

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA CONTRA THANATEPHORUS CUCUMERIS (RHIZOCTONIA SOLANI) EN EL CULTIVO DE FRIJOL

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS WITH ANTAGONIC ACTIVITY AGAINST THANATEPHORUS CUCUMERIS (RHIZOCTONIA SOLANI) IN BEAN CROPS

Herrera, Rito; Chong, Martha de Von; Vergara, Nicanor; Pinzón, María

 **Rito Herrera**

rito.herrera@up.ac.pa
Universidad de Panamá, Panamá

 **Martha de Von Chong**

martha.chaves@up.ac.pa
Universidad de Panamá, Panamá

 **Nicanor Vergara**

vergaranicanor91@gmail.com
Universidad de Panamá, Panamá

 **María Pinzón**

marigis1807@gmail.com
Universidad de Panamá, Panamá

Revista Colegiada de Ciencia

Universidad de Panamá, Panamá
ISSN-e: 2710-7434
Periodicidad: Semestral
vol. 5, núm. 1, 2023
revcolciencias@up.ac.pa

Recepción: 01 Septiembre 2022
Aprobación: 05 Julio 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/334/3344527009/>

Resumen: La presente investigación se realizó en Rio Hato, provincia de Coclé, con el objetivo de aislar e identificar microorganismos con actividad antagonista contra el patógeno fúngico *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), a fin de minimizar el uso de fungicidas y otros compuestos químicos utilizados en el control convencional de este hongo. Se aislaron un total de 185 bacterias y 72 hongos a partir de plantas de frijol en sus tres estados fenológicos (vegetativo, floración y fructificación) dentro de la rizósfera y filósfera. Se determinó que hubo diferencias significativas entre las diluciones utilizadas, siendo la dilución de 10^{-4} donde se aislaron mayor cantidad de bacterias. En relación con los organismos epífitos hubo diferencias significativas entre las diluciones, siendo la dilución 10^{-4} donde más bacterias se aislaron, no se determinaron diferencias entre las fases fenológicas. La fase vegetativa presentó la mayor cantidad de aislamientos; no existieron diferencias para las secciones de la filósfera. En cuanto a los hongos epífiticos no hubo diferencias estadísticas entre las diluciones ni en las fases fenológicas. En la sección endófito, la fase de fructificación presentó la mayoría de los aislamientos fúngicos. En relación con los hongos de la rizósfera se determinaron diferencias significativas en las diluciones, siendo 10^{-4} donde más aislamientos se obtuvo. Finalmente, se lograron aislar siete bacterias y cuatro hongos positivos con actividad biológica antagonista contra el patógeno *T. cucumeris*.

Palabras clave: bacterias, hongos, rizósfera, filósfera, fenología.

Abstract: The present investigation was carried out in Rio Hato, Coclé province, with the objective of isolating and identifying microorganisms with antagonistic activity against the fungal pathogen *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) in bean plants (*Phaseolus vulgaris*), to minimize the use of fungicides and other chemical compounds used in the conventional control of this fungus. A total of 185 bacteria and 72 fungi were

isolated from bean plants in their three phenological stages (vegetative, flowering and fruiting) within the rhizosphere and phyllosphere. It was determined that there were significant differences between the dilutions used, being the 10^{-4} dilution where the greatest number of bacteria were isolated. In relation to the epiphytic organisms, there were significant differences between the dilutions, being the 10^{-4} dilution where more bacteria were isolated, no differences were determined between the phenological phases. The vegetative phase presented the largest number of isolates; there were no differences for the sections of the phyllosphere. Regarding the epiphytic fungi, there were no statistical differences between the dilutions or in the phenological phases. In the endophytic section, the fruiting phase presented most of the fungal isolates. In relation to the rhizosphere fungi, significant differences were determined in the dilutions, being 10^{-4} where more isolates were obtained. Finally, it was possible to isolate seven bacteria and four positive fungi with antagonistic biological activity against the pathogen *T. cucumeris*.

Keywords: bacteria, fungi, rhizosphere, phyllosphere, phenology.

INTRODUCCIÓN

El control biológico fue originalmente definido como "la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia" (DeBach, 1997). En la actualidad se entiende como biocontrol la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar (Badii, et al., 2000).

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagonica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógeno el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero. Los organismos antagonistas realmente buenos son capaces de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, y sobrevive bajo condiciones adversas (Benítez, 2004).

Generalmente, se emplea limitación en las fuentes de carbono. Muchos patógenos producen estructuras de supervivencia que se encuentran en el suelo a la espera de que exista una fuente de nutrientes para desarrollar las formas activas del microorganismo. Los elementos saprótrofos pueden reducir las fuentes de carbono e imponer la fungistasis a las esporas del patógeno impidiendo que germinen y que infecten a las plantas. La disponibilidad de carbono en forma asimilable permite la germinación de esporas y la adición de materia orgánica en forma de compost o similares estimula la actividad microbiana de los saprótrofos, de forma que se origina una intensa competencia, pudiendo producir limitación de carbono para las esporas y fungistasis (Rubio et al., 2008). Hay microorganismos que crecen rápidamente cuando se inoculan en el suelo, ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como DDT y compuestos fenólicos (Chet, 2003).

El manejo de esta enfermedad con los métodos tradicionales, variedades resistentes y control químico no han dado resultados positivos. Esta enfermedad es considerada como la más destructiva del frijol, por la defoliación rápida y drástica que causa. En condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, puede causar una destrucción rápida de las plantas atacadas en una o dos semanas y pérdidas en el rendimiento de hasta 50% (Rodríguez et al., 1999). La presente investigación se realizó en Rio Hato, provincia de Coclé, con el objetivo de aislar e identificar microorganismos con actividad antagonista contra el patógeno fúngico *Thanetophorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), a fin de minimizar el uso de fungicidas y otros compuestos químicos utilizados en el control convencional de este hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de bacterias y hongos epífitos.

