



**FUNDACION
PRODUCE**
Sinaloa A.C.
ENLACE, INNOVACIÓN Y PROGRESO

SAGARPA



SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SINALOA
ES TAREA DE TODOS

GOBIERNO
DEL ESTADO
DE SINALOA

MICROORGANISMOS NATIVOS PARA EL CONTROL DE *FUSARIUM* EN EL MAÍZ

Responsable:

Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Institución Ejecutora:

Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional

Colección



Tecnologías
para el
productor



Microorganismos nativos para el control de *Fusarium* en el maíz

Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza*

* Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR).

ÍNDICE

Introducción	7
Objetivos	9
Metodología	10
LISTA DE LOS 10 MEJORES AISLADOS PARA PROBARSE EN MACETA.....	10
SELECCIÓN DE LOS AISLADOS CON MAYOR POTENCIAL	
ANTAGONISTA A <i>FUSARIUM</i>	11
UBICACIÓN DE LOTES DE MAÍZ CON PROBLEMAS DE FUSARIOSIS.....	12
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE <i>FUSARIUM</i>	12
Resultados obtenidos	13
Productos obtenidos	14
Conclusiones	14

INTRODUCCIÓN

El proyecto *Obtención y evaluación de un banco de germoplasma de microorganismos nativos de Sinaloa asociados a maíz para desarrollar bioprotectores para el control de Fusarium*, fue financiado por Fundación Produce Sinaloa, A. C., en convocatoria dirigida 2008-2009 para el periodo de enero a mayo de 2009, y responde a la demanda de "Evaluar microorganismos nativos de Sinaloa como bioprotectores ante patógenos (que provocan enfermedades) del cultivo de maíz, tales como *Fusarium* y otros". El objetivo final del proyecto global es la obtención de microorganismos nativos de Sinaloa antagonistas a *Fusarium*, que puedan ser empleados en el campo para el control de la fusariosis en maíz.

En Sinaloa no se contaba en aquel momento con colecciones de microorganismos adecuados para seleccionar antagonistas a patógenos como *Fusarium*, por lo que para lograr el objetivo del proyecto se incluyó la obtención de una colección. En la primera etapa del proyecto, de enero a mayo de 2009, se generó una colección de 11 mil 520 microorganismos nativos de Sinaloa aislados de la rizosfera¹ del maíz. Adicionalmente a la creación de este banco de germoplasma, se estableció en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa, un laboratorio de robótica molecular dedicado exclusivamente a la búsqueda de antagonistas a *Fusarium* sp. de maíz, el cual permitiría, en la siguiente etapa del proyecto, la automatización empleando una plataforma robótica para realizar el inventario molecular de los microorganismos del banco y el escrutinio masivo automatizado de los microorganismos aislados de la rizosfera.

¹ La rizosfera es una parte del suelo inmediata a las raíces, donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos. Las características químicas y biológicas de la rizosfera se manifiestan en una porción de aproximadamente 1 milímetro de espesor a partir de las raíces.



Figura 1. Muestras detectadas mostrando fusariosis en el campo experimental del CIIDIR-Sinaloa.

Las etapas presentadas en el proyecto global son:

1. La obtención de una colección de microorganismos nativos de suelos de Sinaloa, provenientes de la rizosfera del maíz, inventariados e incluyendo la identificación molecular de cada aislado.

2. Estandarización de técnicas *in vitro* de monitoreo masivo automatizado de microorganismos nativos como antagonistas a *Fusarium* con el empleo de robots que realizan manipulaciones masivas exactas y permiten la rápida detección de probables antagonistas.

3. Una vez identificados los posibles antagonistas, llevarlos a nivel semilla y maceta para probar los aislados, tanto solos como en mezclas, para obtener la mejor formulación de un producto antagonista a *Fusarium*.

4. Escalamiento del inóculo y realización de pruebas de validación en campo para probar la efectividad de dichos antagonistas.

5. Obtención de un paquete tecnológico que incluya las dosis del antagonista a usar en campo y su modo de aplicación para obtener protección a *Fusarium* empleando los microorganismos antagonistas derivados del proyecto.

En la etapa 1 del proyecto (junio 2009-mayo 2010) se estandarizaron las metodologías para la automatización del bioensayo de antagonismo a *Fusarium* spp. de manera masiva, empleando los robots; estos también se emplearon para la identificación molecular de cada aislado, y así poder realizar un inventario de la colección de microorganismos adjudicándole un nombre a cada uno de los aislados. En febrero de 2010 ya se tenían los

primeros 1000 microorganismos secuenciados e inventariados y se había realizado el escrutinio masivo de 1500 microorganismos de los 11 mil 520 totales.

