

Rizobacterias Aisladas del Trópico Húmedo con Actividad Antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, Evaluación Cuantitativa e Identificación Molecular

Quantitative Evaluation and Molecular Identification of Rhizobacteria from Tropical Region, Antagonistic Against *Colletotrichum gloeosporioides*

Aracely Macedo Castillo, Aida Martínez Hernández y Joel Lara Reyna. Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, km 17.5 Carretera Haltunchén-Edzná, Sihochac, Champotón, Camp., México. Correspondencia: jlara@colpos.mx

(Recibido: Junio 27, 2011 Aceptado: Diciembre 05, 2011)

Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 30:11-30.

Resumen. Un total de 278 aislamientos bacterianos obtenidos de la rizósfera de cultivos tropicales fueron evaluados *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sólo 31 aislamientos mostraron actividad antagónica con diferentes grados de inhibición. Ensayos cualitativos en confrontación dual, resultaron en la selección de ocho aislamientos con mayor capacidad de inhibición. Para evaluar cuantitativamente la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, se estableció un método basado en estandarizar el inóculo inicial de ambos microorganismos y en digitalizar diariamente el área de crecimiento, tanto de la bacteria como la del fitopatógeno creciendo bajo condiciones de confrontación dual o sin antagonistas. El método permitió comparar la capacidad de inhibición de los ocho aislamientos contra la cepa comercial GB03 de *Bacillus subtilis*; considerando el área de crecimiento del hongo, el crecimiento máximo de las colonias, el tiempo en que inicia el antagonismo, la tasa promedio de crecimiento del hongo, el porcentaje de inhibición, y la zona de inhibición en cada confrontación. Los aislamientos fueron identificados molecularmente mediante secuenciación parcial del gene ribosomal ARNr 16S. Los aislamientos pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*. Estos parámetros permitieron identificar cuatro aislamientos que poseen el mayor potencial para ser evaluados en campo.

Palabras clave adicionales: gene ribosomal, ARNr 16S, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Abstract. A total of 278 bacterial isolates from the rhizosphere of tropical crops were evaluated for its potential to inhibit *in vitro* the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. From these, 31 isolates showed antagonistic activity. Dual confrontation qualitative tests for the 31 isolates resulted in the selection of eight isolates antagonist for *C. gloeosporioides*. To evaluate quantitatively the growth inhibition of *C. gloeosporioides*, we established a method by standardizing the initial inoculum of the antagonistic bacteria and the pathogen while scanning on a daily basis the growth area of both organisms either growing under confrontation or without antagonism. This method allowed the comparison of the ability of inhibition of each strain against a commercial strain by measuring the fungus growth area, the maximum growth of the colonies, the initiation of the antagonism, the average of the daily growth rate of the fungus, the percentage of inhibition, and the inhibition zone in each confrontation. All together, the method allowed an objective determination of the potential as antagonist agents of each isolate. Furthermore the eight isolates were molecularly identified by sequencing the ribosomal gene 16S rRNA, resulting in the identification of genera belonging to *Bacillus* and *Burkholderia*.

Additional keywords: ribosomal gene, 16S rRNA, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Résumé. Un total de 278 isolats bactériens obtenus à partir de la rhizosphère de cultures tropicales a été évalué *in vitro* pour déterminer leur capacité à inhiber la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides*. Seulement 31 isolats ont montré une activité antagoniste avec différents degrés d'inhibition. Les tests qualitatifs de confrontation duelle ont abouti à la sélection des huit isolats avec les capacités d'inhibition les plus. Pour évaluer quantitativement l'inhibition de la croissance de *C. gloeosporioides* a été établie une méthode basée sur la standardisation d'un inoculum initial de chacun des deux organismes et sur la numérisation quotidienne de la zone de croissance, autant

Las bacterias son el tipo más abundante de microorganismos del suelo, debido a que pueden crecer rápidamente y

