de raíz) y 2 de cebollín (1 de hoja y 1 de raíz). De estas cepas, *Erwinia* sp. y *Bacillus* sp. obtenidas de cebolla respondieron con un mayor porcentaje en la escala cualitativa de las pruebas de patogenicidad y posteriormente fueron utilizadas como Patógeno 1 y Patógeno 2 respectivamente durante los ensayos en invernadero (Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentaje de respuesta en las pruebas de patogenicidad de bacterias seleccionadas para las pruebas de antagonismo *in vitro*. *Erwinia* sp. y *Bacillus* sp. fueron seleccionadas para realizar los ensayos en las pruebas *in vivo*.

Cepa	Putrefacción en papa %	Hipersensibilidad en tabaco %	Rodaja de cebolla %	Hoja de cebolla %
M3BEdb	100	-	60	-
<i>Erwinia</i> sp.	-	100	40	40
M3FGd	100	-	20	40
M3Fla	20	-	20	40
M3REd	80	-	40	-
M3RIb	100	-	80	20
M3REf	60	-	40	40
<i>Bacillus</i> sp.	60	-	100	40
M3RGf	100	-	60	-

**Tabla 6.** Morfología colonial y descripción de la tinción de Gram de las cepas antagonistas y cepas patógenas utilizadas en invernadero.

Cepa	Tamaño	Forma	Borde	Elevación	L. tran	L. refle	Superficie	Aspecto	Color	Consist	Gram
<i>Erwinia</i> sp.	G	C	E	C	O	B	L	H	B	B	-
<i>Bacillus</i> sp.	G	I	E	C	O	B	L	H	B	M	+
<i>S. plymuthica</i>	M	C	E	C	O	B	L	H	B	M	-
<i>S. plymuthica</i>	G	C	E	C	O	B	L	H	B	B	-
<i>Enterobacter</i> sp.	G	C	E	C	O	B	L	H	A	M	-
<i>P. eucalypti</i>	M	C	E	C	T	B	L	H	A	M	-

Clave: Tamaño de la cepa: C=chica, M=mediana, G=grande. Forma de la colonia: C=circular, I=irregular, F=filamentosa. Borde de la colonia: E=entero, A=aserrado, O=ondulado, F=filamentoso. Elevación de la colonia: C=convexa, P=plana, U=umbonada. Luz transmitida: O=opaca, T=transparente. Luz reflejada: B=brillosa, M=mate. Superficie: L=lisa, R=rugosa. Aspecto: S=seco, H=húmedo. Color de colonia en medio BK: A=amarillo, B=blanco, T=transparente. Consistencia: B=blanda, D=dura, M=mucosa. Tinción de Gram: +=positiva, -=negativa.

**Tabla 7.** Escala cualitativa de la producción de la enzima ACC desaminasa de las cepas aisladas de los diferentes órganos de cebolla y cebollín.

ÓRGANO	CLAVE DE LAS CEPAS	ESCALA	% AISLADOS*
Hoja	M3Fia	≥3	1.6
	M3FAB M3FBI M3FCA M3FDA M3FDB M3FDE M3FDI M3FED M3FEE M3FGD M3FGF M3FJA <i>Erwinia</i> sp., <i>S. plymuthica</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	≤2	24.6
Bulbo	M3BEda M3BCd <i>S. plymuthica</i>	≥3	4.9
	M3BAa M3BAc M3BBa M3BCa M3Bda M3BEDb M3BGb M3BHa M3BHb M3Bla M3Blc <i>P. eucalypti</i>	≤2	19.6
Raíz	M3REd M3RGa M3RIb M3REE M3REF M3RGf <i>Bacillus</i> sp.	≥3	11.4
	M3RBb M3Rbc M3REa M3Rfa M3Rfb	≤2	8.1
Hoja cebollín	M2Ffe	≥3	1.6
	M2FCa M2Fec M2Fef M2FGb M2FGc M2FGd M2FId M2FBac M2FFh	≤2	14.7
Raíz cebollín	M2RHb M2RHc M2RBd	≥3	4.9
	M2RCa M2RDa M2RIa M2RJa M2RJb	≤2	8.1

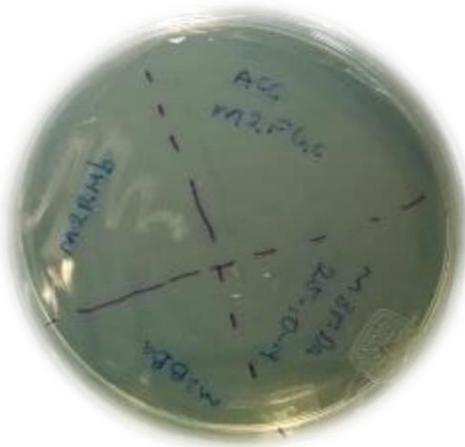
\*% de aislados= (n° de cepas /n° total de aislados) x 100

#### 5.4. Caracterización de las posibles bacterias antagónicas

Las 61 cepas aisladas en total fueron sometidas a diferentes ensayos para pruebas de promoción de crecimiento en planta, de las cuales 37 bacterias respondieron positivamente a una o más pruebas, mencionadas en la Tabla 6.

##### 5.4.1. Determinación de la enzima ACC desaminasa

Con la finalidad de determinar la producción de la enzima ACC desaminasa, las cepas aisladas fueron sembradas en placas con medio sólido rico en sales y que contenían el compuesto ACC (Figura 6). Con base en el crecimiento presentado, se construyó una escala cualitativa en donde al máximo crecimiento observado se le asignó un valor de 5, el menor 1 y las que no presentaron crecimiento 0 (Tabla 7). El mayor número de cepas aisladas que presentaron crecimiento en presencia de ACC mayor a 3 en la escala cualitativa establecida de 0 a 5 (ver Materiales y Métodos) se obtuvo de las muestras de raíz de cebolla (11.4%), en contraste con las cepas aisladas de hoja de cebolla (1.6%) y cebollín (1.6%).



**Figura 6. Determinación de la producción de la enzima ACC desaminasa.** La cepa M2RHb presentó crecimiento en comparación con las otras tres cepas.

#### 5.4.2. Detección de sideróforos

La detección de sideróforos (véase Materiales y métodos) se realizó utilizando el medio Agar-CAS que contenía el complejo Fe-CAS, las bacterias fueron sembradas por estría sencilla e incubadas durante 48 h a 28°C. Se observó la presencia halos naranjas alrededor de las colonias, lo cual fue indicativo de la liberación de hierro del complejo colorido por parte de los sideróforos bacterianos (Figura 7).

El porcentaje de cepas aisladas de bulbo (11.4%) que presentaron halos mayores a 3 en la escala cualitativa fue mayor que las obtenidas de raíz (9.8%) y hoja (6.5%) de cebolla y cebollín (Tabla 8).

**Tabla 8.** Escala cualitativa de la producción de sideróforos de las cepas aisladas de hoja, bulbo y raíz de cebolla y de hoja y raíz cebollín.

ÓRGANO	CLAVE CEPAS	ESCALA	% AISLADOS*
Hoja	M3FAb M3Fed S. <i>plymuthica</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	≥3	6.5
	M3FBi M3FCa M3FDa M3FDb M3FDe M3FDi M3FEe M3FGd M3FGf M3Fia M3Fja <i>Erwinia</i> sp.	≤2	19.6
Bulbo	M3BAa M3BAc M3Bda M3Beda M3BHb M3Bia S. <i>plymuthica</i>	≥3	11.4
	M3BBa M3BCa M3BEdb M3BGb M3BHa M3Blc <i>P. eucalypti</i> M3BCd	≤2	13.1
Raíz	M3RBb M3Rfa M3REe M3REf M3RGf <i>Bacillus</i> sp.	≥3	9.8
	M3RBc M3Rea M3REd M3RGa M3RGb M3RIb	≤2	9.8
Hoja cebollín	M2FEc M2FEf M2FFh	≥3	4.9
	M2FCa M2FGb M2Ffe M2FGb M2FGc M2FGd M2FId M2FBac	≤2	13.1
Raíz cebollín	M2RHb M2RHc M2RCa M2RBd M2RJa	≥3	8.1
	M2RDa M2Ria M2RJb	≤2	4.9

\*% de aislados= (n° de cepas /n° total de aislados) x100



**Figura 7. Cambio de color en el medio Agar-CAS.** La presencia de un halo color naranja alrededor de la cepa sembrada indicó que ha ocurrido una liberación de hierro unido al CAS.

### 5.4.3. Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos

El medio utilizado para la detección de bacterias capaces de solubilizar fosfatos (véase Materiales y métodos) fue el medio NBRIP que contenía fosfato en la forma de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las bacterias fueron sembradas por estría sencilla e incubadas durante 48 hrs. a 28 °C. A la formación de los halos se les asignaron valores del 0 al 5, donde 5 pertenecía a las bacterias que formaron los halos de tamaño mayor a 8 mm (Tabla 9).

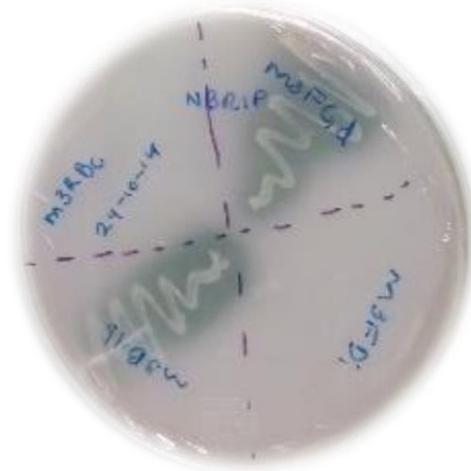
**Tabla 9.** Resultados cualitativos de los ensayos utilizando medio de fosfatos NBRIP.

ÓRGANO	CLAVES DE LAS CEPAS	ESCALA	% AISLADOS*
Hoja	M3FBi M3FDa M3FDb M3FDe M3FEe M3FGf <i>S. plymuthica</i>	≥3	11.4
	M3FAb M3FCa M3FDi M3Fed M3FGd M3Fia M3Fja <i>Erwinia</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.	≤2	14.7
Bulbo	M3BAa M3BAc M3BBa M3BGb M3BHb M3BIa <i>P. eucalypti</i>	≥3	11.4
	M3BCa M3BEdb M3BHa M3BIc M3BCd M3BDa M3Beda <i>S. plymuthica</i>	≤2	13.1

	-	$\geq 3$	0
Raíz	M3RBc M3Rea M3REd M3RGa M3RGb M3RIb M3RBb M3Rfa M3REe M3REf M3RGf <i>Bacillus</i> sp.	$\leq 2$	19.6
Hoja cebollín	M2FGb M2FGc	$\geq 3$	3.3
	M2FCa M2Ffe M2FGb M2FGd M2FId M2FBac M2FEc M2FEf M2FFh	$\leq 2$	14.7
Raíz cebollín	-	$\geq 3$	0
	M2RHb M2RHc M2RCa M2RBd M2RJa M2RDa M2RIa M2RJb	$\leq 2$	8.2

\*% de aislados= (n° de cepas /n° total de aislados) x 100

Las cepas que presentaron halos correspondientes a más de 3 en la escala cualitativa fueron en mayor porcentaje las aisladas de hoja (11.4%) y de bulbo (11.4%) de cebolla, a diferencia de las aisladas de raíz (0 %)



**Figura 8. Placa de cultivo con medio de fosfatos NBRIP.** Se observó la presencia de halos de solubilización las cepas consideradas positivas. En la imagen sólo los aislados M3FGd y M3BHb de hoja y bulbo respectivamente, son capaces de solubilizar fosfato de su forma insoluble  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

#### 5.4.4. Selección de bacterias posibles fijadoras de nitrógeno

Utilizando el medio semisólido libre de nitrógeno NFB (véase Materiales y métodos), las cepas aisladas fueron sembradas mediante la técnica de picadura aproximadamente 0.5 cm de profundidad en tubos con este medio. Posterior a la incubación, se observó la aparición de un crecimiento denso o la formación de una película subsuperficial. Los dos crecimientos se consideraron como respuesta positiva durante el ensayo. La mayoría de los aislados crecieron en el medio NFB formando halos o creciendo de forma dispersa (Tabla 10).