De las plantas de frijol en cada uno de los estados fenológicos, se tomaron diez hojas y fueron colocadas en un tubo de ensayo con 5 ml de agua peptonada estéril y se agitaron vigorosamente con la ayuda de un agitador vórtex. Posteriormente, se realizó una dilución seriada; en la cual se tomó 1 ml de la muestra del tubo madre y se diluyó en tubos con 9 ml de agua peptonada cada uno, las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Luego se tomaron 30 μ L de cada una de las diluciones y se sembraron en platos Petri con agar tripticasa y soya (TSA) para bacterias y agar papa dextrosa (PDA) para hongos, cada uno con sus respectivas réplicas, a temperatura ambiente (28 °C aproximadamente). En el caso de las bacterias, después de 24 horas de incubación, se procedió a aislar las unidades formadoras de colonias por ml (UFC). Luego se realizaron un mínimo de dos pases a cada aislamiento, seguidamente se procedió con tinción Gram para verificar la morfología bacteriana y características bioquímicas de la pared celular. De igual forma los hongos obtenidos se aislaron, después de 48 horas de montada la muestra, realizándose dos aislamientos consecutivos cada hongo a fin de asegurar la pureza del cultivo (Castro et al., 2015, Guillén-Cruz et al., 2005).

Determinación de bacterias y hongos endófitos

Tomando en cuenta que los microorganismos endófitos se encuentran principalmente en las hojas, tallos y raíces, para el aislamiento de estos microorganismos se utilizó el procedimiento descrito por Qingmiao et al (2012), con modificaciones menores; se tomaron alrededor de 100 g de hojas de la planta de frijol, dividiéndolas en tres partes: ápice, base de la hoja y el centro. Inmediatamente los segmentos fueron colocados en papel toalla para secarlos y limpiarlos y remover el excedente líquido. Luego se sembraron nueve segmentos de cada una de las divisiones de las hojas (ápice, parte media y base) en agar TSA. Después de 24 horas de incubación, se revisaron las muestras para determinar su crecimiento. En las muestras sembradas en TSA, las colonias bacterianas presentes fueron aisladas hasta obtener unidades formadoras de colonias (UFC) puras, verificándose estas características mediante tinción Gram. Las muestras puras se pasaron a tubos inclinados. De la misma manera, los hongos obtenidos (PDA) después de 48 horas de incubación, fueron aislados y colocados en tubos inclinados.

Determinación de bacterias y hongos de la rizósfera.

Para el aislamiento de los microorganismos de la rizósfera se usó el método descrito por Patiño y Sánchez (2012). Se utilizaron los siguientes tratamientos: suelo, suelo +raíz y raíz. En cada uno de los tratamientos se pesaron 25 g por muestras de plantas de frijol, se diluyeron en 60 ml de agua peptonada y se agitaron

vigorosamente con ayuda de un vórtex. Se realizó posteriormente una dilución seriada, de la cual se tomó 1 ml de la muestra del tubo madre y se procedió a diluir en tubos de ensayo con 9ml de agua peptonada cada uno. Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}). Luego se tomaron 30 μ L de cada una de las diluciones y se sembraron en medio TSA y PDA, incubándose a 28 °C. De las muestras sembradas en TSA, se aislaron las colonias bacterianas hasta obtener unidades formadoras de colonias (UFC) puras. De manera similar, los hongos serán aislados hasta obtener microorganismos puros.

Pruebas antagónicas (cultivo dual)

Esta prueba conocida como cultivo dual, se realizó siguiendo la metodología descrita por (Meza et al., 2008). Todos los hongos aislados de cada una de las partes de las plantas en sus estados fenológicos (endófitos, epífitos y rizósfera) se sembraron nuevamente en platos Petri (PDA), al igual que el hongo patógeno (*T. cucumeris*). Las bacterias se cultivaron 24 horas en caldo nutritivo y luego fueron sembradas en platos Petri con TSA.

Después de cuatro días (hongos) y 24 horas (bacterias), con ayuda de un tubo de ensayo estéril (perforador) con diámetro de 5 cm (disco) se sembraron (el hongo o bacteria aislado) a 2 cm del centro del plato Petri y en el sentido opuesto se colocaron un disco de 0.5 cm a 2 cm de la línea divisora del centro del plato el hongo patógeno (*T. cucumeris*). Cada una de las muestras de hongos y bacterias aisladas (dos replicas), más los controles (hongo patógeno). La línea divisoria (centro del plato Petri) se utilizó para observar la "invasión o colonización" del espacio de cada microorganismo (Cundom et al., 2003). Luego, con la ayuda de un calibrador "pie de rey" según recomienda Suárez et al., (2008), se procedió a medir los radios miceliales de los hongos los días 2, 4 y 7; En cuanto a las bacterias se les midió el radio diariamente por seis días consecutivos. Todas las pruebas antagónicas fueron incubadas a 28 °C.

Índice de Inhibición de pruebas antagónicas.

Después de medir el crecimiento radial de todas las muestras de las pruebas antagónicas, se evaluaron el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula: $PIR = (R1 - R2) / R1 \times 100$. Donde PIR es el porcentaje de inhibición radial (%), R1 es el diámetro del radio control (patógeno solo) y R2 es el diámetro del radio del tratamiento (patógeno + muestra aislada). Posteriormente, los hongos que presentaron evidencias de capacidad antagónica, se les aplicó la técnica de microcultivo, para identificarlos mediante una clave taxonómica, determinándose en primera instancia su género. Las bacterias que presenten actividad antagónica fueron identificadas mediante el sistema API y luego mediante secuenciación.