tienen la capacidad de utilizar un amplio número de fuentes de carbono o nitrógeno. La gran mayoría de las bacterias del suelo interactúan específicamente con la raíz (Lynch, 1991). Esto se debe principalmente a que muchos tipos de compuestos son exudados por la raíz en forma de secreciones (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, carbohidratos complejos, flavonoides, proteínas y mucílago), que son utilizados como nutrientes por las bacterias que colonizan la rizósfera (Chaboud, 1983; Lynch, 1991; Montesinos, 2002). Así, el ambiente de la rizósfera es ideal para la interacción de los microorganismos con la raíz dando como resultado no sólo una gran diversidad de microorganismos presentes, sino una gran competencia entre la comunidad microbiana por alcanzar un nicho en la rizósfera (de Boer *et al.*, 2003). Muchos de aquellos microorganismos que tienen la capacidad de colonizar estos nichos, presentan propiedades que les permiten inhibir la presencia de otros microorganismos. La inhibición del crecimiento de hongos por bacterias nativas del suelo ha sido reconocida como un tipo de antagonismo, documentada y evaluada en diversos laboratorios del mundo (Kajimura *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2002; Cornelis y Matthijs, 2002; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). A pesar del beneficio ecológico derivado del uso de controladores biológicos, la utilización de bacterias como agentes de control biológico a escala comercial es mínima (comparada contra insecticidas químicos) en América latina. Los suelos del sureste mexicano, una zona ecológica tropical altamente diversa, es una zona no evaluada en la búsqueda de aislamientos bacterianos con potencial de utilización como agentes de control natural, que tengan efecto antagonista en contra de fitopatógenos responsables de enfermedades que atacan los cultivos. Desde el punto de vista geológico, la península de Yucatán es una gran roca caliza recientemente emergida del lecho marino, por lo que el material parental de los suelos es calizo en más del 60% (INECOL, 2000), siendo distinto al de la selva tropical de otras regiones del mundo. Por lo tanto, la microbiota edáfica que se desarrolla en la rizósfera de la vegetación adaptada a esos suelos podría presentar características únicas. La microbiota de los suelos calizos de la Península de Yucatán ha sido poco estudiada.

La antracnosis, es una de las enfermedades más importantes del mango (Fitzell *et al.*, 1984; Ploetz, 1999; Nelson, 2008). En México, esta enfermedad se encuentra en todos los estados donde se cultiva mango, provocando daños durante la floración, fructificación y postcosecha (Claridades Agropecuarias, 2010). El agente etiológico, de acuerdo con la literatura, es el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Sin embargo, Phoulivong *et al.* (2010), basado en cinco secuencias génicas, reportan un alto porcentaje en identificación errónea de cepas aisladas en Laos y Tailandia.

En el presente documento, se presenta los resultados del aislamiento, evaluación e identificación molecular de bacterias nativas de la rizósfera de plantas de uso agrícola en el estado de Campeche, las cuales mostraron actividad inhibitoria al crecimiento de *C. gloeosporioides*. Adicionalmente, se propone una metodología alternativa para evaluar cuantitativamente el antagonismo entre

des bacterias que du phytopathogène sous des conditions de confrontation duelle. La méthode a permis de comparer la capacité d'inhibition des huit isolats contre la souche commerciale de *Bacillus subtilis* GB03, en considérant la zone de la croissance fongique, la croissance maximale des colonies, l'instant du début de l'antagonisme, le taux moyen de croissance du champignon, le pourcentage d'inhibition, et la zone d'inhibition dans chaque confrontation. Par séquençage partiel du gène ribosomique ARNr_{16S}, les isolats ont été moléculairement identifiés comme appartenant au genre *Bacillus* et *Burkholderia*. Ces paramètres ont permis d'identifier quatre isolats potentiellement plus adaptés à une expérimentation sur le terrain.

Mots-clés supplémentaires: gène ribosomique 16S ARNr, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Bacteria are the most abundant type of soil microorganisms because they can grow rapidly, also because of their ability to use a large number of either carbon or nitrogen sources. The vast majority of soil bacteria interact specifically with the root (Lynch, 1991). This is mainly due to many types of compounds that are exuded by the root as secretions (amino acids, sugars, organic acids, complex carbohydrates, flavonoid, proteins and mucilage), which are used as nutrients by the bacteria colonizing the rhizosphere (Chaboud, 1983; Lynch, 1991; Montesinos, 2002). Thus, the rhizosphere environment is ideal for the interaction of microorganisms with the root, resulting not only into a great diversity of microorganisms being revealed, but also into a great competition among the microbial community to achieve a niche in the rhizosphere (de Boer *et al.*, 2003). Many of those microorganisms that have the ability to colonize such recesses also have the adequate properties which allow them to inhibit the presence of other microorganisms. Fungal growth inhibition by an indigenous soil bacterium has been recognized as some kind of antagonism, documented and evaluated in several laboratories around the world (Kajimura *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2002; Cornelis and Matthijs, 2002; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). Despite the environmental benefit derived from the proper use of environmental controls, bacteria usage as biological control agents on a commercial scale is minimal (if compared to chemical insecticides) in Latin America. The soils of southeastern Mexico, a highly diverse tropical ecological zone, is an area with a lack of assessment in the search for bacterial isolates with a potential use as natural control agents, which have an antagonistic effect against pathogens responsible for crop diseases. The Peninsula of Yucatan, from a geological point of view, is a limestone seabed recently emerged, so the calcareous soils parent material is over 60% (INECOL, 2000), being different from other jungle tropical regions. Therefore, the soil micro biota developed in the vegetation rhizosphere adapted to these soils could indeed reveal unique characteristics. The micro biota of the calcareous soils from the Yucatan Peninsula has been very little studied.

microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El material vegetal se colectó en tres municipios del estado de Campeche (México) en zonas recién abiertas a la producción agrícola (Cuadro 1). Se colectaron raíces de plantas seleccionadas de forma aleatoria en cultivos de papaya *Carica papaya* (Cayal, Campeche); arroz *Oryza sativa* (Palizada, Campeche); y caña de azúcar *Saccharum officinarum* (Champotón, Campeche). Un total de 30 muestras de raíces de cada especie se colectaron en bolsas de papel, se transportaron al

Anthracoze is one of the major mango diseases (Fitzell *et al.*, 1984; Ploetz, 1999; Nelson, 2008). This disease is present in all of the Mexican states where mango is grown, causing damage during flowering, fruiting and post-harvest stage (Claridades Agropecuarias, 2010). According to literature, the etiologic agent is the *C. gloeosporioides* plant pathogenic fungus. Nevertheless, a high misidentification percentage of isolated strains in Laos and Thailand were reported by Phoulivong *et al.* (2010), based on five gene sequences.

The present study is aimed to present bacteria isolation, evaluation and identification from the native

Cuadro 1. Aislamientos bacterianos obtenidos de raíces de plantas cultivadas en el estado de Campeche, México.
Table 1. Bacterial isolates obtained from roots of plants grown in the state of Campeche, Mexico.

Cultivo	Número	Aislamientos	Municipio
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	116	Pa001 - Pa116	Campeche
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	71	Ar001 - Ar71	Palizada
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	91	Ca001 - Ca091	Champotón
Total	278	-	-

laboratorio en una hielera para mantener las muestras frescas, y se procesaron el mismo día de colecta.

Aislamiento de bacterias. Se utilizó la siguiente metodología: Las raíces de las especies vegetales se lavaron superficialmente con agua destilada estéril. Se maceraron 10g de las raíces previamente cortadas en trozos pequeños, para liberar la mayor parte de bacterias adheridas a la raíz, se depositaron en tubos cónicos de plástico estériles con 15mL de agua destilada estéril con 15% de Tween®20 (Promega). La suspensión se homogenizó con un agitador mecánico vortex durante un tiempo de 10 a 30 seg. Se dejaron en reposo durante 10 min y se agitaron durante 30 seg con vortex. A partir de las suspensiones se hicieron diluciones seriales desde 1/10 hasta 1/1000 con agua destilada estéril. Posteriormente fueron sembrados 200µl de cada dilución en cajas Petri con medio sólido LB (Luria-Bertani). Las cajas se incubaron a 28°C durante toda la noche para el desarrollo de colonias bacterianas. Las colonias que presentaron diferente morfología y coloración se reaislaron en cajas Petri sembrando un máximo de 10 aislamientos por caja.

Discriminación preliminar de aislamientos con actividad antagonista. Todos los aislamientos fueron evaluados en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, mediante ensayos de confrontación y estimación cualitativa. El aislamiento identificado de *C. gloeosporioides*, fue proporcionado por el Dr. Jairo Cristobal Alejo, quién lo obtuvo a partir de cultivos comerciales de mango en Hunucmá (Yucatán). Segmentos de medio LB de 1 cm² aproximadamente, con micelio de *C. gloeosporioides* de siete días de edad, se depositaron al centro de una caja Petri con medio PDA fresco. En cada caja inoculada con el hongo se sembraron

plants rhizosphere for agricultural use in the state of Campeche, which has revealed a *C. gloeosporioides* growth inhibitory activity. Additionally, an alternative methodology to quantitatively evaluate the microorganism antagonism is proposed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. The plant material was collected in three municipalities from the state of Campeche (Mexico), in newly opened areas for agricultural production (Table 1). Plant roots were collected, randomly selected from *Carica papaya* cultures (Cayal, Campeche), *Oryza sativa* rice (Palizada, Campeche) and *Saccharum officinarum* sugar cane (Champoton, Campeche). A total of 30 root samples of each species were collected in paper bags, transported to the laboratory in a cooler to keep the samples fresh, and processed the same day of collection.