Es importante identificar inequívocamente al agente causal de la fusariosis en maíz, para esto hemos colaborado con dos grupos de fitopatólogos de la región (el Dr. Rubén Félix Gastélum de la Universidad de Occidente/Junta local de Sanidad de Ahome y el Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez de la Universidad Autónoma de Sinaloa); para este fin, también se han utilizado las colectas hechas de material infectado por *Fusarium* y de material proveniente de diversos campos, con lo cual se ha creado un pequeño banco o colección de ADN² genómico proveniente de aproximadamente 200 aislados de *Fusarium* sp. obtenidos a partir de plantas enfermas de maíz.

Se propone para la etapa 2, en el ciclo junio 2010-mayo 2011, analizar estos aislados para corroborar molecularmente la identificación morfológica del patógeno como *F. verticillioides*, siendo este un requisito para la tipificación veraz de un hongo patagénico. Del mismo modo, se propone analizar si existen diferencias a nivel genético para agruparlos y tratar de ver si existe correlación entre sus diferencias moleculares con el nivel de patogenicidad.

En mayo de 2010 se contaba ya con el inventario total del banco de germoplasma y un listado de los aislados que muestran los mejores niveles de antagonismo en el laboratorio. Estos resultados serán empleados para que en la siguiente etapa del proyecto, en el ciclo 2010-2011, se prueben los antagonistas identificados en semilla y maceta para poder obtener los candidatos a escalar como inóculo para realizar pruebas en campo, y comprobar la efectividad de los antagonistas en una prueba de validación (2012-2013), y así poder hacer una propuesta de producción comercial para los antagonistas exitosos y proponer el paquete tecnológico de biocontrol de *Fusarium* (a entregar en junio de 2013).

OBJETIVOS

1. Evaluar en semilla la capacidad antagonista a *Fusarium* de los aislados seleccionados en el escrutinio masivo y pruebas *in vitro*.

2. Caracterizar molecularmente los aislados de *Fusarium* que se obtuvieron en el ciclo 2009-2010 con base en su identidad molecular y patrones de amplificación por PCR³ y restricción de los productos de PCR.

3. Evaluar en maceta los aislados seleccionados en semilla inicialmente solos, y una vez que se hayan seleccionado los tres mejores probarlos en combinaciones para seleccionar aquel o aquellos que ofrezcan un mejor control a *Fusarium*.

2 ADN: ácido desoxirribonucleico. Material genético de casi todos los organismos vivos que controla la herencia y se localiza en el núcleo de las células.

3 PCR: la técnica PCR permite el reconocimiento de un organismo reproduciendo muchas veces un solo fragmento de ADN para tener suficiente cantidad del mismo y hacer posible su identificación visual o por medio de la técnica de secuenciación para leer la secuencia del ADN.