**Tabla 10.** Respuesta de las cepas sembradas en el medio semisólido

ÓRGANO	CLAVE CEPAS	RESPUESTA	% AISLADOS*
Hoja	M3FAB M3FBi M3FCa M3FDa M3FDb M3FDe M3FDi M3FEe M3FGd M3FGf M3Fia <i>Erwinia sp. S. plymuthica</i>	+	21.3
	M3FEd M3Fja <i>Enterobacter sp.</i>	-	4.9
Bulbo	M3BAa M3BAc M3BBa M3BCa M3BDa M3BEa M3BEb M3BGb M3BHa M3BHb M3BIa <i>P. eucalypti</i> M3BCd	+	21.3
	M3BIc <i>S. plymuthica</i>	-	3.2
Raíz	M3RBc M3Rea M3REd M3RGa M3RGb M3RIb M3RBb M3Rfa M3REe M3REf M3RGf <i>Bacillus sp.</i>	+	19.6
	M3RGb M3RBb	-	3.2
Hoja cebollín	M2FGb M2FGc M2Ffe M2FGb M2FGd M2FId M2FBac M2FEc M2FEf M2FFh	+	16.4
	M2FCa	-	1.6
Raíz cebollín	M2RDa M2RHb M2RHc M2RIa M2RJaM2RCa M2RBd	+	11.4
	M2RJb	-	1.6

\*% de aislados= (n° de cepas /n° total de aislados) x 100

+crecimiento positivo; -crecimiento negativo

Las cepas seleccionadas para los ensayos en invernadero presentaron diferentes respuestas al someterlas a pruebas para evaluar su actividad como promotoras de crecimiento. En la Tabla 11 se muestra un resumen de la respuesta de bacterias utilizadas como tratamientos antagónicos en el invernadero y la respuesta a los diferentes medios de cultivo.

**Tabla 11.** Análisis cualitativo de las pruebas para determinar actividad de promoción de crecimiento de las cepas utilizadas posteriormente en invernadero.

CEPA	Solubilización de fosfatos	Medio con ACC	Medio libre de N*	Producción de sideróforos
<i>S. plymuthica</i> (bulbo)	0	4	-	3
<i>S. plymuthica</i> (hoja)	0	1	+	3
<i>Enterobacter</i> sp.	3	1	-	3
<i>P. eucalypti</i>	3	1	+	1
<i>Bacillus</i> sp.	0	3	+	3
<i>Erwinia</i> sp.	1	1	+	1

+ crecimiento en medio NFB \* Cepas patógenas

### 5.5. Pruebas de antagonismo *in vitro*

De las 17 cepas que respondieron positivo a las pruebas de patogenicidad, se utilizaron 9 bacterias con mayor respuesta en estas pruebas. Estas 9 cepas se utilizaron para evaluar el efecto antagónico de las cepas no patógenas. En la evaluación se observó la interacción de las patógenas con las posibles antagónicas mediante dos ensayos *in vitro* (Figura 9).

El efecto antagónico de las bacterias evaluadas varió respecto al microambiente del que fueron aisladas, 11 cepas de bulbo y 11 de hoja fueron antagonistas para uno o más microorganismos patógenos, y solo 3 obtenidas de raíz. Las respuestas al enfrentamiento directo y por microgota en doble capa de agar de los antagónicos seleccionados para las posteriores pruebas *in vivo* se observan en la Tabla 12, las cepas *Erwinia* sp. y *Bacillus* sp. fueron utilizados como Patógeno 1 y Patógeno 2 respectivamente en los ensayos en invernadero. En el caso de *Erwinia* sp., ninguna cepa logró su inhibición.

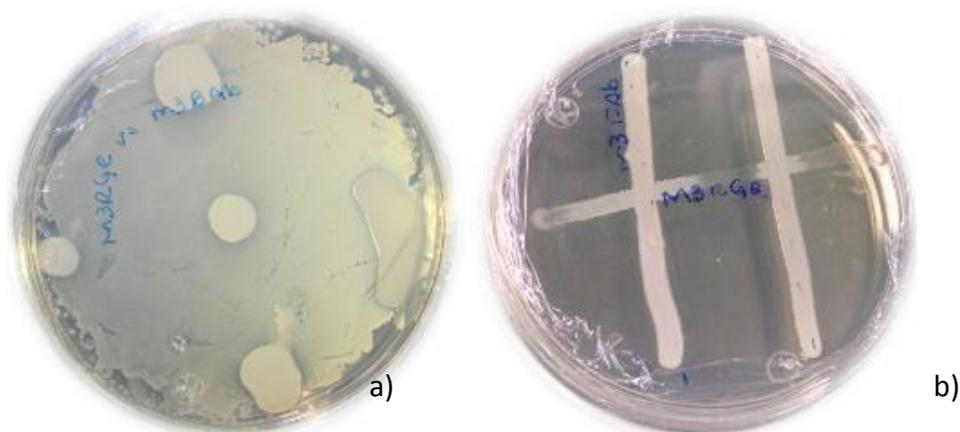
**Tabla 12.** Análisis cualitativo de resultados obtenidos de las 4 cepas que presentaron mayor respuesta antagónica en los ensayos *in vitro*.

ANTAGÓNICO		<i>S. plymuthica</i> (A1)		<i>P. eucalypti</i> (A4)		<i>Enterobacter</i> sp. (A3)		<i>S. plymuthica</i> (A2)	
ENSAYO		MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED
PATÓGENO	<i>Bacillus</i> sp. (P2)	+++++	++	++	++	+++	++++	+++++	++
	<i>Erwinia</i> sp. (P1)	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3Fia	-	+	-	-	-	-	-	+
	M3BEdb	-	-	++++	-	-	-	-	-
	M3REf	-	-	+++++	-	+++++	++	+++++	-
	M3RGf	-	++	-	-	-	+	-	-
	M3FGd	-	+	-	-	-	-	-	-
	M3REd	-	-	-	-	-	-	-	++
	M3Rib	+++	+++	-	-	-	-	+++	++

MG=Microgota en doble capa de agar; ED=Enfrentamiento directo; +=menor inhibición; +++++=mayor inhibición; - =sin inhibición

### 5.6. Evaluación del efecto antagónico *in vivo*

El experimento se realizó en invernadero y tuvo como finalidad evaluar el posible efecto antagónico de 4 cepas aisladas sobre plantas de cebolla infectadas con bacterias patógenas. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando la escala de severidad y posteriormente, el peso seco y húmedo de las plantas al final del experimento.



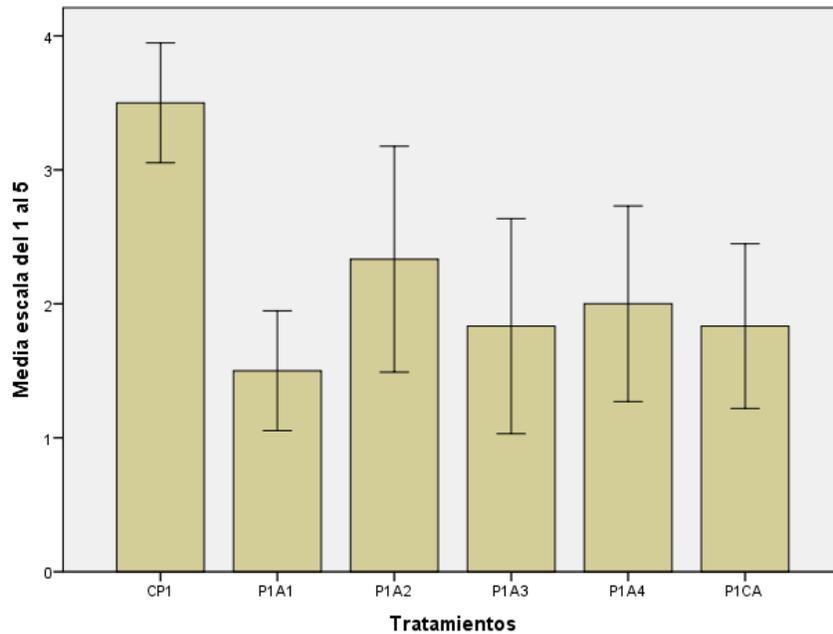
**Figura 9. Pruebas antagónicas *in vitro*.** a) Microgota en doble capa de agar, se observa un halo de inhibición alrededor de la gota del microorganismo antagónico *S. plymuthica* aislada de bulbo sembrada sobre *Bacillus* sp.; b) interacción entre la bacteria antagónica M3FAB y la cepa patógena

*Bacillus* sp. (estría individual), se observa el crecimiento de la cepa antagonica cubriendo el espacio de la estría realizada con *Bacillus* sp.

### 5.6.1. Análisis de la escala de severidad

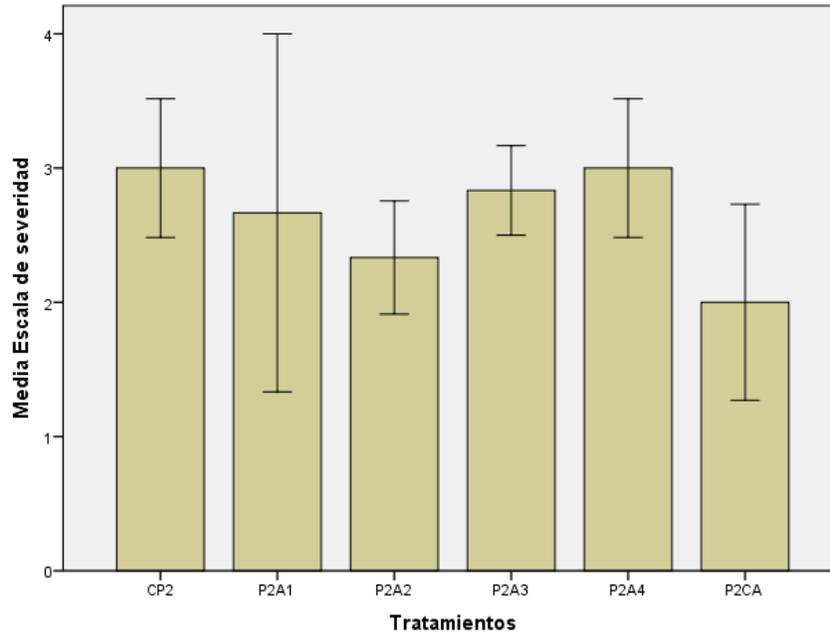
Se utilizó la escala de severidad mencionada en la sección de materiales y métodos (Tabla 1), evaluando únicamente a los controles positivos de los patógenos y los tratamientos con los antagonicos. Se observó que en los niveles 3, 4 y 5 se concentra la mayoría de los controles positivos para *Erwinia* sp. (CP1), *Bacillus* sp. (CP2). Los niveles 1 y 2 sugieren una incidencia de la enfermedad menor y concentran los tratamientos aplicados a plantas infectadas con *Erwinia* sp. con los diferentes antagonicos, incluidos el con el consorcio.

Los resultados se analizaron utilizando la prueba estadística para datos no paramétricos Kruskal-Wallis. En los ensayos con *Erwinia* sp. (patógeno 1) para  $\alpha=0.05$  se obtuvo un  $p\text{-value}=0.016$ , indicando que existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se comparó el control positivo de *Erwinia* sp. con los ensayos para determinar si se lograron variaciones al aplicar los antagonicos. Se observaron diferencias significativas entre el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1) y la aplicación de *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) con  $p\text{-value}= 0.003$ ; control positivo de *Erwinia* sp. y *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2) con  $p\text{-value}= 0.030$ ; control positivo de *Erwinia* sp. y *Enterobacter* sp. (P1A3) con  $p\text{-value}= 0.011$ ; control positivo de *Erwinia* sp. y *P. eucalypti* (P1A4) con  $p\text{-value}=0.012$  y el control positivo de *Erwinia* sp. y el consorcio antagonico (P1CA) con  $p\text{-value}=0.006$ . Las comparaciones entre los antagonicos aplicados para el control de *Erwinia* sp. no presentaron diferencias significativas, sin embargo, en la Gráfica 1 observamos que la media de la escala de severidad del tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) es menor en comparación a los otros antagonicos, indicando que esta bacteria logró menor incidencia de la enfermedad en plantas infectadas.



**Gráfica 1. Comparación de la escala de severidad obtenida para plantas infectadas con *Erwinia* sp.** El control positivo del patógeno (CP1) presentó un nivel alto de la enfermedad, mientras que la aplicación de *S. plymuthica* aislada de bulbo disminuye la severidad de la enfermedad en plantas infectadas.

En el análisis de la escala de severidad para los tratamientos con *Bacillus* sp. se obtuvo  $p\text{-value} = 0.225$  con  $\alpha = 0.05$ , lo cual nos indicó que los tratamientos no presentaron diferencias entre sí. En la Gráfica 2 vemos reflejadas las medias de los tratamientos, observando que la mayoría se mantienen en el nivel 3 con excepción del tratamiento con *Bacillus* sp. y el consorcio antagónico, los cuales sugieren una disminución en la severidad de la enfermedad situándose en el nivel 2.



**Gráfica 2. Comparación de la escala de severidad obtenida para plantas infectadas con *Bacillus* sp.** El tratamiento con *Bacillus* sp. y el consorcio antagónico presentó una disminución en la escala de severidad de la enfermedad en plantas infectadas.

### 5.6.2. Análisis de peso húmedo y peso seco

Para determinar la diferencia significativa de los experimentos, se utilizó el análisis de varianza (Anova) de una vía. Posteriormente, se utilizó la prueba de Tukey para la comparación múltiple entre los tratamientos.