Bacterium isolation. The methodology used was: The roots of the plants were washed superficially with distilled water. A total of 10g of the roots were macerated after having them cut in small pieces, in order to release the majority of the bacteria adhering to the root; afterwards, they were placed in small sterile conical tubes with 15mL sterile distilled water with 15% of Tween®20 (Promega). The suspension was homogenized with a vortex mechanical stirrer for 10 to 30 sec. They were allowed to stand for 10 min and stirred for 30 sec with a vortex. Serial dilutions from 1/10 to 1/1000 were made from the suspensions with sterile distilled water. Subsequently, a total of 200µl from each dilution were planted in Petri dishes with LB agar (Luria Bertani). The dishes were then incubated at 28°C overnight to develop bacterial colonies. The colonies presenting different color and morphology were re-isolated in Petri dishes sowing up to 10 isolates per dish.

cuatro diferentes aislamientos bacterianos en cada punto cardinal (Figura 1A). Las cajas se incubaron a 28°C durante ocho días. Se consideró como potenciales antagonistas aquéllos aislamientos que causaron algún grado de inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, alrededor de la zona de crecimiento de las colonias bacterianas. Previamente, se verificó que no hubiera alguna ventaja en el crecimiento de los aislamientos bacterianos y fúngicos en medio LB o PDA.

Evaluación individual de aislamientos bacterianos. Los aislamientos que provocaron inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, fueron evaluados nuevamente confrontando cada aislamiento por separado contra el hongo fitopatógeno. El ensayo de confrontación se realizó conforme a una escala cualitativa (Opelt y Berg

Isolates preliminary discrimination with antagonistic activity. All isolates were evaluated according to their ability to inhibit mycelia growth of the *Colletotrichum gloeosporioides* phytopathogenic fungus throughout confrontation tests and qualitative assessment. The identified *C. gloeosporioides* isolate was provided by Dr. Jairo Cristobal Alejo, who got it from mango commercial cultures in Hunucma (Yucatan, Mexico). The LB medium segments of approximately 1 cm² with seven days *C. gloeosporioides* mycelium were placed at the center of a Petri dish with fresh PDA medium. Four different bacterial isolates were sown in each inoculated dish with the fungus at each cardinal direction (Fig. 1A). The dishes were incubated at 28°C for eight days. The isolates considered as potential antagonists were those causing some degree of