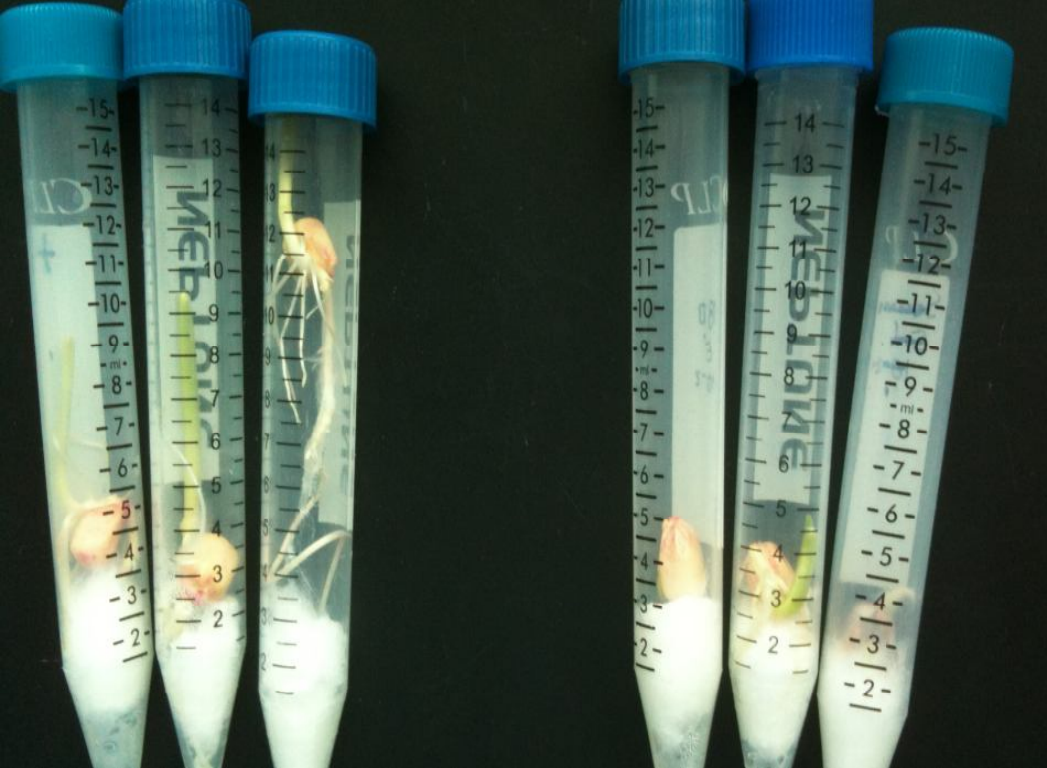


Figura 2. Bioensayo en tubos de ensayo. Se muestran a la derecha algunos aislados en presencia de *Fusarium* y a la izquierda semillas con *Fusarium*.

4. Seleccionar los sitios en los que se llevarán a cabo las pruebas de los antagonistas en campo en el siguiente ciclo agrícola 2011-2012, mediante la visita y evaluación de lotes que presenten fusariosis en este ciclo (2010-2011).

5. Entregar un documento técnico final de avances del proyecto que incluya los resultados de cada uno de los objetivos para continuar la evaluación de los microorganismos potenciales antagonistas a *Fusarium* en etapas posteriores del proyecto global.

METODOLOGÍA

Lista de los 10 mejores aislados para probarse en maceta, obtenida después de realizar las pruebas de antagonismo a *Fusarium* empleando semillas de maíz en condiciones estériles

1. Se inició con el montaje de las pruebas de antagonismo a *Fusarium* en semillas esterilizadas superficialmente de maíz blanco Cebú. Se realizó el proceso de esterilización, se verificó la viabilidad de semillas (mayor de 90 %) y se colocaron 200 semillas para iniciar un ensayo en cuanto finalicen las pruebas confirmatorias de antagonismo (15 de septiembre 2011) en medio sólido de los 622 antagonistas seleccionados en la etapa anterior del trabajo (30 de agosto de 2010).

2. Se finalizó la evaluación de los 622 antagonistas obtenidos en la etapa de medio líquido y se decidió continuar con una prueba de confirmación en

medio sólido, seleccionando 42 aislados con el mejor potencial antagonístico. Además, se incluyó una prueba de hemólisis en agar sangre⁴, para tomar esta como un criterio adicional de selección de los antagonistas a probar en la etapa de maceta (30 de noviembre de 2010).

3. Se están evaluando actualmente los 10 mejores aislados en pruebas de semilla. La actividad está ligeramente desfasada, pero el criterio de selección adicional evitó el monitoreo de un número demasiado grande para las pruebas en semilla. El resultado y la lista se obtendrán a principios del mes de enero de 2011, aunque se iniciará el experimento en maceta desde diciembre para solo aplicar en enero los mejores aislados a las macetas (30 de noviembre de 2010).

4. Se seleccionaron los 14 mejores aislados: aquellos que presentaron actividad antagonista mayor y mostraron solo hemólisis⁵ parcial o no mostraron hemólisis, con lo cual se reduce el riesgo de patogénesis al humano. Se definieron 14 y no 10, porque se concluyó que valía la pena evaluar otros 4 que tenían niveles muy semejantes a los 10 mejores antagonistas (28 de febrero de 2011).

5. Se desarrollaron tres métodos de ensayos en planta: uno en tubo de ensayo, otro en charola de germinación (ambos ensayos fueron muy rápidos, con una duración de dos semanas) y un tercer ensayo con arena en condiciones estériles (con duración de 30 a 45 días). Aún se continúa con una lista de 14 aislados: se definió que estos 14 aislados serían probados todos en los ensayos en planta para tener un mejor rango de selección para la etapa de maceta (21 de julio de 2011).