#### 5.6.2.1. Peso húmedo de hoja

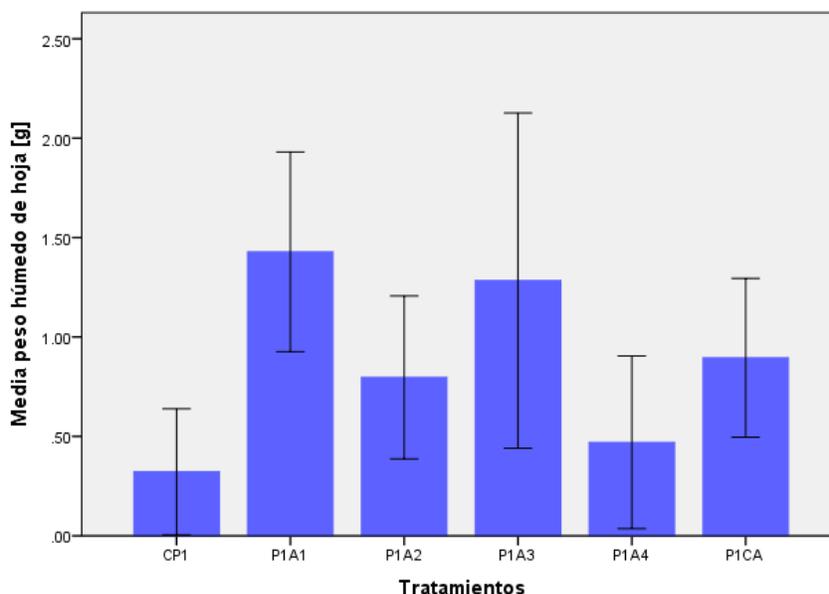
Se utilizó el análisis de varianza de una vía para analizar el peso húmedo de hoja de los tratamientos con *Erwinia* sp, la prueba de Anova indicó diferencias significativas entre los tratamientos considerando un  $\alpha=0.05$  y un valor de  $p=0.031$ . La prueba de Tukey fue utilizada para la comparación múltiple entre el control positivo de *Erwinia* sp. y los diferentes tratamientos, la cual mostró diferencias significativas entre el control del patógeno y la aplicación de *S. plymuthica* aislada de bulbo ( $p\text{-value}=0.049$ ). En la Gráfica 3 se comparan las medias del peso húmedo de hoja en gramos obtenidas al aplicar los diferentes antagónicos. *S. plymuthica* aplicado a plantas infectadas *Erwinia* sp. (P1A1) mostró resultados positivos al

comparar con el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). Este resultado valida lo observado fenotípicamente en la Figura 10.

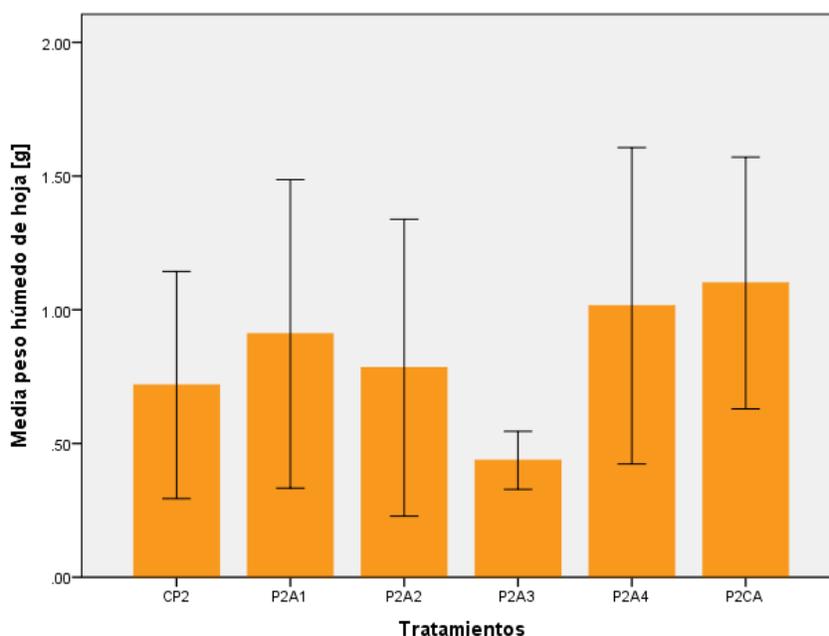
En análisis de varianza de peso húmedo de hoja de los ensayos para *Bacillus* sp. indicó que los tratamientos se comportan de forma similar al no existir diferencia significativa. En la Gráfica 4 se observa la comparación de las medias de peso húmedo de hoja. Estos resultados sumados a los datos obtenidos en la escala de severidad (Gráfica 2) indican que la cepa *Bacillus* sp. no es patógena, por lo cual los datos de peso para bulbo y raíz no se presentarán para los tratamientos que tienen como control positivo la bacteria *Bacillus* sp.



**Figura 10. Evaluación de los tratamientos para *Erwinia* sp., 27 días después de la aplicación.**  
a) Control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). b) Tratamiento con *S. plymuthica* en planta infectada con *Erwinia* sp. (P1A1).



**Gráfica 3. Peso húmedo de hoja para tratamientos con *Erwinia* sp.** La comparación de las medias en gramos de los tratamientos de peso húmedo de hoja y el error estándar reflejan un aumento de masa foliar al aplicar el tratamiento con *S. plymuthica* (P1A1). Los tratamientos con *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2), *Enterobacter* sp. (P1C3), *P. plymuthica* (P1A4) y el consorcio antagonístico no presentan diferencia significativa con el control positivo del patógeno, sin embargo, de observa una tendencia de aumento en masa.



**Gráfica 4. Peso húmedo de hoja para tratamientos con *Bacillus* sp.** La comparación de las medias en gramos de los tratamientos de peso húmedo de hoja y el error estándar reflejan que no

existe una diferencia significativa entre el control positivo de *Bacillus* sp. (CP2) y los tratamientos con los antagonistas: *S. plymuthica* aislada de bulbo (P2A1), *S. plymuthica* aislada de hoja (P2A2), *Enterobacter* sp. (P2A3), *P. plymuthica* (P2A4) y el consorcio antagonístico (P2CA).

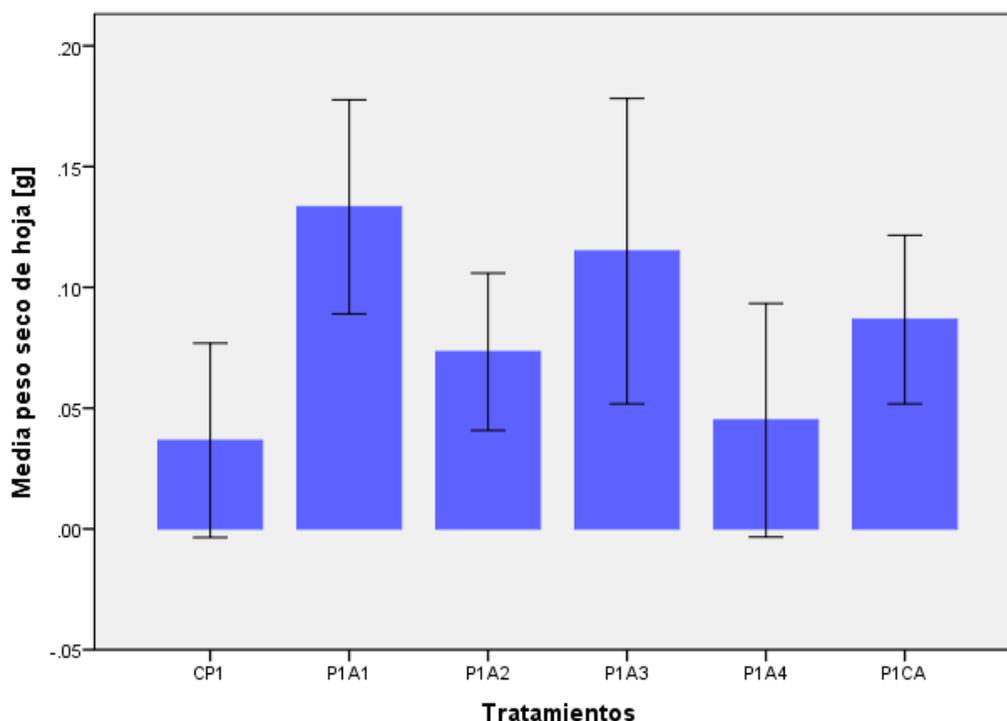


**Figura 11. Evaluación de los controles positivos de *Erwinia* sp. y *Bacillus* sp. 27 días después de la inoculación.** a) Control positivo de *Erwinia* sp.(CP1). b) Control positivo de *Bacillus* sp. (CP2) Los resultados sugieren que las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. (b) no presentan los síntomas de enfermedad a diferencia de las plantas inoculadas con *Erwinia* sp (a).

#### 5.6.2.2. Peso seco de hoja

En el análisis de Anova se obtuvo diferencia significativa con  $p\text{-value}= 0.032$  para  $\alpha=0.05$ , lo que indicó diferencias entre los tratamientos. La prueba de Tukey para comparación múltiple indicó que el control positivo de *Erwinia* sp. y el tratamiento

con *S. plymuthica* aislada de hoja presentaron diferencias significativas con  $p\text{-value}=0.05$ . En la Gráfica 6 se observa un aumento de peso seco para el tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo sobre el control positivo el patógeno, similar a lo obtenido en el análisis de peso húmedo de hoja.

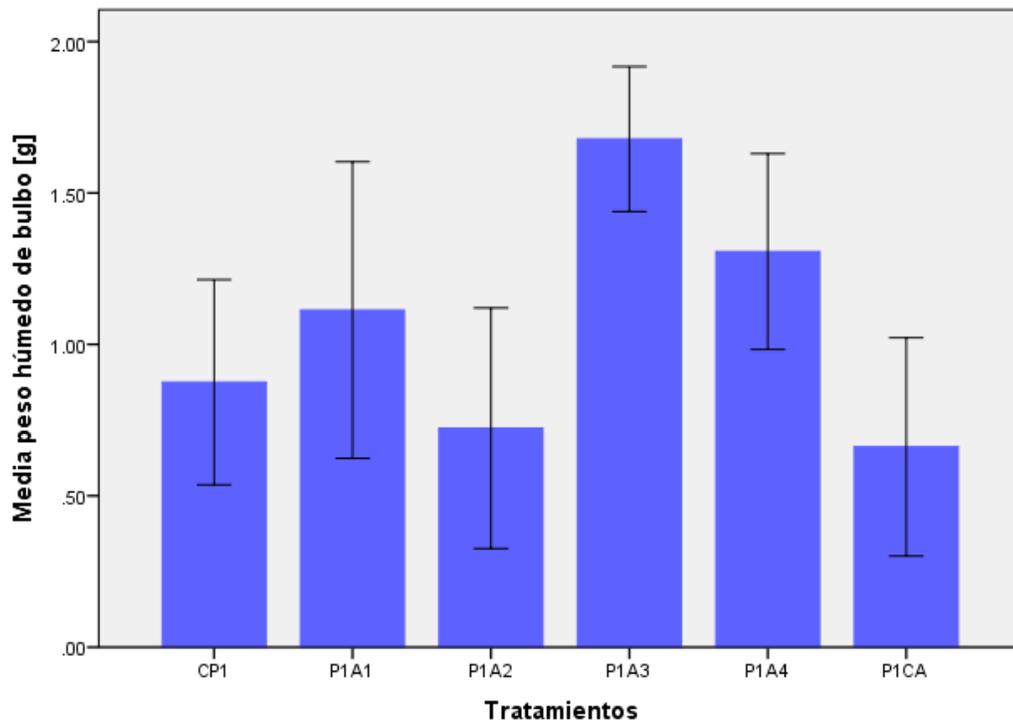


**Gráfica 5. Comparación del peso seco de hoja entre el control positivo de *Erwinia* sp. y los tratamientos con los antagonistas.** La media del peso seco en gramos de los diferentes tratamientos y el error estándar muestran que el tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) provoca en la planta un aumento de masa sobre el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). Los tratamientos con *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2), *Enterobacter* sp. (P1A3) y el consorcio antagonístico (P1CA) presentan una tendencia de aumento en el peso seco de hoja. La bacteria *P. eucalypti* tiene un comportamiento igual al control positivo del patógeno (CP1).

### 5.6.2.3. Peso húmedo de bulbo

Para los resultados del peso húmedo del bulbo de plantas tratadas con el patógeno *Erwinia* sp., el análisis de varianza indicó un valor de  $p\text{-value}=0.004$  para  $\alpha=0.05$ . Al

realizar la prueba de Tukey de las comparaciones múltiples, el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1) y el tratamiento con *Enterobacter* sp. (P1A3) presentaron diferencia significativa con  $p\text{-value}=0.043$  con  $\alpha=0.05$ , las plantas tratadas con *Enterobacter* sp. aumentaron el peso húmedo de bulbo como se observa en la Gráfica 6. Fenotípicamente, este efecto por parte de *Enterobacter* sp. se observa en la Figura 12.