Pruebas Api 20E.

Para esta prueba fue utilizada la metodología presente en el manual Biomérieux® api 20E. Las bacterias (puras) positivas para antagonismo (Gram-), fueron sembradas nuevamente en platos con agar nutritivo, se prepararon tubos con solución salina y se esterilizaron hisopos para luego seguir este procedimiento. Se llevó a cabo la identificación molecular por secuenciación mediante el gen *rpoB*. Se consideraron como antagonistas significativos, aquellas cepas con halo de inhibición ≥ 4 mm de diámetro.

Caracterización de morfotipos (Microcultivo).

De acuerdo con Arenas (1993), el método de microcultivo es el más preciso ya que permite observar las estructuras in situ. Los hongos que presentaron actividad antagónica fueron aislados con una hoja de bisturí

de la placa, con medio de PDA, en cuadrados de agar de 0,5 cm. Con la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos. Luego se sembró el hongo con la espátula en las cuatro esquinas y en el centro del bloque de agar. Colocándose el cubreobjetos sobre el bloque de agar PDA. Se diseñó una cámara húmeda dentro del plato Petri con el objetivo de favorecer el crecimiento del hongo y se incubaron a 28 °C. Después de 7 días se desprendieron el portaobjeto y se le colocó una gota de azul de lactofenol y se observaron al microscopio (40X y 100X) buscando estructuras reproductivas (Casa, 1989). Posteriormente, para su identificación molecular se amplificarán por PCR convencional los genes ribosomales 16S (ITS) y se secuenciarán con el fin de determinar la especie de hongo.

Para esta investigación se aplicó un muestreo completamente al azar y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con datos transformados con raíz cuadrada, con un nivel de significancia de ($P < 0.01$). Los datos se ajustaron a la normalidad y cumplieron con el principio de homocedasticidad.

RESULTADOS

Se aislaron un total de 252 microorganismos, 180 bacterias y 72 hongos, de los cuales 12 microorganismos (8 bacterias y 4 hongos), resultaron positivos en actividad antagonista frente a *T.cucumeris*, tomando un PIR del 45% según Ezziyani et al (2004) (Figura 1).

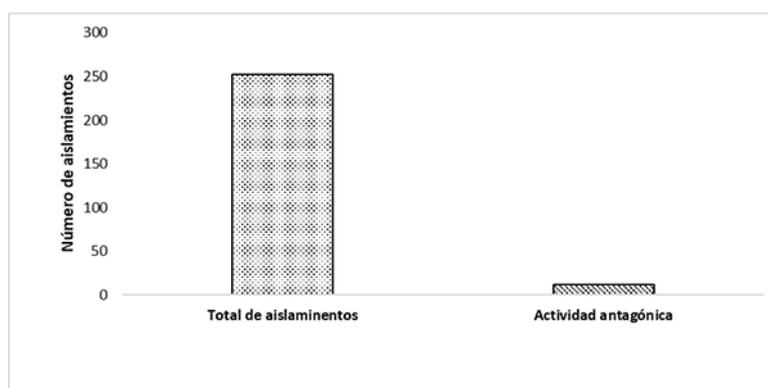


FIGURA 1

Relación entre el número total de aislamientos y los microorganismos con actividad antagonica.

Según los resultados de aislamientos bacterianos, se tiene un análisis de varianza con datos transformados con raíz cuadrada, en los datos obtenidos hay diferencia significativa ($P < 0.01$) para el modelo utilizado, hay diferencia significativa en las diluciones, al menos una de las diluciones tiene una carga bacteriana más alta en este caso es 10^{-4} , como observamos en la Figura 2. No hay una diferencia significativa en las fases fenológicas, es decir que en las fases fenológica se aisló casi la misma cantidad de microorganismos.

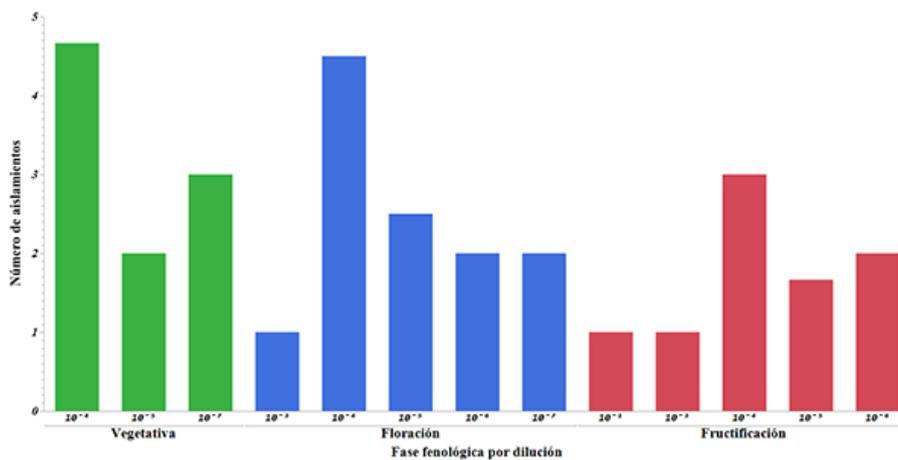


FIGURA 2

Valores de aislamiento por diluciones en los tres estados fenológicos, organismos epífitos (bacterias).

Como podemos observar (Figura 2) en los tres estados fenológicos de la planta de la dilución 10⁻⁴ se aisló la mayor cantidad de microorganismos, mientras que no hay una diferencia significativa en el número de aislamiento por fase fenológica. En cuanto los aislamientos fúngicos el análisis estadístico (ANOVA) indica que no existe diferencia significativa, ni en las diluciones ni en fase fenológica. En la fase de floración se obtuvo un mayor número de aislamientos, siendo la dilución 10⁻⁵ de la cual se pudo obtener el mayor número de microorganismos aislados, seguido de la dilución 10⁻⁴. La fase fenológica de fructificación las diluciones de 10⁻⁴ y 10⁻⁵ donde se observó el mayor número de aislamiento; mientras en la fase fenológica vegetativa hubo se aislaron la misma cantidad de fúngica de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ (Figura 3).