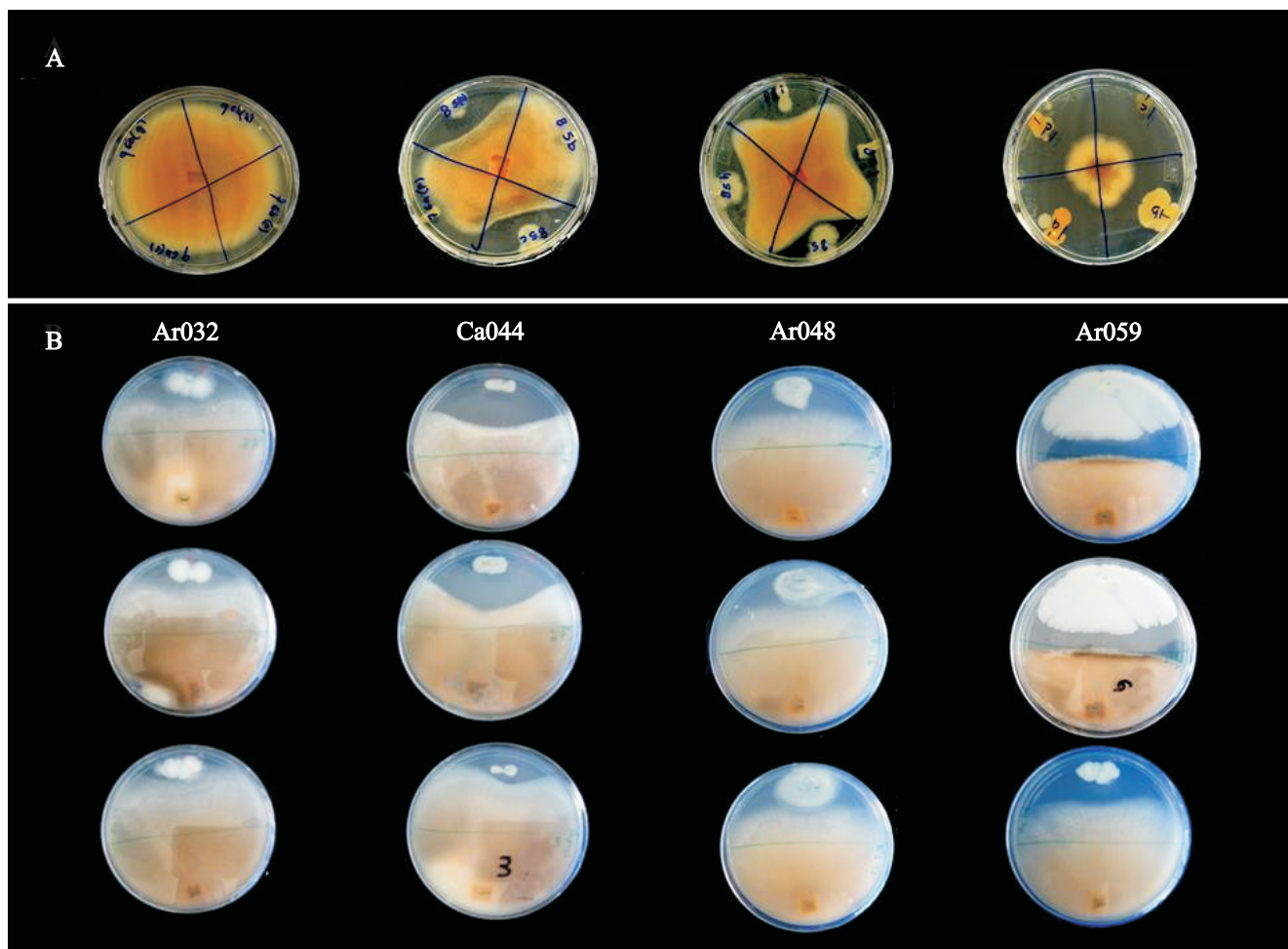


Figura 1. A. Discriminación masiva para seleccionar aislamientos bacterianos que provocan inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. Se ejemplifican grados de antagonismo observados: sin ningún efecto (caja a la izquierda), e inhibición del crecimiento en varios grados (cajas a la derecha). B. Ensayo cualitativo de confrontación dual de *C. gloeosporioides* frente a cuatro de los ocho aislamientos bacterianos preliminarmente seleccionados por su efecto antagonístico; ejemplificando comportamientos heterogéneos (la variabilidad observada) entre repeticiones.

Figure 1. A. Mass discrimination to select bacterial isolates causing *C. gloeosporioides* growth inhibition. The observed antagonism degrees are exemplified: no effect (left box), and growth inhibition in several degrees (right boxes). B. Dual confrontation qualitative essay of *C. gloeosporioides* against four of the eight bacterial isolates preliminarily selected for their antagonistic effect, illustrating heterogeneous behavior (the observed variability) among repetitions.

2004; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). En esta escala, se establecieron cuatro niveles de antagonismo de acuerdo a la distancia entre el borde de la colonia del hongo, y el de la colonia bacteriana, medida en línea recta entre ambos microorganismos: +, < 5 mm; ++, 5.1 a 10 mm; +++; 10.1 a 15mm; +++++, > 15.1mm. Cada aislamiento se evaluó por triplicado en medio LB (Figura 1B). La inhibición del crecimiento se midió al día 23 en todos los experimentos, tiempo en que *C. gloeosporioides* tarda en cubrir la caja Petri creciendo sin confrontación (testigo sin antagonistas).

Evaluación cuantitativa del antagonismo. Cajas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA se inocularon en un extremo, a 1 cm de distancia del borde de la caja, con círculos de 0.785 cm² de medio PDA que contenían micelio joven de *C. gloeosporioides*. Los inóculos se cortaron con sacabocados a partir de la periferia de una colonia de 10 días de edad, para garantizar el mismo estado fisiológico. Por otra parte, los aislamientos bacterianos al ser evaluados, fueron crecidos en LB líquido durante toda la noche. El número de células μ^{-1} de cada cultivo fue determinado midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 530) a 600 nm (DO_{680nm}), y se cuantificó el número de células sembrando una dilución para calcular las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹). Con este valor, se ajustó la DO_{680nm} para que cada cultivo bacteriano tuviera una concentración aproximada de 10^6 células μl^{-1} . Se inocularon $10 \mu l^{-1}$ de cada aislamiento en el extremo contrario a donde se inoculó el hongo. Las confrontaciones, realizadas por triplicado, se incubaron a 28°C. El crecimiento de ambos organismos fue documentado diariamente mediante la digitalización del área de crecimiento que cubrió cada colonia durante 23 días, tiempo previamente estimado en que el hongo cubre el diámetro total de la caja Petri cuando crece sin antagonistas (testigo) (Figura 2). La digitalización se realizó por la parte superior de la caja Petri con un escáner HP 5770®. El escáner se ajustó con la opción de captura “calidad fotográfica” del menú principal, y a la más alta resolución (1200 dpi); las imágenes se guardaron con formato “jpg”. Las imágenes digitalizadas se transformaron en imágenes de alto contraste (blanco y negro) con el software Adobe Photoshpe v 6.0. El cálculo del área en cm² del crecimiento diario se realizó mediante el programa de distribución libre Image Tools V 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) de la siguiente manera: el programa se calibró con una imagen de tamaño conocido en mm, utilizando la herramienta “distance” del menú “analysis”; posteriormente se abrió el archivo de la imagen de alto contraste; en el menú “preferences” se seleccionó la opción “object analysis” y “área”; finalmente con la herramienta “área” se calculan automáticamente las áreas reconocidas en la imagen (solo las de alto contraste), el programa envía los datos a un hoja de cálculo. Como testigo positivo del antagonismo contra *C. gloeosporioides* se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* GB03 (BsGB03), ingrediente activo del biofungicida comercial KODIAK® (Brannen y Kenney, 1997). Para evaluar el grado de antagonismo de cada aislamiento bacteriano se