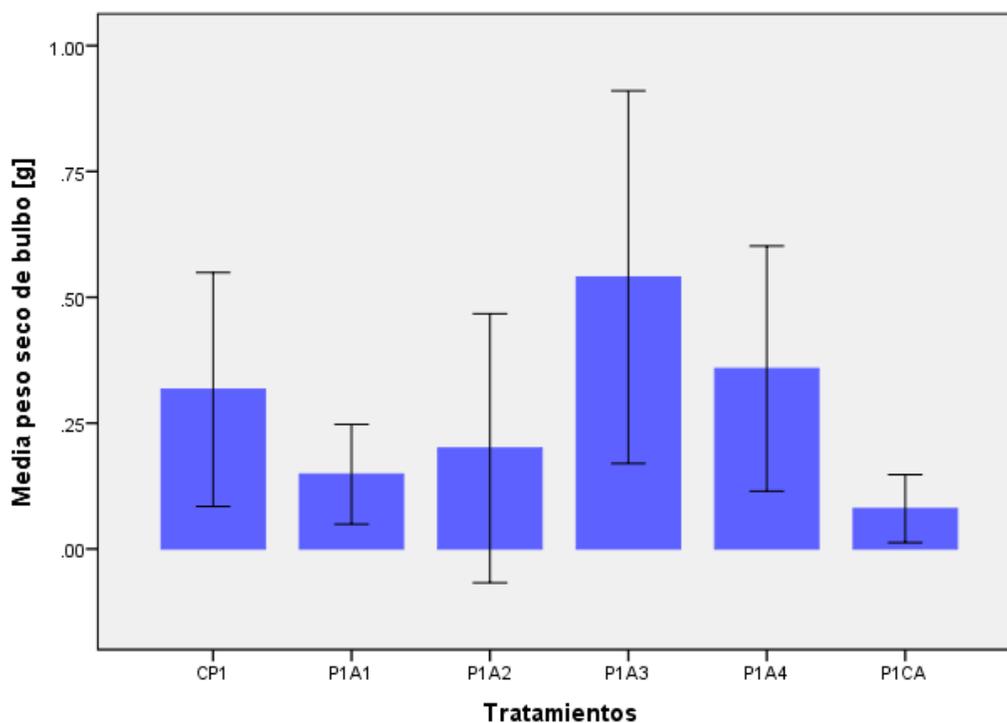
**Gráfica 6. Comparación de medias del peso húmedo de bulbo entre el control positivo de *Erwinia* sp. y los tratamientos con antagonistas.** La aplicación del antagonista *Enterobacter* sp. (P1A3) aumenta la media del peso húmedo de bulbo en comparación con el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). El tratamiento con *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A1) y *P. eucalypti* (P1A4) a pesar de no presentar diferencias significativas con el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1), se observa que aumentan el peso húmedo de bulbo sobre CP1, contrario a lo obtenido aplicando *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2) y el consorcio antagonista (P1CA) de los cuales la media disminuye.



**Figura 12. Evaluación del peso húmedo de bulbo para tratamientos con *Erwinia* sp. 27 días después de la aplicación. a) Control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). b) Tratamiento con *Enterobacter* sp. aplicado a plantas infectadas con *Erwinia* sp. (P1A3).**

#### **5.6.2.4. Peso seco de bulbo**

El análisis de varianza para peso seco de bulbo de tratamientos utilizando *Erwinia* sp. no mostró diferencia significativa en los tratamientos. Sin embargo, en la Gráfica 12 se comparan las medias de peso seco de bulbo, y se observan tendencias similares al análisis de peso húmedo de bulbo.

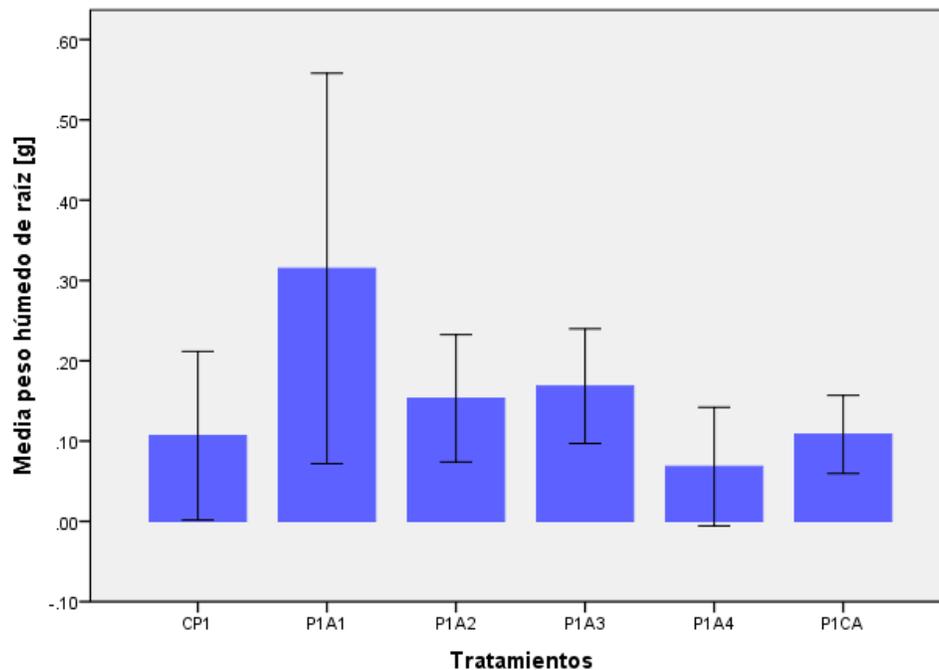


**Gráfica 7. Comparación de medias del peso seco de bulbo entre el control positivo de *Erwinia* sp. y los tratamientos con antagonicos.** La aplicación del antagonico *Enterobacter* sp. (P1A3) presenta una tendencia en aumento de la media del peso seco en comparación con el control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). El tratamiento con *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2), *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) y *P. eucalypti* (P1A4) no presentan variación respecto control positivo de *Erwinia* sp. (CP1), por el contrario, el tratamiento con el consorcio antagonico (P1CA) disminuye el peso seco en comparación al control positivo de *Erwinia* sp.

#### 5.6.2.5. Peso húmedo de raíz

El Anova realizado a tratamientos con *Erwinia* sp. como patógeno no indicó diferencia significativa entre los ensayos. En la Gráfica 15 se muestra que la cepa de *S. plymuthica* aislada de bulbo tiende a aumentar el peso de raíz húmedo a diferencia del control positivo de *Erwinia* sp.

Además, se observa que el aumento de masa en raíz por parte de las plantas tratadas con *S. plymuthica* supera hasta un 60% al control positivo de *Erwinia* sp. Esta característica se observa fenotípicamente en la Figura 13.



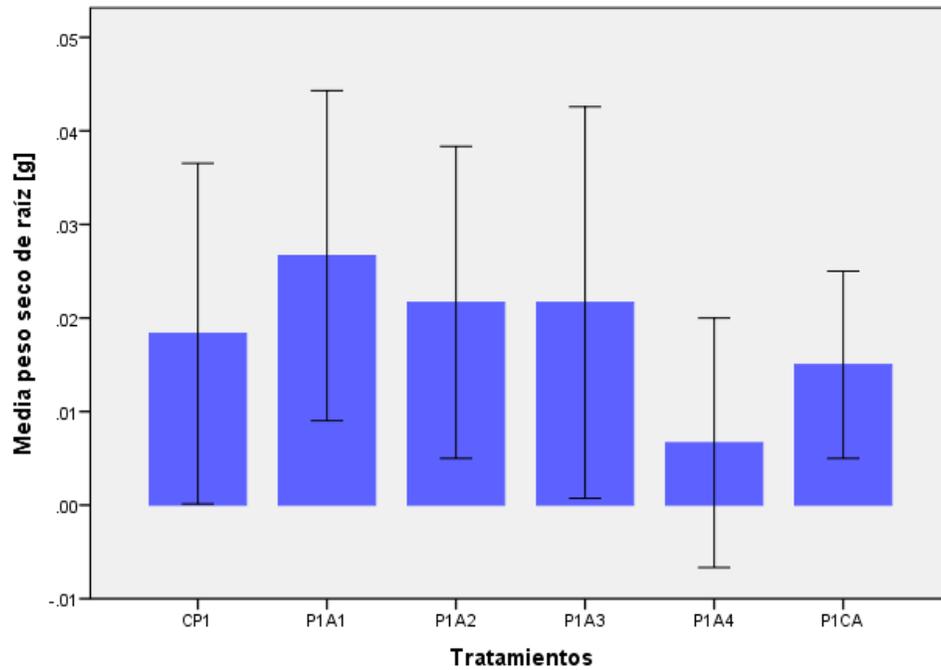
**Gráfica 8. Comparación de medias del peso húmedo de raíz entre los tratamientos con *Erwinia* sp.** El tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) muestra tendencia de aumento en el peso húmedo de raíz en comparación con el control positivo de *Erwinia* sp. (CP2), por el contrario, los ensayos con *S. plymuthica* aislada de hoja (P1A2), *Enterobacter* sp. (P1A3), *P. eucalypti* (P1A4) y el consorcio antagónico (P1CA) se comportan similar al control positivo del patógeno (CP1).



**Figura 13. Raíz de cebolla 27 días después de la aplicación de los tratamientos para *Erwinia* sp. a) Control positivo de *Erwinia* sp. (CP1). b) Tratamiento de *S. plymuthica* aislado de bulbo a plantas infectadas con *Erwinia* sp. (P1A1).**

#### **5.6.2.6. Peso seco de raíz**

El análisis de varianza realizado a tratamientos con *Erwinia* sp. como patógeno indican que los tratamientos se son similares. La gráfica 9 muestra la misma tendencia observada en la Gráfica 8, el tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo tiende a aumentar el peso de raíz húmedo a diferencia del control positivo de *Erwinia* sp.



**Gráfica 9. Comparación de medias del peso seco de raíz entre los tratamientos con *Erwinia* sp.** El tratamiento con *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) y de hoja (P1A2), *Enterobacter* sp. (P1A3), *P. eucalypti* (P1A4) y el consorcio antagonico (P1CA) se comportan similar al control positivo del *Erwinia* sp. (CP1).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas

Del total de aislados bacterianos, se seleccionaron 61 cepas para analizar en base a la morfología colonial, microscópica y sensibilidad a antibiogramas. De éstas, 32 resultaron ser Gram negativas (52.4%) y 29 fueron Gram positivas (47%). Acorde con los datos obtenidos, Achari y colaboradores (2014) observaron que las bacterias predominantes en los aislados de xilema de chile y berenjena, el 59.28% fueron Gram negativas. El número de bacterias endófitas obtenidas de raíz fue menor a las obtenidas de bulbo y hoja, contrario a lo observado por Fatima y colaboradores (2015), quienes reportaron que en la raíz de plantas tolerantes a hidrocarburos existe una mayor diversidad de bacterias endófitas a diferencia de las obtenidas de tallo.

Los 61 aislados obtenidos fueron sometidos a pruebas para determinar cuáles de éstos eran patógenos y cuales antagónicos. Para la selección de las cepas patógenas, se utilizaron plantas de tabaco que presentan una rápida respuesta de hipersensibilidad al contacto con un patógeno. Debido a lo reportado por Klement y colaboradores (1967) quienes describieron que algunas bacterias fitopatógenas no causan esta reacción, se realizaron otras pruebas. Sabiendo que algunas bacterias patógenas pueden tener una actividad proteolítica, capaces de ablandar y romper el tejido vegetal, se utilizó un segundo sistema de sensibilidad realizando inóculos en rodajas de papa (Brathwaite, 1989). En base a estas pruebas el 27.8% de los aislados bacterianos se consideraron patógenas, y para confirmar su efecto en cebolla, éstas fueron inoculados en hojas y rodajas de bulbo, observando que sólo el 8.1% del total de aislados provocaron reacciones en estos sistemas. Posteriormente, estos últimos aislados fueron utilizados para la búsqueda de microorganismos antagónicos a través de pruebas *in vitro*.

Previo a las pruebas para identificar potenciales bacterias antagónicas, los aislados fueron sometidos a diversas pruebas para determinar la capacidad de promoción de crecimiento, como un estudio complementario. Rachel y asociados (2014) observaron que algunos aislados bacterianos de hoja de *Anacardium occidentale* que presentaron actividad como promotoras de crecimiento también fueron capaces de antagonizar a hongos fitopatógenos, un fenómeno también reportado por Berg (2005) al utilizar bacterias endófitas aisladas de papa y enfrentarlas a *Verticillium dahliae* y *Rhizoctonia solani*.