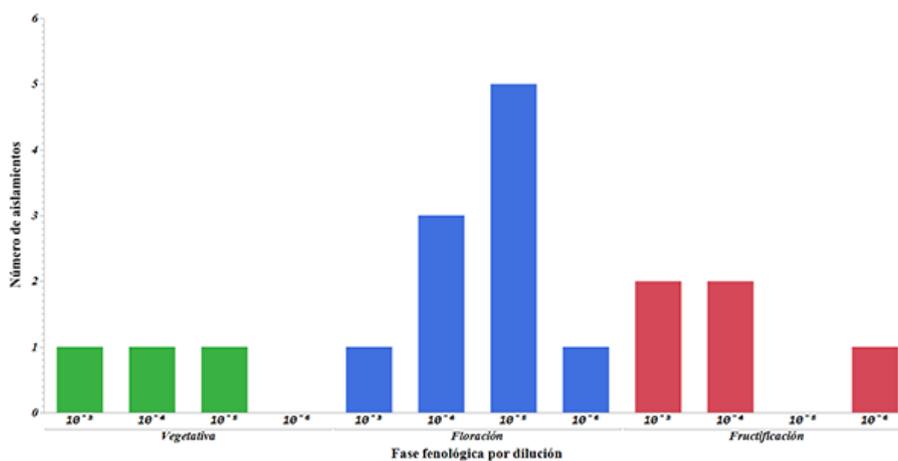


FIGURA 3

Número de aislamiento por diluciones en las diferentes fases fenológicas, organismos epífitos (hongos).

Los resultados obtenidos (bacterias endófitas) muestran que en el análisis hay 36% de predicción de bacterias según el modelo utilizado, el análisis de varianza indica que el modelo es significativo, la fase fenológica es significativa, ya que se aisló una mayor cantidad de microorganismos en la fase fenológica vegetativa. Mientras que por sección de la filósfera según el análisis no hay una diferencia significativa (P<0.01, es decir que no se muestra una diferencia entre el número de bacterias por sección de la hoja (ápice, sección media y base). Al observar la figura 4, la fase que mayor diferencia obtuvo fue la fase vegetativa se obtuvo un número mayor de aislamientos. Además, no hay diferencias significativas por sección de la hoja (filósfera).

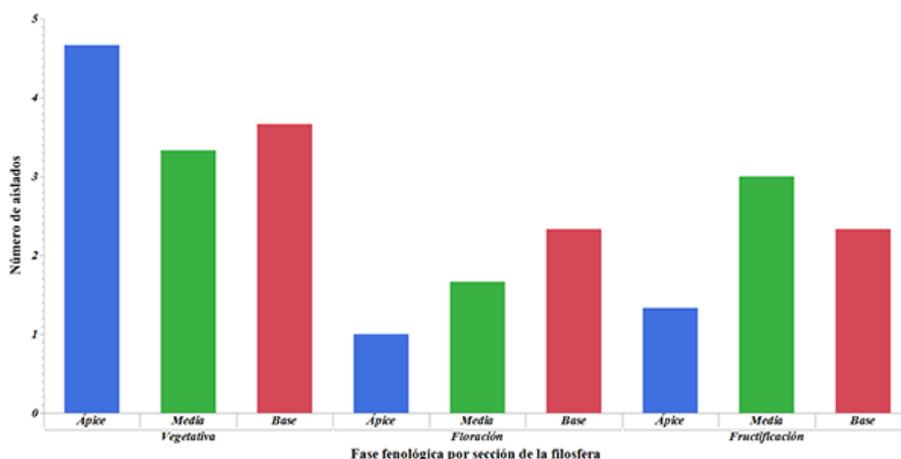


FIGURA 4

Aislamiento por fase fenológica de la parte endófito de la filósfera (bacterias).

En cuanto a los aislamientos fúngicos, el análisis de varianza (ANOVA) determinó diferencias significativas en la fase fenológica, pero no en las secciones de la hoja. En la fase fenológica, se observó que la fase de fructificación presenta mayor cantidad de aislamientos fúngicos, respecto a las otras fases (Figura 5).

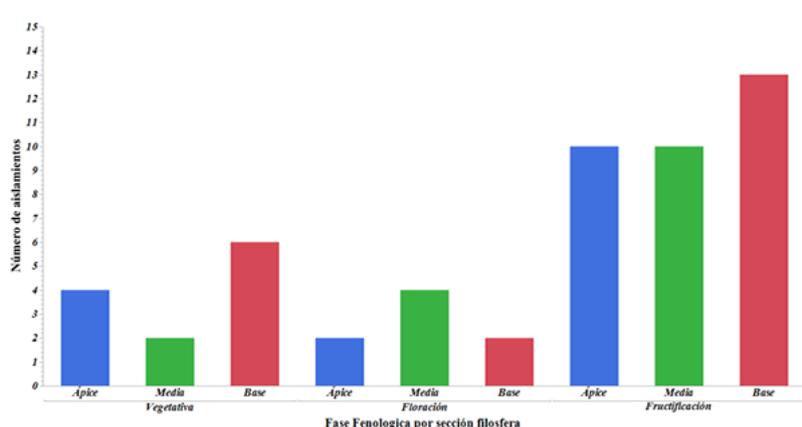


FIGURA 5

Aislamiento por fase fenológica y la parte endófito de la filósfera.