Selección de los aislados con mayor potencial antagonista a *Fusarium* después de realizar pruebas a nivel maceta con plantas de maíz en condiciones de invernadero

1. Esta actividad se ha iniciado seleccionando los sustratos y diseñando la estrategia experimental a seguir; la fase experimental se ha retardado, ya que el criterio adicional que se incluyó al hacer el monitoreo en medio sólido, retardó una semana el inicio de esta actividad. Sin embargo, el avance realizado en el diseño permitirá cumplir en tiempo y forma con la actividad programada y el resultado esperado (30 de noviembre de 2010).

2. Esta prueba se realizó en planta o semilla con los 14 mejores aislados. Fue necesario modificar el bioensayo para acortar su duración, por lo que se diseñaron diferentes tipos de bioensayo. Se llevaron a cabo para poder colocar los experimentos en maceta a fines de marzo y principios de abril (28 de febrero de 2011).

4 El agar sangre es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con el agregado de 5 % de sangre ovina, también puede usarse sangre humana, para cultivos en una placa de agar. El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia).

5 La hemólisis (eritrocateresis) es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos) por acción de hemolisinas (proteínas excretadas hacia el exterior de la célula, en este caso, por los microorganismos aislados del banco).

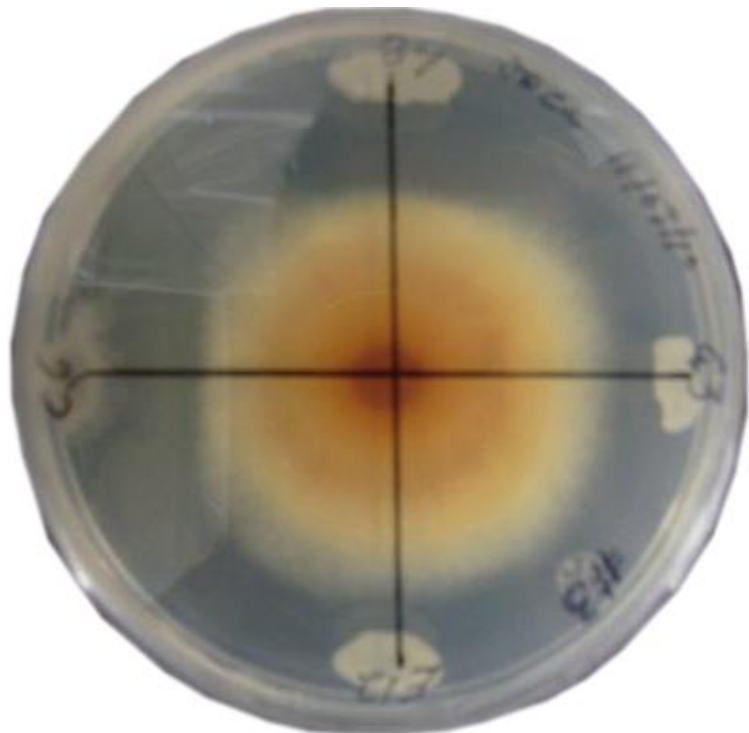


Figura 3. Se investigan microorganismos antagonistas para el control de fusariosis en maíz.

3. Para el 21 de julio de 2011 ya se cuenta con los 14 mejores aislados seleccionados, son el 7, 3, 2, 5, 13, 12, 8, 24, 35, 4, 9, 22, 23 y el 25.

Ubicación de lotes de maíz con problemas de fusariosis, al final del ciclo de cultivo 2010-2011

1. Se inició el programa de visitas en enero de 2011 y se revisó un primer lote en el municipio de Ahome, pero la incidencia de fusariosis fue muy baja. En febrero se planeó una segunda visita, pero se helaron las parcelas de maíz en el norte de Sinaloa. Se reprogramaron estas visitas, siendo necesario desplazarse hacia al sur para ubicar otros lotes con problemas de fusariosis.

2. Para el 21 de julio de 2011 ya se cuenta con tres lotes de validación: Campo Experimental Sinaloa, Campo Experimental La Despensa y el Campo Experimental del CIIDIR-Sinaloa.

Caracterización molecular de los aislados de *Fusarium*, obtenidos en el presente trabajo para confirmar su identidad como *F. verticillioides* y conocer si existen diferentes grupos de patogenicidad

1. Se envió y analizó un grupo de aproximadamente 120 aislados para su secuenciación (30 de agosto de 2010).

2. Se obtuvieron todas las secuencias faltantes. El grupo final de aislados pertenecientes a la especie *F. verticillioides* es de 60. De estos, 43 secuencias ya están confirmadas por secuenciación en ambas direcciones de la hebra del ADN; estaban pendientes secuencias que no se nos habían enviado aún, ya que se agotó uno de los reactivos (un primer). Asimismo, se diseñaron dos estrategias más rápidas para el análisis de los grupos de patogenicidad de *Fusarium* (30 de noviembre de 2010).