El 72.2% de los aislados que no presentaron virulencia en las pruebas de fitopatogenicidad, fueron sometidos a pruebas para caracterizar su posible actividad como promotoras de crecimiento, en base a la prueba sugerida por Akhgar (2014), el cual define que las bacterias que son capaces de utilizar el ACC como fuente de nitrógeno son consideradas como bacterias promotoras de crecimiento. En este sentido, se observó que las cepas aisladas de raíz presentaron el mayor crecimiento en el medio de cultivo con ACC, y el menor en los aislados que provenían de bulbo y hoja. Los microorganismos promotores de crecimiento presentan generalmente más de una vía para realizar este efecto, como reportó Akhgar y colaboradores (2014), quienes observaron la presencia de bacterias productoras de la enzima ACC desaminasa en raíz de *Brassica napus* L. y que además fueron positivas para la producción de ácido indolacético, el cual es conocido como un compuesto con actividad para estimular el desarrollo de la raíz (Glick, 2012).

Otra de las características de algunas bacterias para ser consideradas promotoras de crecimiento es la capacidad de éstas para mejorar el estatus nutricional de la planta. Uno de los elementos que se puede mejorar en las plantas es el hierro. Esto puede ser debido a que algunas bacterias son capaces de producir moléculas con alta afinidad al  $Fe^{+3}$  llamadas sideróforos. El complejo Fe-sideróforo puede ser utilizado por las plantas facilitando así la adquisición del hierro presente en el ambiente (Glick, 2012). En este trabajo se determinó la producción de sideróforos a

través de la detección de un halo en el medio de CAS, así las cepas que presentaron un mayor halo fueron en su mayoría obtenidas de bulbo, seguidos de raíz y hoja. En microorganismos endófitos, la producción de estos compuestos facilita el transporte de  $Fe^{3+}$  dentro de la planta y contribuye a su crecimiento. Este fenómeno ha sido observado también en bacterias endófitas aisladas de *Mussaenda roxburghii* por Pandey y colaboradores (2015), utilizando el mismo medio de detección.

Adicionalmente a esto, otra característica importante en la promoción de crecimiento se adjudica a la solubilización de fósforo (Glick, 2012). Por lo que se determinó esta capacidad en los aislados y se observó que las obtenidas de hoja y bulbo presentaron un puntaje mayor a 3 en la evaluación de solubilización de fosfatos, como se aprecia en la Tabla 7 de la sección de Resultados. La búsqueda de bacterias solubilizadoras de fosfatos se ha realizado en su mayoría en aislados de rizósfera, sin embargo, Rachel y colaboradores (2014) describieron bacterias endófitas aisladas de hojas de *Anacardium occidentale* con la capacidad de solubilizar altas concentraciones de fósforo y que presentan características de promoción de crecimiento en planta.

La fijación de nitrógeno es otro de los mecanismos estudiados, por el cual las bacterias promotoras de crecimiento proveen de nutrientes a la planta. Para la identificación de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno, se utilizó el medio semisólido libre de nitrógeno (medio NFB) para evaluar el crecimiento de los aislados bacterianos (Glick, 2012). Los resultados mostraron que el 21.3% de los aislados de bulbo y el 21.3% de los obtenidos de hoja fueron capaces de crecer en este medio, mientras que el 19.6% de los aislados de raíz presentaron esta capacidad. La presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en hojas, tallo y raíz ha sido observada también por Hongrittipun y colaboradores (2014) en plantas de arroz. Asociado a la cita anterior, Elbeltagy y colaboradores (2001) reportaron que la bacteria fijadora de nitrógeno *Herbaspirillum* sp. fue capaz de colonizar plántulas

y semillas de arroz, y en plantas adultas se determinó su presencia en hoja, tallo y raíz.

Durante los ensayos para evaluar promoción de crecimiento, las bacterias endófitas aisladas de los diferentes órganos de cebolla y cebollín presentaron respuestas similares. Resultaría interesante estudiar las bacterias endófitas de otras especies pertenecientes al género *Allium*, para determinar si es una característica compartida dentro de este género.

## **6.2. Pruebas de antagonismo**

Durante los ensayos de antagonismo *in vitro* se utilizaron 44 cepas no patógenas para probar su efecto antagónico contra 9 cepas patógenas. Se observó una variación de la capacidad antagónica de los aislados dependiendo del microambiente del que fueron obtenidos, 22 cepas aisladas de bulbo y hoja presentaron actividad antagonista en contraste a 3 cepas de la raíz. Similar a estos resultados, Berg y colaboradores (2005) reportaron que la incidencia de bacterias antagonistas a *Verticillium dahliae* y *Rhizoctonia solani* varía dependiendo del microambiente del cual fueron obtenidas en plantas de papa. Las cepas *Serratia plymuthica* (antagónico 1) y *Pantoea eucalypti* (antagónico 4) aisladas de bulbo, y *S. plymuthica* (antagónico 2) y *Enterobacter* sp. (antagónico 3) aisladas de hoja, presentaron los mejores resultados de inhibición de las bacterias patógenas en las dos técnicas utilizadas, microgota en doble capa de agar y enfrentamiento directo, y fueron utilizadas para los ensayos *in vivo* como se indicó en la Tabla 10 de la sección de resultados.

Se seleccionaron las dos bacterias patógenas más virulentas obtenidas de los cuatro sistemas, una de estas fue la cepa *Erwinia* sp. aislada de hoja y utilizada

como patógeno 1 durante los ensayos en invernadero. Como se muestra en la gráfica 1, en la escala de severidad el control positivo de esta cepa provocó en la planta una mayor sintomatología reflejada en el daño en hoja e indicando que la infección por este patógeno afecta principalmente a la hoja de cebolla.

A pesar de que en las pruebas *in vitro* no se observó inhibición por parte de *S. plymuthica*, en el ensayo en invernadero al analizar la escala de severidad y el peso húmedo y seco de hoja, se notó que para plantas infectadas con *Erwinia* sp. y tratadas con *S. plymuthica* aislada de bulbo (P1A1) presentó una disminución de la severidad y aumento en masa de hoja con diferencia significativa en comparación al control positivo de *Erwinia* sp. (patógeno 1). Estos resultados mostrados en las gráficas 1, 3 y 5, demuestran que la aplicación de *S. plymuthica* aislada de bulbo disminuyó la incidencia de la enfermedad y además sugieren un efecto sobre el crecimiento de la planta. En el caso de *S. plymuthica* aislada de hoja, al aplicar esta cepa como tratamiento para *Erwinia* sp. no presentó diferencia significativa con el control positivo del patógeno, sin embargo, se observó que la media de los datos en la escala de severidad presenta la tendencia de ser beneficiada, como se observa en la gráfica 1. Kurze y colaboradores (2001) reportaron resultados similares al aplicar una cepa *S. plymuthica* en plantas de fresa, lo cual reveló un aumento en peso tanto en hoja como en raíz. Los aislados de *S. plymuthica* de bulbo y hoja presentaron respuestas diferentes al ser evaluadas para control biológico en las pruebas en invernadero. Esta característica fue encontrada por Berg y colaboradores (2005), quienes observaron que bacterias de la misma especie pueden presentar diferencias al habitar en microambientes distintos. El uso de bacterias antagonicas como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos ha sido ampliamente estudiado en años recientes. Benhamou y colaboradores (1999) ha reportado una cepa de *S. plymuthica* capaz de disminuir la incidencia de enfermedad en pepino causada por *Phytophthora ultimum*. El rango de microorganismos que *S. plymuthica* es capaz de antagonizar incluye en su mayoría hongos fitopatógenos, sin embargo, Dandurishvili y colaboradores (2010) encontraron que

esta bacteria es capaz de disminuir la incidencia de tumores en plantas de tomate infectadas con *Agrobacterium tumefaciens* y *A. vitis*. A pesar de que el género *Erwinia* comprende una gran cantidad de especies fitopatógenas presentes en todo el mundo, existen pocos estudios que reporten agentes de biocontrol contra esta bacteria. Dong y colaboradores (2004) realizaron experimentos que mostraron una cepa de *Bacillus thuringiensis* capaz de reducir la virulencia de *E. carotovora* interrumpiendo la señalización *quorum sensing*, y disminuyendo la incidencia de la enfermedad en papa. Otros estudios reportan una cepa de *Pantoea agglomerans* (Gerami *et al.*, 2011) y otra de *Bacillus* sp. (Rahman *et al.*, 2012) capaces de disminuir la enfermedad del fuego bacteriano causado por *E. amylovora* en árboles de pera. En cebolla, Abdallah y colaboradores (2013) han descrito el uso de *Streptomyces coelicolor* para control de bacterias causantes de la pudrición *E. carotovora* subsp. *carotovora* y *Burkholderia cepacia*. Sin embargo, el presente proyecto es el primero en describir una cepa de *S. plymuthica* capaz de antagonizar a *Erwinia* sp. en cebolla.

La bacteria *Bacillus* sp. respondió positivo a los ensayos de pudrición en papa, respuesta en rodaja y en hoja de cebolla, e inicialmente se utilizó como patógeno 2. Sin embargo, los resultados obtenidos en la escala de severidad indican que el control positivo de *Bacillus* sp. se encuentra por debajo del nivel 3 de la incidencia de la enfermedad (Gráfica 2). Al analizar el peso húmedo de hoja, la media del control positivo de *Bacillus* sp. se encuentra por encima de la media del control positivo de *Erwinia* sp. (Gráfica 3 y 4), lo cual sugiere que la cepa *Bacillus* sp. no logró infectar las plantas de cebolla en ensayos de invernadero. A pesar de que esta cepa se clasificó como patógena, se realizaron pruebas para caracterización de bacterias promotoras de crecimiento, resultando positiva para crecimiento en medio con ACC y para producción de sideróforos, como se muestra en las tablas 6 y 7 en la sección de resultados. Acorde a las observaciones anteriores, algunos estudios realizados por Chen y colaboradores (2007) muestran que especies pertenecientes

al género *Bacillus* son capaces de estimular el crecimiento en plantas y además producir metabolitos secundarios.

En el análisis del peso húmedo y seco de bulbo, los resultados obtenidos 27 días después del tratamiento no fueron favorables para ningún antagonico aplicado. Referente a los resultados obtenidos, Karthikeyan y colaboradores (2008) indican que al utilizar un consorcio formado por *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viride* aplicado a cebolla observaron un aumento en la altura de las hojas y posterior al tiempo de cosecha, la producción de bulbo aumentó en comparación al control. Por lo que, se considera que el tiempo en el que se debe evaluar el peso de bulbo debe ser al obtenerse la madurez de la planta.

### **6.3. Identificación de los microorganismos patógenos**

En el ensayo de invernadero, el control positivo del patógeno 1 identificado como *Erwinia* sp. mostró languidez y marchitez en las hojas similares a los observados en campo. En nuestro país, las principales especies del género *Erwinia* que afectan los cultivos de cebolla son *E. chrysantemi* y *E. carotovora* subs. *carotovora*, que se caracterizan por provocar pudrición en bulbo. Sin embargo, se han registrado casos en otros países de infecciones causadas por *E. persicina* en ajo (Gálvez *et al.*, 2015), *E. ananatis* y *Pantoea agglomerans* en cebolla, de las cuales los principales síntomas son lesiones acuosas en hoja, seguido de marchitez foliar y pudrición en bulbo (Yañez *et al.*, 2003; INIFAP, 2010), similar a la sintomatología que mostraron las plantas enfermas en nuestro ensayo.

El patógeno 2 aislado de raíz fue identificado como *Bacillus* sp. se caracterizó como bacteria fitopatogena y durante los ensayos en invernadero, se observó que no presentó virulencia y que al ser inoculada con el consorcio antagonico formado por

*S. plymuthica*, *Enterobacter* sp. y *Pantoea eucalypti* indujo en la planta el aumento en peso de la hoja. El número de especies de bacterias fitopatógenas Gram positivas es muy reducido, una de las más importantes por las pérdidas que genera a nivel mundial es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que afecta principalmente al tomate (Gartemann *et al.*, 2003). A pesar de los diversos estudios que existen sobre bacterias patógenas, nuestro trabajo es el primero en reportar una posible actividad patógena de una cepa de *Bacillus* sp. en cebolla, sin embargo, aún falta confirmar su virulencia.

## 7. CONCLUSIONES

1. De las 61 bacterias endófitas aisladas de cebolla y cebollín, 37 cepas presentan respuesta positiva una o más pruebas *in vitro* características de bacterias promotoras de crecimiento.
2. Se identificaron 6 cepas utilizadas en los ensayos *in vivo* en cebolla, de las cuales cuatro presentaron características antagonistas *in vitro*: dos aislados de *Serratia plymuthica* encontradas en hoja y bulbo, *Enterobacter* sp. y *Pantoea eucalypti*; una patógena: *Erwinia* sp., y una potencial patógena: *Bacillus* sp.
3. En las pruebas *in vivo* en cebolla, la cepa antagonista *S. plymuthica* presenta actividad antagonista contra el patógeno *Erwinia* sp., e incluso promovió el crecimiento de las plantas infectadas.
4. La bacteria *Erwinia* sp. es el agente causal de la enfermedad de languidez y marchitez de hoja de cebolla.