En la fase fenológica de fructificación se aisló un mayor número de hongos que en las otras dos fases, en la sección base se obtuvo el mayor aislamiento de esta fase fenológica. La fase vegetativa se obtuvo un mayor aislamiento fúngico en la sección base seguida de la sección ápice por último la fase fenológica de floración. La fase fenológica de floración fue la fase que menos aislamientos fúngicos presentó.

El diseño experimental utilizado explica el 24% de la presencia de las bacterias en la rizósfera. El análisis de varianza (ANOVA) del modelo es significativo, la dilución es significativa; es decir hubo diferencias significativas entre cada una de las diluciones de las fases fenológicas. En la dilución de 10^{-2} , es de la que se obtiene el mayor número de aislamientos (Figura 6). Según el análisis estadístico, ni la fase fenológica ni las secciones de la rizósfera muestran diferencias significativas entre ellas.

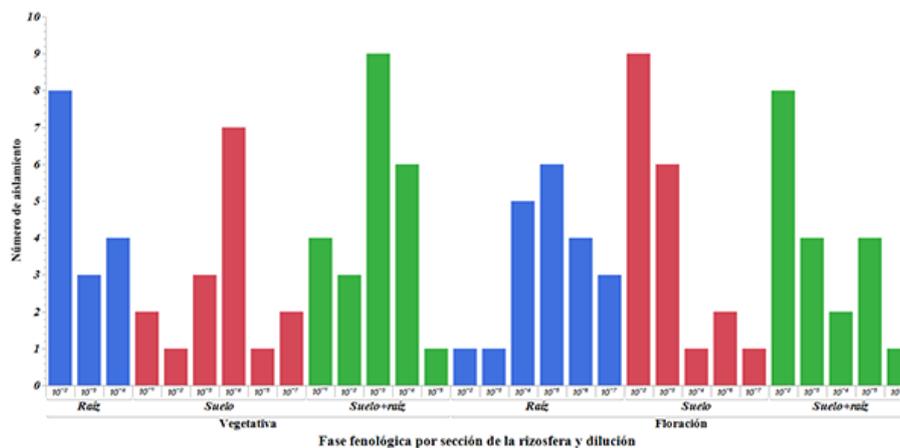


FIGURA 6
Aislamientos por dilución, fase fenológica, sección de la rizósfera (bacterias).

En la fase fenológica vegetativa, en la sección de la raíz, se aisló el mayor número de bacterias en la dilución 10⁻², en la sección suelo fue en 10⁻⁴ y en la sección suelo + raíz fue en 10⁻³. Mientras que en la fase fenológica de floración se observó mayor número de aislamientos en 10⁻⁵ en la sección de la raíz, 10⁻² en el suelo y 10⁻² en suelo + raíz. Como se explicó en la metodología a cada bacteria se realizó una prueba antagonica dual, tomando como referencia las bacterias que mostraron un PIR del 45% en adelante. Solo 8 bacterias resultaron positivas para antagonismo según el PIR (Figura 7 y 8).

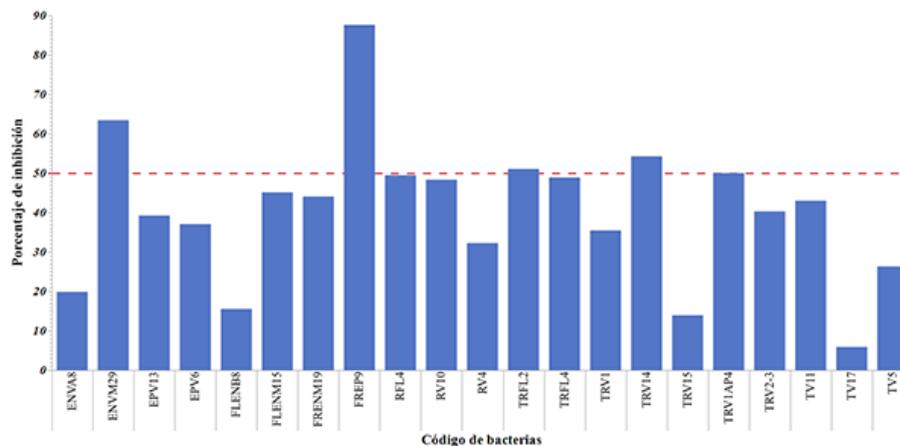


FIGURA 7
Porcentaje de inhibición de las bacterias aisladas (PIR 45 %).