inhibición de *C. gloeosporioides* mycelia growth around the bacterial colonies growth area. It had been previously shown that there is no advantage derived from the growth of bacterial and fungal isolates in LB medium or PDA.

Bacterial isolates Individual evaluation. The isolates that caused *C. gloeosporioides* growth inhibition were evaluated once again confronting each isolate separately against the plant pathogenic fungus. The comparison test was performed in accordance to a qualitative scale (Opelt and Berg 2004; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). There were four levels of antagonism on this scale according to the distance between the edge of the fungus colony and the edge of the bacterial colony, measured in a straight line between the two microorganisms: +, < 5 mm; ++, 5.1 at 10 mm; +++; 10.1 at 15mm; +++++, > 15.1mm. Each isolate was tested in triplicate in an LB medium (Fig. 1B). Growth inhibition was measured after 23 days in all experiments, which was the time that it takes to *C. gloeosporioides* to cover the Petri dish growing up without confrontation (control without antagonists).

Antagonism quantitative assessment. Petri dishes of a 9 cm diameter with a PDA medium were inoculated at one end 1 cm away from the edge of the dish, with circles of 0.785 cm² PDA medium, containing *C. gloeosporioides* young mycelium. The inoculum was cut with punches from the periphery of a 10 days bacterial colony, looking forward to ensure the same physiological state. Moreover, the bacterial isolates to evaluate were grown in liquid LB overnight. The number of cells μl^{-1} for each culture was determined by measuring the optic density in a spectrophotometer (Beckman Coulter DU 530) at 600 nm (DO_{680nm}), having the number of cells measured by seeding a dilution aiming to estimate the units of forming colonies per millimeter (UFC mL⁻¹). The DO_{680nm} became adjusted after getting such value for each bacterial culture to have an approximated concentration of 10^6 cells μl^{-1} . A total of $10 \mu l$ were inoculated from each isolate at the opposite end from where the fungus had been inoculated. The confrontations performed in triplicate were incubated at 28°C. The growth of both organisms was documented on a daily basis by the growth area scanning that covered each colony for 23 days, which is the time that had been previously estimated for the fungus to cover the overall dish diameter when grown without antagonist (control) (Figure 2). The scanning was performed by the upper part of the Petri dish with a HP 5770® scanner, which was adjusted with the option of capturing “photographic quality” from the main menu, having the highest resolution (1200 dpi) images saved to “jpg” format. The scanned images were transformed into high-contrast images (black and white) with Adobe Photoshop v 6.0. The area daily growth calculation in cm² was carried out using the free distribution program Image Tools V 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). It was used as follows: The program was calibrated by measuring with an image of known size in mm using “distance” from the “analysis” menu; after that, the file of the image of high contrast was opened; subsequently, the “object analysis”