## 8. PERSPECTIVAS

- Identificar la especie de *Erwinia* sp. causante de la enfermedad de marchitez y languidez de hoja de cebolla, y la especie de *Enterobacter* sp. utilizada como antagonico 3.
- Identificar y evaluar *in vivo* las cepas aisladas que presentan respuesta positiva en las pruebas de promoción de crecimiento.
- Probar con un mayor número de repeticiones si la tendencia observada al inocular *Bacillus* sp. y el consorcio antagonico presenta diferencias significativas.
- Probar el efecto antagonico de *S. plymuthica* aislada de bulbo y hoja, *Enterobacter* sp. y *P. eucalypti* contra otras bacterias fitopatógenas de la colección del laboratorio de Bioquímica Ecológica.
- Evaluar el efecto antagonico de *S. plymuthica* para enfermedades bacterianas presentes en ajo y puerro.

## 9. REFERENCIAS CITADAS

- Vorholt, Julia A., 2012. Review: Microbial life in the Phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology* 10, 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910.
- Partida, Laila P., Heil, Martin. 2011. The microbe-free plant: fact of artifact?. *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2011.00100.
- Bashan, Yoav; Holguin, Gina. 1997. Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem*,1225-1228.
- Glick, Bernard R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica Hindawi Publishing Corporation. doi:10.6064/2012/963401.
- Rodríguez, Hilda. Fraga, Reynaldo. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2
- Arcand, Melissa M., Schneider. 2006. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. doi:10.1590/S0001-37652006000400013
- Vansuyt, Gerard, *et al.* 2006. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*. doi:10.1094/MPMI-20-4-0441.
- Van de Poel, Bram; Van Der Straeten, Dominique. 2014. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene!. *Frontiers in plant science*. Doi:10.3389/fpls.2014.00640.
- Cocking, Edward C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*. Doi:10.1023/A:1024106605806
- Lim, Ho-Seong, *et al.*, 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agen of Plant Root Rot. *Applied and environmental microbiology*.
- Compant *et al.*, 2005. Use of Plant Grothw-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and enviromental microbiology*. DOI: 10.1128/AEM.71.9.4951.

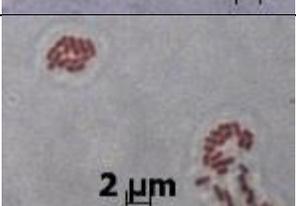
- Lodewyckx *et al.*, 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. DOI: 10.1080/0735-260291044377.
- Dong *et al.*, 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI:10.1128/AEM.70.2.954-960.2004
- Enya *et al.*, 2007. Culturable leaf associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. DOI: 10.1007/s00248-006-9085-1.
- Loon *et al.*, 1998. Systemic resistance induced. *Plant Ecology*.
- Dangl, J.; Jones, 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*.
- Fritsch *et al.*, 2002. Evolution, domestication and taxonomy. *Allium Crop Science: Recent Advances*.
- Reiter *et al.*, 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI:10.1128/AEM.68.5.2261
- Karthikeyan *et al.*, 2008. Biological control of onion leaf blight disease by bulb and foliar application of powder formulation of antagonist mixture. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. DOI:10.1080/03235400600813474
- Abdallah *et al.*, 2013. Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI:10.1080/03235408.2013.778451
- Gitaitis *et al.* 1997. First Report of a Leaf Blight, Seed Stalk Rot, and Bulb Decay of Onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *The American Phytopathological Society*. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.9.1096C
- Roumagnac *et al.* 2000. Detection of *Xanthomonas* sp., the Causal Agent of Onion Bacterial Blight, in Onion Seeds Using a Newly Developed Semi-selective Isolation Medium. *European Journal of Plant Pathology*. DOI:10.1023/A:1008743120242
- Frank *et al.*, 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*. DOI:10.1128/AEM.02272-07

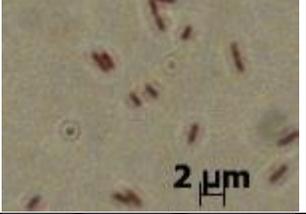
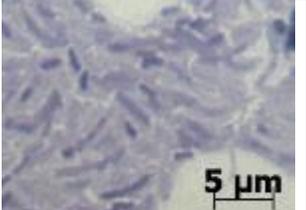
- Klement, Z.; Goodman, R.; 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. DOI:10.1146/annurev.py.05.090167.000313
- Fatima *et al.*, 2015. Bacterial Rhizosphere and Endosphere Populations Associated with Grasses and Trees to be Used for Phytoremediation of Crude Oil Contaminated Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. DOI: 10.1007/s00128-015-1489-5
- Brathwaite *et al.*, 1989. Guidelines for the identification and diagnosis of damage in crop plants caused by insects, diseases, weeds and nutrient disorders. IICA
- Rachel *et al.*, 2014. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from cashew leaves. African Journal of Biotechnology. DOI:10.5897/AJB2014.13835
- Akhgar *et al.*, 2014. Characterization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase-Containing *Pseudomonas* spp. in the Rhizosphere of Salt-Stressed Canola. Pedosphere. DOI:10.1016/S1002-0160(14)60032-1
- Panday *et al.*, 2015. Plant Beneficial Endophytic Bacteria from the Ethnomedicinal *Mussaenda roxburghii* ( Akshap ) of Eastern Himalayan Province , India. Hindawi Publishing Corporation. DOI: 10.1155/2015/580510
- Hongrittipun *et al.*, 2014. Screening of nitrogen fixing endophytic bacteria in *Oryza sativa* L.. Journal of Agricultural Science. DOI:10.5539/jas.v6n6p66
- Elbeltagy *et al.*, 2001. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp . isolated from wild rice species endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Applied and environmental microbiology. DOI:10.1128/AEM.67.11.5285
- Kurze *et al.*, 2001. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. Plant disease. DOI:10.1094/PDIS.2001.85.5.529
- Chen *et al.*, 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nature biotechnology. DOI: 10.1038/nbt1325.

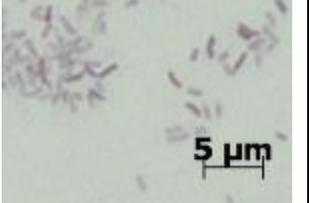
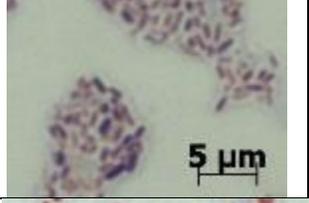
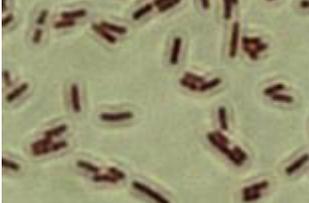
- Berg *et al.*, 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS microbiology ecology. DOI:10.1016/j.femsec.2004.08.006.
- Benhamou *et al.*, 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. Phytopathology. DOI:10.1094/PHYTO.2000.90.1.45
- Dandurishvili *et al.*, 2010. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. Journal of Applied Microbiology. DOI:10.1111/j.1365-2672.2010.04891.x
- Gálvez *et al.*, 2015. First Report of a Garlic Bulb Rot Caused by *Erwinia persicina* in Europe. APS Journals. DOI: 10.1094/PDIS-11-14-1195-PDN
- Yáñez *et al.*, 2003. *Erwinia chrysanthemii*, *Burckholder*, Mc Fadden and Dimock and other Phyto bacteria Causal Agents of Onion (*Allium cepa* L.) Bulb Decay and their Detection. Revista Mexicana de Fitopatología. ISSN:0185-3309.
- Gartemann *et al.*, 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of Biotechnology. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.011
- Gerami, E., *et al.*, 2011. Biological control of fire blight disease *Erwinia amylovora* under field condition of Karaj, Iran. American Phytopathology Society.
- Rahman, *et al.*, 2012. Isolation, Characterization, and Identification of Biological Control Agent for Potato Soft Rot in Bangladesh. The ScientificWorld Journal. DOI:10.1100/2012/723293

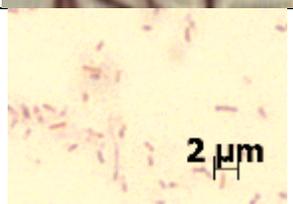
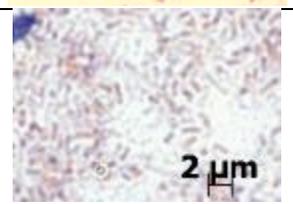
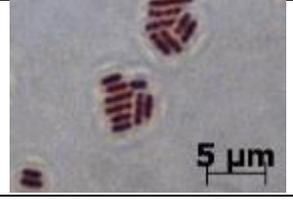
## APÉNDICE I

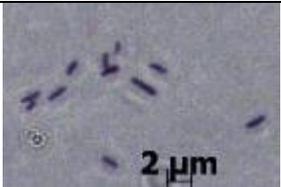
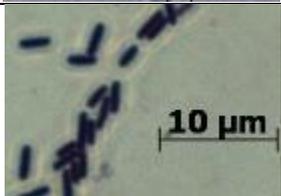
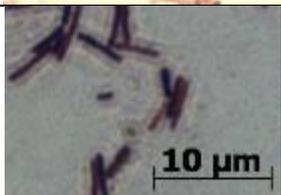
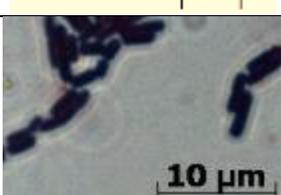
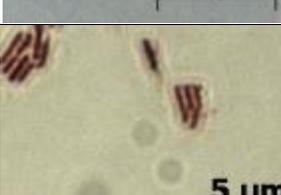
Tabla I. Descripción de la morfología colonial de bacterias aisladas de cebolla utilizadas durante todo el desarrollo del proyecto

CEPAS	DESCRIPCIÓN COLONIA	TINCIÓN GRAM	FOTOGRAFÍA
M3BAa	Mediana, forma redonda, borde completo, superficie lisa, luz transmitida opaco, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia mucosa.	Gram – Bacilos	
<i>Serratia plymuthica</i>		Gram – Bacilos	
M3BAc	Pequeña, forma redonda, borde completo, elevación convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3FAb		Gram – Bacilos	
M3BBa	Mediana, forma circular, borde entero, convexo, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3Beda			

M3BEdb	Grande, forma circular, borde entero, convexo, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda, fluorescencia.	Gram – Bacilos	
M3BCa	Grande, forma redonda, borde completo, elevación umbonada, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia mucosa	Gram – Bacilos	
M3Bda	Grande, forma redonda, borde entero, elevación convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla (fluorescente), consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M3BGb	Mediana, forma circular, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram+ Bacilos	
M3BHa	Mediana, forma circular, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3BHb	Pequeña, forma circular, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram+ Bacilos	
M3Fde		Gram – Bacilos	
M3Bia	Mediana, forma redonda, borde aserrado, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda, fluorescente.	Gram + Bacilos	

M3Bic	Mediana, forma redonda, borde aserrado, umbonada, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, blanco, consistencia blanda	Gram – Bacilos	
<i>P. eucalypti</i>	Grande, forma redonda, borde completo, convexa, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia mucosa.	Gram – Bacilos	
<i>Enterobacter</i> sp.	Mediana, forma redonda, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia mucosa.	Gram – Bacilos	
<i>S. plymuthica</i>	Grande, forma redonda, borde completo, elevación alta, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
<i>Erwinia</i> sp.			
M3FCa			
M3FBi	Mediana, forma redonda, borde completo, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3FDa		Gram – Bacilos	

M3FDb	Mediana, forma redonda, borde completo, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3FEe			
M3Fdi	Grande, forma redondo, borde aserrado, plana, luz transmitida opaca, luz reflejada opaca, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M3Fed	Grande, forma irregular, borde aserrado, convexa, luz transmitida opaca, luz reflejada opaca, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia mucosa.	Gram – Bacilos	
M3FGd	Mediana, forma redonda, borde completo, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3FGf	Mediana, forma redonda, borde completo, elevación convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3Fia	Mediana, forma irregular, borde aserrado, convexa, luz transmitida opaca, luz reflejada, brillante, superficie rugosa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3Rea			

M3RBb	Mediana, forma irregular, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada, brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3REd	Pequeña, forma redonda, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M3Rfa	Pequeña, forma irregular, borde entero, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla pálida, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3RGa	Pequeña, forma irregular, borde entero, plano, luz transmitida transparente, luz reflejada opaca, superficie lisa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M3RGb	Grande, forma irregular, borde aserrado, umbonada, luz transmitida transparente, luz reflejada, brillante, superficie rugosa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3RIb	Mediana, forma redonda, borde completo, plana, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3RBc	Mediana, forma irregular, borde aserrado, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M3BCd	Grande, forma irregular, borde ondulado, plana, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto húmedo, blanca, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	