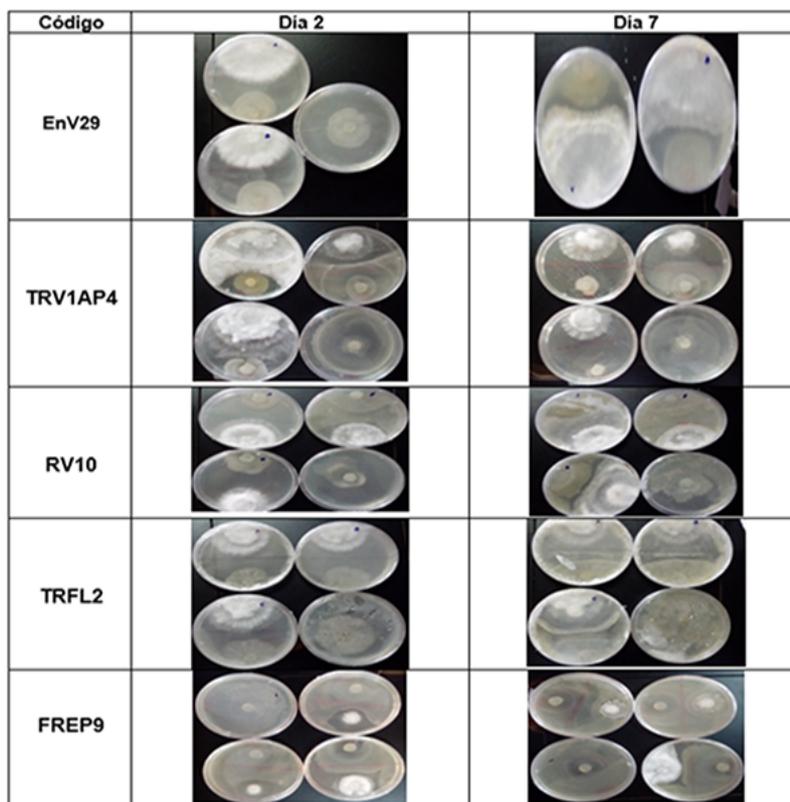


FIGURA 8

Bacterias positivas en actividad antagonica (enfrentamientos días 1 y 7).

Las bacterias positivas en PIR (antagónicas), se les realizo tinción Gram. Resultando ser bacterias Gram negativas (-), a las cuales se les aplico la prueba de api 20E para su posterior identificación, además de la identificación molecular con gen *rpoB*. La bacteria Frep 9, correspondió a la especie *Bacillus subtilis*, ENVM29 *Pseudomonas fluorescens*, TRV14 que pertenece al género *Acinetobacter* al igual que RV10 y TRFL2, TRFL4 y TRV1AP4 pertenecen a la especie *Pseudomonas Aureginosa*. Concordando con el trabajo realizado por (Hernández et al., 2018) el cual enfrentaron antagónicamente *P.fluorescens*, *P. aureginosa* y *B. subtilis*, contra *R. solani*. Obteniendo resultados positivos en PIR a *P.aureginosa* y *P.fluorescens* con un 100% de efectividad antagonica a 72 horas de montado el ensayo.

De las tres fases fenológicas (vegetativa, floración y fructificación), en las pruebas antagónicas solo cuatro hongos de los 72 enfrentamientos resultaron positivos en PIR, todos fueron de la parte epifita de la planta, a tener en cuenta que al sexto día de medición el patógeno (*T.cucumeris*) cubría todo el plato y en la mayoría de los enfrentamientos cubría los aislamientos enfrentados frente al patógeno (Figura 9 y 10).

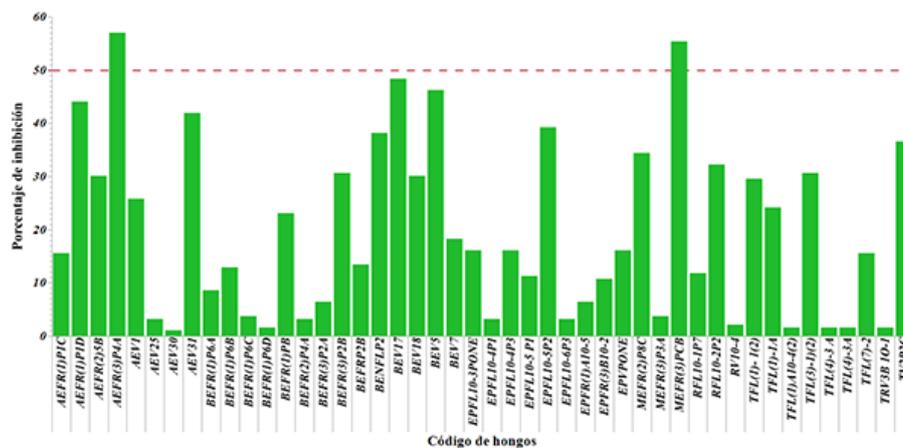


FIGURA 9
Porcentaje de inhibición de los hongos aislados frente a *T. cucumeris*.

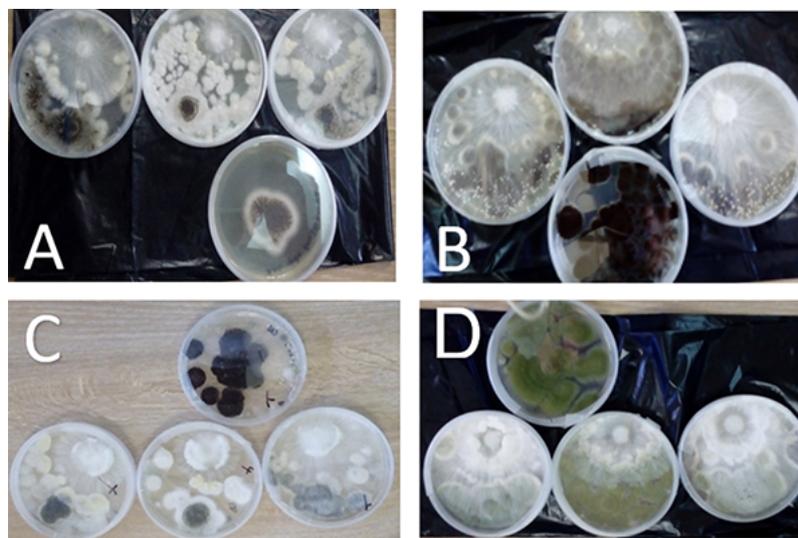


FIGURA 10
Pruebas positivas de antagonismo de A) AEFR (3)P4A, B) MEFR (3) PCB, C) BEV5 Y D) BEV17(séptimo día de medición).