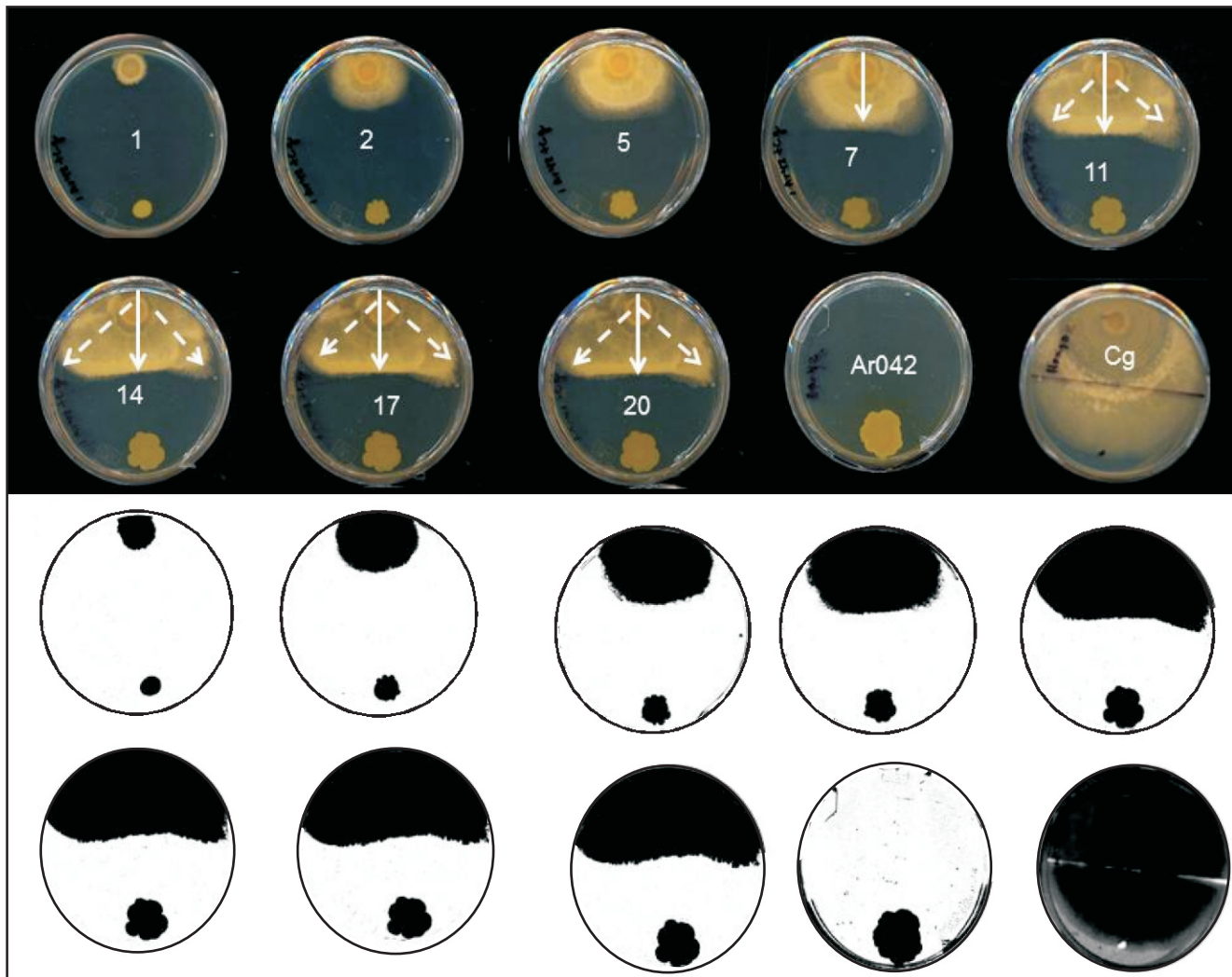


Figura 2. A. Imágenes de la dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* y de un aislamiento bacteriano (Ar042) en confrontación. Los números corresponden al día del registro. Se muestra el tamaño alcanzado al final del experimento (23 días) por *C. gloeosporioides* (Cg) y Ar042 creciendo en forma aislada. Las flechas continuas indican cómo el crecimiento frontal se detiene, y las flechas discontinuas muestran cómo continúa la colonización hacia los lados. B. Digitalización de la imagen del crecimiento de los microorganismos, confrontados o creciendo independientemente, a lo largo del experimento.