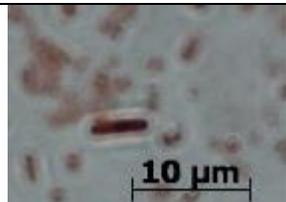
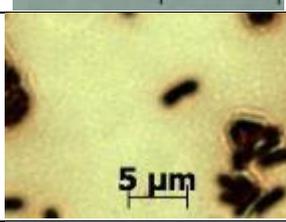
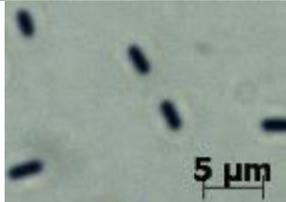
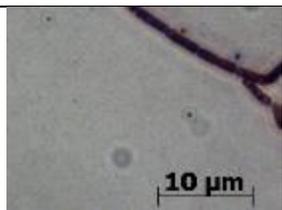
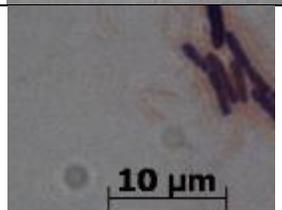
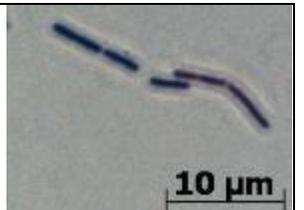
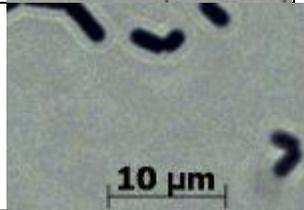
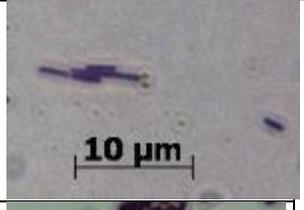
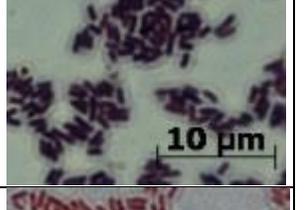
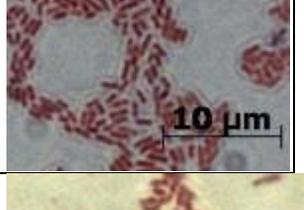
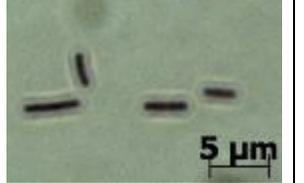
M3Fja	Mediana, forma circular, borde entero, plana, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto seco, amarilla, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M3REe	Grande, forma circular, borde aserrado, plana, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto seco, blanco, consistencia blanda	Gram + Bacilos	
M3REf	Grande, forma circular, borde entero, elevación convexa, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia mucosa.	Gram + Bacilos	
<i>Bacillus</i> sp.	Grande, forma irregular, borde entero, superficie convexa, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, aspecto mucoso.	Gram + Bacilos	
M3RGf	Chica, forma circular, borde aserrado, elevación convexa, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	

Tabla II. Descripción de la morfología colonial de bacterias aisladas de cebollín utilizadas durante todo el desarrollo del proyecto

CEPA	MORFOLOGÍA COLONIAL	TINCIÓN GRAM	FOTOGRAFÍA
M2FCa	Grande, forma irregular, borde ondulado, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, blanco, consistencia blanda.	*Gram – Bacilos	
M2FEc	Mediana, forma redonda, borde aserrado, plana, luz transmitida opaca, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	

M2FEf	Grande, forma irregular, borde aserrado, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram+ Bacilos	
M2RDa			
M2Ffe	Pequeña, forma redonda, borde completo, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M2FGb	Mediana, forma circular, borde entero, superficie convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, aspecto húmedo, amarilla, consistencia mucosa.	Gram+ Bacilos	
M2FGc		Gram – Bacilos	
M2FGd	Pequeña, forma redonda, borde entero, convexa, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, aspecto húmedo, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	
M2Fid	Mediana, forma circular, borde ondulado, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M2RCa	Chica, forma circular, borde entero, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto seco, sin color, consistencia blanda.	Gram – Bacilos	

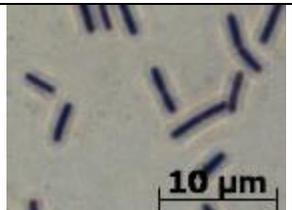
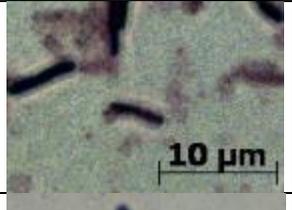
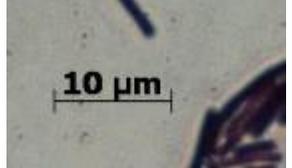
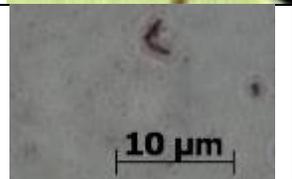
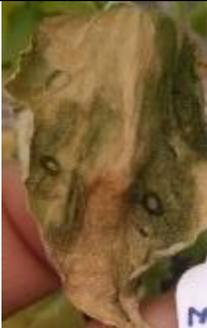
M2RHb		Gram+ Bacilos	
M2RHc	Pequeña, irregular, entero, plana, luz transmitida transparente, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, sin color, consistencia blanda	Gram - Bacilos	
M2RIa	Mediana, forma circular, borde aserrado, elevación plana, luz transmitida transparente, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M2RJb	Mediana, forma circular, borde aserrado, elevación plana, luz transmitida transparente, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, amarillo pálido, consistencia blanda.	Gram+ Bacilos	
M2RJb	Grande, forma circular, borde aserrado, elevación convexa, luz transmitida opaca, luz reflejada brillante, superficie lisa, aspecto húmedo, amarillo, consistencia blanda.	Gram+ Bacilos	
M2Fbac	Grande, forma redonda, borde aserrado, plana, luz reflejada brillante, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	
M2FFh	Grande, forma irregular, borde filamentososo, plana, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, blanca, consistencia blanda.	Gram - Bacilos	
M2RBd	Grande, forma irregular, borde aserrado, plana, luz reflejada mate, superficie rugosa, aspecto seco, amarilla, consistencia blanda.	Gram + Bacilos	

Tabla III. Resultado de los antibiogramas realizados a las cepas que presentaron similitud en la descripción morfológica y en tinción de Gram.

CEPA	AK	AM	CF	CRO	CL	DC	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
M3FAB1	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S
M3FAB2	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S
M3BAC1	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
M3BAC2	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S
M3FDB1	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FDB2	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FEE1	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S
M3FEE3	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S
M3FCC1	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FCC2	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I
M3FBG1	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FBG2	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FCA1	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FCA2	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3BAB1	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	I
M3BAB2	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	I
M3BAA1	S	R	R	I	S	R	S	R	S	S	R	S
M3BAA2	S	R	R	I	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FBI1	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3FBI2	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	I
M3FDA1	S	R	R	I	S	R	R	R	R	S	R	R
M3FDA3	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
M3FIA1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
M3FIA2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S
M3REA1	S	S	S	I	S	R	R	I	S	S	S	R
M3REA2	S	I	S	I	S	R	R	I	S	I	S	R
M3BBA1	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3BBA2	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S
M3BEDA1	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
M3BEDA2	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R
M2RCA1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
M2RCA2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
M2RHB1	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
M2RHB3	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S

\*R= resistente; S=susceptible; I= indeterminado

Tabla IV. Pruebas de patogenicidad realizadas a las 9 cepas seleccionadas para las pruebas antagónicas in vitro.

Cepa	Pudrición en papa	Hipersensibilid ad en tabaco	Rodaja de cebolla	Hoja de cebolla
M3BEdb		-		-
<i>Erwinia</i> sp.				
M3FGd		-	+	++
M3Fia		-	+	++
M3REd		-	++	-

M3RIb		-	++++	+
M3REf		-	++	++
<i>Bacillus</i> sp.		-		
M3RGf		-	+++	-

Tabla V. Resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo *in vitro*

Antagónico		M3BAa		M3BHb		M3BEda		M3BAc		M3Bia		M3FBi		M3FEe		M3RFa		S. <i>plymuthica</i>		M3BBa		
Patógeno	Prueba	MG	EF	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	
	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	+++++	++	-	-
	M3Fia	-	-	+	+	++	+	++	+++	-	++++	-	-	-	++	-	+	-	+	-	+	
	M3BEdb	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
	<i>Erwinia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3REf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3RGf	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-	-?	-	++	-	++	-	-	
	M3FGd	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	M3REd	+++	+	-	-?	-	++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-?	-	-
	M3Rib	-	++	-	++	-	-?	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-?
Antagónico		M3BDa		M3BGb		M3BJa		<i>Enterobacter</i> sp.		<i>S. plymuthica</i>		M3FCa		M3FDa		M3FDb		M3FDe		M3FDi		
Patógeno	Prueba	MG	EF	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	
	<i>Bacillus</i> sp.	++++	+	+	-	++	++	+++	++++	+++++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M3Fia	-	-	-	-?	-	-	-	-?	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M3BEdb	-	-?	-	-	++++	-?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Erwinia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M3REf	-	-	+++++	-?	+++++	-?	+++++	++	+++++	-?	+++	-?	+++	-?	+++	++	-	+	-	-	
	M3RGf	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+++	+	-	-	+	-	+	-	-		
	M3FGd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M3REd	-	+	-	-	-	-	-	-?	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M3Rib	-	+	-	-?	-	-	-	-?	+++	++	-	-?	-	-	-	-?	-	+	-	+	

Antagónico		M3RBb		M3RBc		M3FGf		M3FAb		M2Rla		M2RJa	
Patógeno	Prueba	MG	EF	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED	MG	ED
	M3RGe pat2	++++	+R	-	-	+++	-?	+++	+++	-	-	-	-
	M3Fia	-	-		++	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3BEdb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3FCc pat1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M3REf	-	-?	-	+	++	+	-	-?	-	-	-	-
	M3RGf	-	+?		+?	+	++	-	-	-	-	-	-
	M3FGd	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	M3REd	-	-		r	-	r	-	+?	-	-	-	-
	M3Rib	-	-		-?	-	-?	-	+?	-	-	-	-
Antagónico		M3BCa		M2FGb		M2FGd		M2FBac		M2FGc			
Patógeno	MG	MG	ED	ED	MG	ED	MG	ED	ED	MG	ED		
	-	-	-	++	-	-	-	++	+++	-	-		
	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-		
	-	-	-	+	-	++	-	+	-	-	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	-	+++++	++	-	-	-	-	-	-?	-	-		
	-	++++	++	-	-	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		
	-	-	+?	-	-	-	-	-	+?	-	-		
	-	-	++	-	-	-	-	-	+?	-	-		

\*MG=micro gota en doble capa de agar; ED= enfrentamiento directo

Tabla VI. Bacterias aisladas de bulbo. Determinación de la capacidad de aislados de bulbo como promotoras de crecimiento y respuesta a pruebas de patogenicidad.

CEPA	NBRIP	ACC	NFB	Sideróforos	Pudrición en papa	Hipersensibilidad en tabaco	Cebolla
M3BAa	3	2	+	5	-	-	-
<i>S. plymuthica</i>	-	4	-	3	-	-	-
M3BAc	5	2	+	4	-	-	-
M3BBa	5	-	+	-	-	-	-
M3BCa	-	2	+	-	-	-	-
M3Bda	1	1	+	5	-	-	-
M3Beda	2	3	+	3	-	-	-
M3BEDb	-	1	+	1	+	-	+++
M3BGb	5	-	+	1	-	-	-
M3BHa	-	-	+	-	-	-	-
M3BHb	4	2	+	4	-	-	-
M3BIa	3	1	+	4	-	-	-
M3BIc	-	-	-	1	+	-	-
<i>P. eucalypti</i>	3	1	+	1	-	-	-
M3BCd	-	4	+	1	-	-	-

\*NBRIP=Solubilizadoras de fosfatos; ACC=producción de la enzima ACC desaminasa; NFB=Crecimiento en medio libre de nitrógeno; Sideróforos=Producción de sideróforos

Tabla VII. Bacterias aisladas de hoja. Determinación de la capacidad de aislados de hoja como promotoras de crecimiento y respuesta a pruebas de patogenicidad.

CEPA	NBRIP	ACC	NFB	Sideróforos	Pudrición en papa	Hipersensibilidad en tabaco	Cebolla
<i>Enterobacter</i> sp.	3	1	-	3	-	-	-
M3FAb	1	1	+	3	-	-	-
<i>S. plymuthica</i>	-	1	+	3	-	-	-
M3FBi	5	1	+	1	-	-	-
M3FCa	-	1	+	2	-	-	-
<i>Erwinia</i> sp.	1	1	+	1	-	+	++
M3FDa	5	-	+	1	-	-	-
M3FDb	5	-	+	-	-	-	-
M3Fde	5	-	+	1	-	-	-
M3Fdi	-	2	+	1	-	-	-
M3Fed	-	-	-	3	-	+	-
M3FEe	5	1	+	1	-	-	-
M3FGd	2	-	+	2	+	+	+
M3FGf	4	-	+	1	-	-	-
M3Fia	-	4	+	-	+	+	+
M3Fja	1	-	-	-	+	-	-

\*NBRIP=Solubilizadoras de fosfatos; ACC=producción de la enzima ACC desaminasa; NFB=Crecimiento en medio libre de nitrógeno; Sideróforos=Producción de sideróforos

Tabla VIII. Bacterias aisladas de raíz. Determinación de la capacidad de aislados de raíz como promotoras de crecimiento y respuesta a pruebas de patogenicidad.