3. Se diseñaron un par de estrategias confirmatorias de la identidad de los aislados a nivel molecular. Se están diseñando los métodos para la evaluación de los grupos genéticos resultantes y se tienen ya los primers diseñados y la estrategia de agrupamiento a partir de RFLPs y regiones hipervariables del ADN ribosomal (28 de febrero de 2011).

4. Se completó el análisis molecular, se tienen todas las secuencias y se está complementando el análisis de restricción (21 de julio de 2011).

RESULTADOS OBTENIDOS

1. Los aislados seleccionados fueron 14 (los enumerados como: 7, 3, 2, 5, 13, 12, 8, 24, 35, 4, 9, 22, 23 y 25), todos pertenecientes a diferentes especies del género *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. Estos aislados fueron seleccionados con base en un porcentaje de inhibición mayor a 65 % en pruebas *in vitro* en medio líquido y sólido; también se tomó en cuenta que no fueran beta-hemolíticos, factor que podría sugerir patógenesis al humano.

2. Se identificaron los tres mejores antagonistas, todos del género *Bacillus*: los aislados 13, 23 y 35 fueron los mejores con base en una prueba en plántula en condiciones estériles. Estos tres se seleccionaron porque presentan diferencias estadísticas en relación al control con *F. verticillioides*, y tomando en cuenta su nivel de acuerdo con la tabla de severidad.

3. Se muestrearon y mapearon 12 lotes de cuatro municipios del norte de Sinaloa: Ahome, El Fuerte, Guasave y Sinaloa. Los datos de su localización se presentan en los resultados. Además, se decidió emplear tres lotes de validación para el siguiente ciclo en los campos experimentales: Sinaloa, La Despensa (de Fundación Produce Sinaloa, A. C.) y campo del CIIDIR-Sinaloa (en este último se muestrearon algunas plantas con síntomas de fusariosis). También se incluirán lotes en donde se ha presentado una elevada incidencia de fusariosis en este ciclo. Para cada lote muestreado se hicieron aislamientos a partir de raíces de maíz con síntomas de fusariosis del hongo fitopatógeno⁶ *Fusarium*, se verificó su identidad en medios selectivos, y se confirmará su identidad molecular como *F. verticillioides*.

4. Análisis molecular realizado de los 117 aislados identificados como *F. verticillioides* provenientes de diferentes lotes y partes de la planta de maíz, además de raíz (algunos de grano y tallo). Esto ha permitido verificar al agente causal de la fusariosis como *F. verticillioides*. Se agruparon estos aislados en 21 grupos genéticos diferentes, lo cual permitirá verificar su grado de patogenicidad, con fines de diseñar esquemas de manejo adecuados (donde se tome en cuenta la presencia no solo del patógeno,

⁶ Fitopatógeno: microorganismo que causa daño a los vegetales.

sino de qué grupo genético en un lote para saber qué antagonista emplear y qué medidas tomar).

PRODUCTOS OBTENIDOS

Se obtuvieron los resultados para elaborar un documento técnico, los cuales incluyen:

1. Un listado con las 14 mejores bacterias antagonistas a *Fusarium* evaluadas en semilla, seleccionadas con base en su nivel de inhibición a *Fusarium* en pruebas *in vitro* (mayor a 65 %) y en que no presentan hemólisis completa (tipo beta), la cual está relacionada con patogenicidad al humano.

2. Se identificaron en pruebas estériles en maceta los tres mejores aislados bacterianos, pertenecientes a diferentes especies del género *Bacillus* (13, 23 y 35), que funcionan en planta para probar en maceta.

3. Se obtuvo la ubicación de doce lotes de maíz en cuatro municipios de Sinaloa que presentaron diferentes niveles de incidencia de fusariosis. Se seleccionaron los campos experimentales como los lugares óptimos para evaluar los antagonistas en campo. Y se considerarán lotes, de los que se muestrearán, que presentaron elevada incidencia, para realizar las pruebas de validación de los mejores antagonistas seleccionados en campo.

4. Se corroboró la identidad molecular del agente causal de fusariosis del maíz en 117 aislados de este hongo: además de haber ubicado 21 grupos genéticos diferentes, los cuales serán confirmados en cuanto a su agresividad a la planta de maíz en el siguiente ciclo. El mapeo de los lotes permitirá ubicar grupos genéticos y relacionarlos con su agresividad, con el fin de tomar decisiones para el manejo del cultivo y el control del patógeno.