A los hongos con PIR positivo, se les realizó la técnica de microcultivo para identificarlos. Estos fueron: AEFR (3)p4a: ápice endófito fructificación que resulto tener un PIR de 57% como muestra la figura 18, perteneciente al género *Colletotrichum*. MEFR (3) pcb que con el microcultivo se observó que pertenece al género *Aspergillus*. podemos observar los conidios del *Colletotrichum* (AEFR (3)p4a y *Aspergillus* MEFR (3) respectivamente, son hongos filamentosos. Ambos pertenecen a la planta de estado fenológico de fructificación sección endófito de la filósfera. Mientras que BEV17 con un PIR de 48.4%, pertenece a la fase fenológica vegetativa, sección endófito de la rizosfera y BEV5 con un PIR de 46.2% pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* respectivamente según la identificación.

DISCUSIÓN

En cuanto a la mayor abundancia de bacterias epífitas observada, nuestros resultados coinciden con lo expuesto por Andrews y Harris (2000) y Lindow y Brandl (2003) quienes apuntan a que las bacterias podrían tener una ventaja competitiva con respecto a la colonización de la filósfera frente a los demás

microorganismos, ya que se ha encontrado que la presencia de células bacterianas en las hojas puede oscilar entre 10^6 y 10^7 células/cm². Los estudios simultáneos de estos dos tipos de hongos y bacterias (epífitos y endófitos) en una sola planta, han generado información sobre las ventajas de la coexistencia de estas microbiotas en el vegetal; por ejemplo, Gao et al., (2010) y también Herre et al., (2007) mencionan implicaciones favorables en la salud de la planta y posibles alternativas propias para su protección. También Kumar y Hyde (2004), Khan et al., (2007) y Douanla-Meli et al., (2013) refuerzan el concepto biodiversidad microbiana como conveniente para el desarrollo de la planta. La densidad poblacional de las bacterias endófitas puede variar de 10^2 a 10^9 y puede ser afectada por muchos factores, entre los cuales tenemos la fase fenológica del cultivo y la interacción de las bacterias con los factores climáticos (Toloza y Lizarazo, 2013). Durante el desarrollo vegetativo de las plantas, la mayor parte de la energía de la planta se dirige al follaje.

El hecho de que no se presenten diferencias significativas entre las fases fenológicas y la secciones de la rizósfera para los aislamientos de hongos, podría sugerir que la presencia de estos es un fenómeno inherente al desarrollo y crecimiento de la planta. En este sentido, la colonización de las raíces por los hongos comienza con el reconocimiento de compuestos específicos en los exudados de las plantas, los cuales desempeñan un papel importante en las interacciones de la población fúngica y bacteriana del suelo (Toloza y Lizarazo, 2013).

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Calvo y Zúñiga (2008), donde se estudiaron las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa, con la diferencia de que el comportamiento general de la rizósfera para las dos regiones registró siempre una mayor población de bacterias totales que estuvieron entre las diluciones de 10^6 y 10^8 UFC/g en comparación a la población de hongos que siempre estuvo entre 10^4 y 10^5 UFC/g. En nuestro estudio tanto de bacterias como hongos la dilución donde se obtuvo mayores aislamientos fue de 10^2 , mientras que en entre las fases fenológicas no se determinaron diferencias significativas, esto pudiera explicarse debido a que las tres muestras se obtuvieron del mismo terreno con el mismo pH y cantidad de fósforo, coincidiendo con lo expuesto por Alexander (1994), quién señala que el pH podría ser determinante en el desarrollo de las poblaciones microbianas en suelos alcalinos, favoreciendo el incremento de su número. Otro factor importante que puede influenciar en el tamaño de las poblaciones microbianas es la cantidad de fósforo disponible.

Seis de los aislamientos bacterianos positivos para el PIR, fueron de la rizósfera (correspondiendo al 71.4%) mientras que en la filósfera, sólo se obtuvo dos positivos; uno epífito y otro endófito representando el 28.5%, lo que concuerda con lo esperado dada las condiciones propias de ambas entornos (Antoun y Prevost, 2006), pues las diferentes formas en que las bacterias se asocian con la raíz, están encaminadas a promover el crecimiento de las plantas: facilitando la adquisición de nutrientes, produciendo compuestos para la regulación del crecimiento vegetal, hormonas de crecimiento vegetal, disminuyendo indirectamente los efectos adversos de microorganismos patógenos, al producir compuestos antimicrobianos y/o limitando la disponibilidad de nutrientes para los patógenos (Bashan et al., 2004).

En cuanto, a el efecto antagonista de bacterias en el tratamiento a la semilla de frijol común contra hongos fitopatógenos que habitan en el suelo, se ha reportado para el género *Pseudomonas* inhibiendo *in vitro* el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina* y *Rizoctonia solani* y en condiciones de campo las bacterias estimularon el crecimiento de las plantas de los cultivares estudiados en su investigación. (Ramírez, 2014).

Los cuatro hongos positivos en actividad antagonica identificados en este trabajo fueron endófitos de la hoja. Según Venkayasubbaia y Safeeulla (2008), *Aspergillus niger* (van tiegh) aislado de plántulas de café es antagonico contra de la pudrición del collar causada por *R. solani* (Kuhn) en estudios *in vitro*, ya que el modo de interacción hifal y el parasitismo de *R. solani* por *A. niger* indicaron el crecimiento directo del micoparásito hacia su hospedador y como consecuencia, provocando el colapso de la hifa del hospedador. En relación con *Colletotrichum* con este hongo endófito se realizó un estudio en la India para evaluar su efecto antagonico

frente a *Pestalotiopsis theae* obteniendo resultados positivos (Rabha et al., 2014). Estos datos concuerdan con los géneros de hongos antagonistas aislados en esta investigación.