CEPA	NBRIP	ACC	NFB	Sideróforos	Pudrición en papa	Hipersensibilidad en tabaco	Cebolla
M3RBb	1	-	-	4	-	-	-
M3RBc	-	1	+	1	-	-	-
M3Rea	-	-	+	-	+	-	-
M3REd	-	5	+	1	+	-	++
M3Rfa	+	-	+	4	-	-	
M3RGa	-	3	+	2	+	-	-
M3RGb	-	-	-	1	-	+	-
M3RIb	-	4	+	1	+	-	++++
M3REe	-	4	+	3	+	-	-
M3REf	-	4	+	3	+	-	++
<i>Bacillus sp.</i>	-	3	+	3	+	-	+++++
M3RGf	-	3	+	3	+	-	+++

\*NBRIP=Solubilizadoras de fosfatos; ACC=producción de la enzima ACC desaminasa; NFB=Crecimiento en medio libre de nitrógeno; Sideróforos=Producción de sideróforos

Tabla IX. Bacterias aisladas de hoja de cebollín. Determinación de la capacidad de aislados de hoja de cebollín como promotoras de crecimiento y respuesta a pruebas de patogenicidad.

CEPA	NBRIP	ACC	NFB	Sideróforos	Pudrición en papa	Hipersensibilidad en tabaco	Cebolla
M2FCa	-	1	-	2	-	-	
M2FEc	-	-	+	5	-	-	
M2FEf	-	2	+	3	+	-	
M2Ffe	-	4	+	2	-	*	++
M2FGb	5	1	+	1	-	-	
M2FGc	5	-	+	1	-	-	
M2FGd	-	-	+	1	-	-	
M2Fid	-	1	+	-	-	-	
M2FBAc	-	1	+	1	-	-	
M2FFh	-	2	+	5	+	-	+

\*NBRIP=Solubilizadoras de fosfatos; ACC=producción de la enzima ACC desaminasa; NFB=Crecimiento en medio libre de nitrógeno; Sideróforos=Producción de sideróforos

Tabla X. Bacterias aisladas de raíz de cebollín. Determinación de la capacidad de aislados de raíz de cebollín como promotoras de crecimiento y respuesta a pruebas de patogenicidad.

CEPA	NBRIP	ACC	NFB	Sideróforos	Pudrición en papa	Hipersensibilidad en tabaco	Cebolla
M2RCa	-	-	+	3	-	-	-
M2RDa	-	1	+	1	-	-	-
M2RHb	-	5	+	3	-	-	-
M2RHc	-	5	+	3	+	-	-
M2RIa	-	1	+	-	-	-	-
M2RJa	-	-	+	5	-	-	-
M2RJb	-	-	-	2	-	-	-
M2RBd	-	5	+	3	+	-	-

\*NBRIP=Solubilizadoras de fosfatos; ACC=producción de la enzima ACC desaminasa; NFB=Crecimiento en medio libre de nitrógeno; Sideróforos=Producción de sideróforos

**Tabla XI.** Resultados obtenidos de la clasificación de los tratamientos en la escala de severidad.

NIVEL	Tratamiento	No de repeticiones
1	P1CA	2
	P1A4	2
	P1A2	2
	P1A3	3
	P1A1	3
	P2A1	3
	P2A2	1
	P2CA	2
2	P1CA	3
	P1A4	2
	P1A2	1
	P1A3	1
	P1A1	1
	P2A1	1
	P2A4	1
	P2A2	4
	P2A3	1
	P2CA	2
	CP2	1
	3	P2A2
P2A1		1
P2A4		4
P2A3		5
P2CA		3
P1A4		2
P1A2		3
P1A3		2
CP1		3
CP2		4
4	P2A1	2
	CP1	2
	CP2	1
5	P2A1	1

\*Las letras minúsculas indican la repetición de los tratamientos.

## ANOVA de un factor

Tabla XII. Anova peso húmedo de hoja tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5.695	5	1.139	2.884	.031
Dentro de grupos	11.849	30	.395		
Total	17.544	35			

Tabla XIII. Prueba de Tukey comparaciones múltiples peso húmedo de hoja

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
CP1	P1A1	-1.10667*	.36285	.049	-2.2103	-.0030
	P1A2	-.47500	.36285	.778	-1.5786	.6286
	P1A3	-.96167	.36285	.116	-2.0653	.1420
	P1A4	-.14833	.36285	.998	-1.2520	.9553
	P1CA	-.57333	.36285	.617	-1.6770	.5303
P1A1	CP1	1.10667*	.36285	.049	.0030	2.2103
	P1A2	.63167	.36285	.517	-.4720	1.7353
	P1A3	.14500	.36285	.999	-.9586	1.2486
	P1A4	.95833	.36285	.118	-.1453	2.0620
	P1CA	.53333	.36285	.685	-.5703	1.6370
P1A2	CP1	.47500	.36285	.778	-.6286	1.5786
	P1A1	-.63167	.36285	.517	-1.7353	.4720
	P1A3	-.48667	.36285	.760	-1.5903	.6170
	P1A4	.32667	.36285	.943	-.7770	1.4303
	P1CA	-.09833	.36285	1.000	-1.2020	1.0053
P1A3	CP1	.96167	.36285	.116	-.1420	2.0653
	P1A1	-.14500	.36285	.999	-1.2486	.9586
	P1A2	.48667	.36285	.760	-.6170	1.5903
	P1A4	.81333	.36285	.249	-.2903	1.9170
	P1CA	.38833	.36285	.889	-.7153	1.4920
P1A4	CP1	.14833	.36285	.998	-.9553	1.2520
	P1A1	-.95833	.36285	.118	-2.0620	.1453
	P1A2	-.32667	.36285	.943	-1.4303	.7770
	P1A3	-.81333	.36285	.249	-1.9170	.2903
	P1CA	-.42500	.36285	.847	-1.5286	.6786
P1CA	CP1	.57333	.36285	.617	-.5303	1.6770
	P1A1	-.53333	.36285	.685	-1.6370	.5703
	P1A2	.09833	.36285	1.000	-1.0053	1.2020
	P1A3	-.38833	.36285	.889	-1.4920	.7153
	P1A4	.42500	.36285	.847	-.6786	1.5286

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla XIV. Anova peso seco de hoja tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.043	5	.009	2.852	.032
Dentro de grupos	.091	30	.003		
Total	.135	35			

Tabla XV. Prueba de Tukey comparaciones múltiples peso seco de hoja

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
CP1	P1A1	-.09667	.03187	.051	-.1936	.0003
	P1A2	-.03667	.03187	.856	-.1336	.0603
	P1A3	-.07833	.03187	.169	-.1753	.0186
	P1A4	-.00833	.03187	1.000	-.1053	.0886
	P1CA	-.05000	.03187	.624	-.1469	.0469
P1A1	CP1	.09667	.03187	.051	-.0003	.1936
	P1A2	.06000	.03187	.432	-.0369	.1569
	P1A3	.01833	.03187	.992	-.0786	.1153
	P1A4	.08833	.03187	.090	-.0086	.1853
	P1CA	.04667	.03187	.689	-.0503	.1436
P1A2	CP1	.03667	.03187	.856	-.0603	.1336
	P1A1	-.06000	.03187	.432	-.1569	.0369
	P1A3	-.04167	.03187	.779	-.1386	.0553
	P1A4	.02833	.03187	.946	-.0686	.1253
	P1CA	-.01333	.03187	.998	-.1103	.0836
P1A3	CP1	.07833	.03187	.169	-.0186	.1753
	P1A1	-.01833	.03187	.992	-.1153	.0786
	P1A2	.04167	.03187	.779	-.0553	.1386
	P1A4	.07000	.03187	.269	-.0269	.1669
	P1CA	.02833	.03187	.946	-.0686	.1253
P1A4	CP1	.00833	.03187	1.000	-.0886	.1053
	P1A1	-.08833	.03187	.090	-.1853	.0086
	P1A2	-.02833	.03187	.946	-.1253	.0686
	P1A3	-.07000	.03187	.269	-.1669	.0269
	P1CA	-.04167	.03187	.779	-.1386	.0553
P1CA	CP1	.05000	.03187	.624	-.0469	.1469
	P1A1	-.04667	.03187	.689	-.1436	.0503
	P1A2	.01333	.03187	.998	-.0836	.1103
	P1A3	-.02833	.03187	.946	-.1253	.0686
	P1A4	.04167	.03187	.779	-.0553	.1386

Tabla XVI. Anova peso húmedo de bulbo tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4.514	5	.903	4.490	.004
Dentro de grupos	6.032	30	.201		
Total	10.545	35			

Tabla XVII. Prueba de Tukey comparaciones múltiples peso húmedo de bulbo

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
CP1	P1A1	-.23833	.25888	.938	-1.0258	.5491
	P1A2	.15167	.25888	.991	-.6358	.9391
	P1A3	-.80333*	.25888	.043	-1.5908	-.0159
	P1A4	-.43167	.25888	.563	-1.2191	.3558
	P1CA	.21333	.25888	.961	-.5741	1.0008
P1A1	CP1	.23833	.25888	.938	-.5491	1.0258
	P1A2	.39000	.25888	.663	-.3974	1.1774
	P1A3	-.56500	.25888	.275	-1.3524	.2224
	P1A4	-.19333	.25888	.974	-.9808	.5941
	P1CA	.45167	.25888	.515	-.3358	1.2391
P1A2	CP1	-.15167	.25888	.991	-.9391	.6358
	P1A1	-.39000	.25888	.663	-1.1774	.3974
	P1A3	-.95500*	.25888	.010	-1.7424	-.1676
	P1A4	-.58333	.25888	.244	-1.3708	.2041
	P1CA	.06167	.25888	1.000	-.7258	.8491
P1A3	CP1	.80333*	.25888	.043	.0159	1.5908
	P1A1	.56500	.25888	.275	-.2224	1.3524
	P1A2	.95500*	.25888	.010	.1676	1.7424
	P1A4	.37167	.25888	.706	-.4158	1.1591
	P1CA	1.01667*	.25888	.006	.2292	1.8041
P1A4	CP1	.43167	.25888	.563	-.3558	1.2191
	P1A1	.19333	.25888	.974	-.5941	.9808
	P1A2	.58333	.25888	.244	-.2041	1.3708
	P1A3	-.37167	.25888	.706	-1.1591	.4158
	P1CA	.64500	.25888	.159	-.1424	1.4324
P1CA	CP1	-.21333	.25888	.961	-1.0008	.5741
	P1A1	-.45167	.25888	.515	-1.2391	.3358
	P1A2	-.06167	.25888	1.000	-.8491	.7258
	P1A3	-1.01667*	.25888	.006	-1.8041	-.2292
	P1A4	-.64500	.25888	.159	-1.4324	.1424

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tabla XVIII. Anova peso seco de bulbo tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.832	5	.166	1.978	.111
Dentro de grupos	2.522	30	.084		
Total	3.354	35			

Tabla XIX. Anova peso húmedo de raíz tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.227	5	.045	2.031	.103
Dentro de grupos	.670	30	.022		
Total	.897	35			

Tabla XX. Anova peso seco de raíz tratamientos con *Erwinia* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.001	5	.000	.701	.627
Dentro de grupos	.012	30	.000		
Total	.014	35			

Tabla XXI. Anova peso húmedo de hoja tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.697	5	.339	.967	.454
Dentro de grupos	10.535	30	.351		
Total	12.232	35			

Tabla XXII. Anova peso seco de hoja tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.013	5	.003	.729	.608
Dentro de grupos	.108	30	.004		
Total	.121	35			

Tabla XXIII.

Anova peso húmedo de bulbo tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.852	5	.370	1.427	.243
Dentro de grupos	7.785	30	.259		
Total	9.636	35			

Tabla XXIV. Anova peso seco de bulbo tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.201	5	.040	1.321	.282
Dentro de grupos	.913	30	.030		
Total	1.114	35			

Tabla XXV. Anova peso húmedo de raíz tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.088	5	.018	.736	.602
Dentro de grupos	.715	30	.024		
Total	.802	35			

Tabla XXVI. Anova peso seco de raíz tratamientos con *Bacillus* sp.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.000	5	.000	.209	.956
Dentro de grupos	.010	30	.000		
Total	.010	35			

Tabla XXVII. Pruebas de Kruskal-Wallis para la escala de severidad tratamientos con *Erwinia* sp.

	escala del 1 al 5
Chi-cuadrado	13.982
gl	5
Sig. asintótica	.016

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:  
Tratamientos

Tabla XXVII. Pruebas de Kruskal-Wallis para la escala de severidad tratamientos con *Bacillus* sp.

	Escala de severidad
Chi-cuadrado	6.951
gl	5
Sig. asintótica	.224

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:  
Tratamientos