CONCLUSIONES

Al final de esta etapa se ha obtenido una lista de 14 aislados que fueron evaluados, y se estableció que los tres mejores aislados para probar en maceta pertenecen al género *Bacillus*, que ha sido ampliamente descrito como un antagonista natural de este hongo.

Se corroboró la identificación molecular del agente causal de la fusariosis como *Fusarium verticillioides*, esto es importante ya que da a conocer al agente causal de la enfermedad.

Además, se ubicaron las diferencias a nivel genético entre cada aislado, agrupándolos en 21 grupos genéticos; esto es muy relevante, ya que cada individuo —dependiendo del grupo genético al que pertenezca— es probable que presente diferente grado de agresividad a la planta de maíz; este conocimiento es importante para ubicar aquellos que son más agresivos en el estado, dónde se localizan y sus niveles de agresividad, para un diseño de manejo adecuado.

Esta información, en conjunto con el mapeo espacial de aquellos lotes con fusariosis en el norte de Sinaloa, permite ubicar dónde hay una elevada incidencia del hongo y se ha demostrado su presencia en laboratorio; además, brinda la oportunidad, en el ciclo siguiente, de diseñar dónde

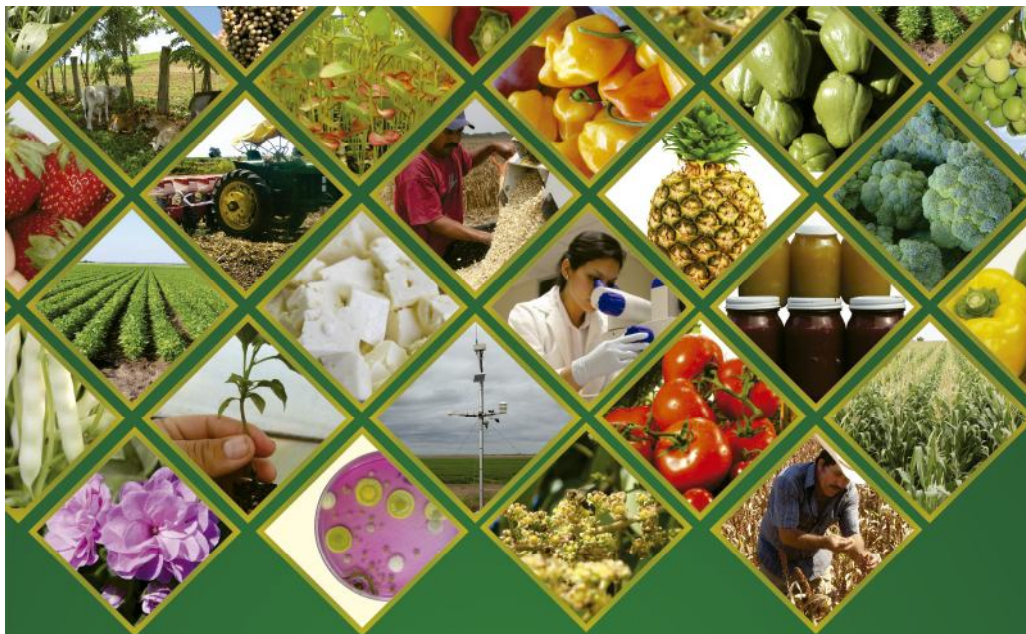


Figura 4. Ensayos en charolas de germinación para evaluar el efecto de aislado sobre esta.

serán colocados los lotes de validación para probar los antagonistas finales en campo.

Nombre del proyecto

Obtención y evaluación de un banco de germoplasma de microorganismos nativos de Sinaloa asociados a maíz para desarrollar bioprotectores para el control de *Fusarium*.



CONSEJO CONSULTIVO ZONA NORTE

Carretera México-Nogales, km 1609
Juan José Ríos, Guasave
Sinaloa, México
Tel. (687) 896-16-70

OFICINAS CENTRALES

Gral. Juan Carrasco Núm. 787 norte
Culiacán, Sinaloa, México
Tels./Fax (667) 712-02-16 y 46
Correos electrónicos:
direcciongeneral@fps.org.mx
divulgacion@fps.org.mx

**FUNDACIÓN
PRODUCE**
Sinaloa A.C.
ENLACE, INNOVACIÓN Y PROGRESO

www.fps.org.mx