La capacidad antagonista de algunas cepas de hongos hacia hongos fitopatógenos se puede definir con base en la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos (Cook, 2000). Esta capacidad es el resultado de la agresividad del antagonista y de la susceptibilidad del patógeno (Paul, 1999; Sempere y Santamarina, 2008). Lo anterior se hace evidente por la variación observada con respecto a la selectividad de algunas cepas de *Aspergillus* para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos, en comparación con las cepas de *Trichoderma sp.* cuyo rango de hospedantes es al parecer, menos específico.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó una distribución homogénea de las bacterias epífitas en la filósfera y en las diferentes etapas fenológicas del frijol, siendo la fase vegetativa la que presentó mayor cantidad de aislamientos. En cuanto al número de aislamientos de los hongos, existió un predominio de endófitos en la fase de fructificación, así como mayor actividad biológica antagonista. Hubo una mayor actividad biológica antagonista de las bacterias rizosféricas contra *T. cucumeris*, lo que sugiere la importancia de esta esfera biológica para la sobrevivencia de las plantas y el equilibrio entre planta y microorganismo, siendo la fase fenológica vegetativa la más importante en este sentido. Estos datos deben ser tomados en cuenta para un plan de manejo integral del hongo fitopatógeno *C. cucumeris* en el cultivo de frijol.

REFERENCIAS

- Andrews, J., Harris, R. (2000). The ecology and the biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 145-180.
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la microbiología de suelos*. Editorial AGT.
- Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. En Z. A. Siddiqui (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (pp. 1-38). Editorial Springer.
- . Arenas, R. (1993). *Micología médica ilustrada*. (2ª ed.). McGraw-Hill.
- Badii, M. A., Tejada, A., Flores, C., López, H., Quiroz, H. (2000). Historia, fundamentos e importancia. UANL. En: M. H. Badii, A. E. Flores y L. J. Galán (Eds.). *Fundamentos y perspectivas de centro biológico*. UANL.
- Bashan, Y., Holguin, L., De Bashan, E. (2004). *Azospirillum-Plant Relationships: Physiological, Molecular*. Agricultural and Environmental Advances (1997-2003).
- Benítez, T., Rincón, M., Limón, A., Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- Calvo, P., Raymundo, L., Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosus*) en las zonas alto Andinas. *Ecología aplicada*, 7, 1-2.
- Castro, R., Pesántez, M., Flores, V., Díaz, C., Castro, Li. y Alvarado-Capó, Y. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de protección vegetal*, 30(2), 133-138.
- Chet, L. (2003). Control Biológico de Macrophomina causante del tallo negro en girasol (*Helianthus annuus* L.) con el uso del antagonista *Trichoderma harzianum* en condiciones de vivero y campo. *XII Congreso Venezolano de Fitopatología, Maturín, Estado Monagas – Venezuela*.
- Cook, R. (2000). Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 95-116.
- Cundom, M., Mazza de Gaiad, M., Mazzati de Castañon, S., Gutiérrez de Arriola, Coutinho, M. (2002). Actividad antagonista in vitro de hongos saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

- DeBach, P. (1977). *Lucha biológica contra los enemigos de las plantas*. Ed. MundiPrensa,
- Douanla-Meli, C., Langer, E., Moufao, F. (2013). Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limon. *Fungal Ecology*, 6(3), 212-222.
- Ezziyyani, M., Pérez, M., Requena, L., Rubio, M. Candela, E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* - Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.
- Gao, F., Dai, C. y Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346-1351.
- Guillén-Cruz, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., Padrón, E., Reyes, M. (2005). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (2), 105-114.
- Hernández, D., Díaz, M., Quiñones, R., Bermudez, R., González, N., Herrera, L. (2018). *Control de Rhizoctonia solani en frijol común con rizobacterias y productos naturales*.
- Herre, E., Mejía, L., Kyllö, D., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. y Van Bael, S. (2007). Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 8 (3), 550-558.
- Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M., Khan, S., Ahmad, A. (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT). *R. Br. Pak. Journal Botanical*, 39(6), 2233-2239.
- Kumar, D., Hyde, K. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17, 69-90.
- Lindow, S., Brandl, M. (2003). MINIREVIEW: Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Meza, C. Fernández, R., Valero, N., Gámez, R., Páez, A. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Rev. Col. de Biotec.*, 10(2), 35- 43.
- Patiño, C., Sánchez, L. (2012). Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos, habitantes de la rizósfera de chontaduro (*B. gassipaes* kunth). *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10(2), 177 - 187.
- Paul, B. (1999). Suppression of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine by an aggressive mycoparasite, *Phytium radiousum*. *FEMS Microbiology Letters*, 176, 25-30.
- Qingmiao, Z., Xiying W. y Jiawen W., (2012). *Phillyrin* produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*. *Fitoterapia* 83: 1550-1505.
- Rabha, A., Naglot, A., Sharma, G., Gogoi, H., Veer, V. (2014). En Vitro Evaluation of Antagonism of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Against Potent Fungal Pathogens of *Camellia sinensis*. *Indian J Microbiol*, 54(3).
- Ramírez, M. (2014). *Bases para el manejo integrado de hongos fitopatógenos del suelo en el frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. (Tesis Máster en Agricultura). UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
- Rodríguez, E., Lorenzo, E., Acosta, M., González, F., Mora, B. y Godoy, G. (1999). Manejo de la mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana* 10(1), 99-108.
- Rubio M., Hernández, E., Aguirre, R., Poutou, P. (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 13(1), 1157-1169.
- Sempere, F., Santamarina, M. (2008). Suppression of *Nigrospora oryzae* by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalium*. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 35-43.
- Tolosa, D., Lizarazo, L. (2013). Microbial populations associated with the rhizosphere plants of cape Gaaseberry (*Physalis peruviana* L.). *Revista de ciencias* 18:32.
- Venkayasubbaia, P., Safeulla, K. (2008). *Aspergillus niger* for biological control of *Rhizoctonia solani* on coffee seedlings. *Tropical pest management*, 30, 401-406.