Figure 2. A. Images of *C. gloeosporioides* growth dynamics from a bacterial isolate (Ar042) in confrontation. The numbers correspond to the day of registration. The size reached by *C. gloeosporioides* (Cg) and Ar042 at the end of the experiment (23 days) growing in isolation is shown. How the frontal growth stops is indicated by the arrows, and how the colonization continues sideways is indicated by the broken arrows. B. Image scanning of the microorganisms growth, either confronted or growing independently throughout the experiment.

consideraron los siguientes parámetros; midiendo o calculando cada uno de ellos de forma independiente, tanto bajo condiciones de confrontación con cada aislamiento, como con la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación: área cubierta en cm^2 por *C. gloeosporioides* medida diariamente y al finalizar el experimento (23 días); tasa promedio de crecimiento del hongo, en $\text{cm}^2\text{día}^{-1}$; porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del hongo; zona de inhibición en cm^2 . Las curvas de crecimiento fueron construidas en base al promedio de las áreas cubiertas por *C. gloeosporioides* en cada triplicado, medidas diariamente. La tasa promedio de crecimiento se calculó promediando el incremento diario en

was opened from the “preferences” option, as well. Finally, with the “area” tool, the areas recognized in the image were calculated automatically (only those in high contrast). The program sent the data to a spreadsheet. The *Bacillus subtilis* strain GB03 (BsGB03), a KODIAK® commercial fungicide active ingredient (Brannen and Kenney, 1997), was used as a positive control against *C. gloeosporioides*. The parameters considered to evaluate each bacterial isolate antagonism degree were as follows: by either measuring or calculating each one of them independently, under confrontation conditions with each strain, such as those revealed by the BsGB03 control strain; without confrontation: area covered

el área cubierta por el hongo, promediado entre los 23 días de duración del experimento. El porcentaje de crecimiento del hongo en confrontación con respecto a su crecimiento sin antagonistas (100%) fue calculado al finalizar el experimento (23 días). El porcentaje de crecimiento del hongo, sustraído con respecto al 100% (hongo creciendo sin antagonistas), corresponde al valor de porcentaje de inhibición. La zona de inhibición es el área intermedia entre los bordes de las colonias confrontadas, en la cual no crece ninguno de los dos organismos. Los datos de crecimiento se analizaron mediante un diseño completamente al azar con medidas repetidas donde el modelo lineal fue $Y=B+T+e$, donde: Y son las variables medidas (área), B es el efecto de tratamiento de antagonismo de la bacteria, T el tiempo de medición y “e” el error del efecto estudiado. La comparación se realizó mediante el método de T múltiple del paquete estadístico SAS®.

Identificación molecular mediante secuenciación del ARNr 16S. Se realizó un PCR en colonia utilizando un método comúnmente utilizado: los aislamientos crecieron durante toda la noche en 3 mL de LB líquido, en agitación a 150 rpm, a 28°C. Las células se centrifugaron durante 2 min a 12 000 rpm, lavadas dos veces con agua ultrapura estéril, y resuspendidas en 1 ml de agua ultrapura estéril. Para la reacción de amplificación se utilizó 1 µl de una dilución 1/1000 de la suspensión celular, mezcla de reacción Platinum® PCR SuperMix (conteniendo Taq DNA Polimerasa recombinante Platinum®, dNTP's y buffer de Magnesio), y los iniciadores 63f: cag gcc taa cac atg caa gtc y 1387r: ggg cgg wgt gta caa ggc diseñados contra la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) (Marchesi *et al.*, 1998), los cuales generan un fragmento de aproximadamente 1,300 pb. Los productos de amplificación se secuenciaron por ambos extremos (5' y 3') utilizando el mismo par de iniciadores. Las dos secuencias generadas a partir de cada aislamiento se alinearon entre sí utilizando el algoritmo ClustalW del programa MegAlign (DNASTAR Inc.) para identificar la zona de empalme entre ambas, y generar una sola secuencia consenso; cada secuencia consenso fue comparada mediante la herramienta BLASTN contra la base de datos de nucleótidos “nucleotide collection” (nr/nt) del GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), para encontrar secuencias homólogas que nos indicaran la identidad de las bacterias. Alineamientos comparando los consensos contra las secuencias de algunas de las especies con las que presentó homología en el análisis de BLAST se generaron con CLUSTALW. El análisis para mostrar en árboles filogenéticos (fenogramas) los agrupamientos entre las secuencias de ARNr 16S de los aislamientos bacterianos y las secuencias de especies conocidas se generaron con el algoritmo de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), a través de las herramientas disponibles en el Kyoto University Bioinformatics Center (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

RESULTADOS

Aislamientos bacterianos con capacidad antagonista. Un total de 278 aislamientos bacterianos

by *C. gloeosporioides* in cm² measured on daily basis, and at the end of the experiment (23 days); measuring the fungus average growth rate in cm²day⁻¹ calculating the fungus growth inhibition percentage; measuring the inhibition area in cm². The growth curves were built based upon the areas covered by *C. gloeosporioides* in each triplicate, measured on a daily basis. The average growth rate was calculated by averaging the daily increase in the area covered by the fungus, averaged amongst the 23 days of the experiment. The percentage of fungal growth in confrontation, with regards to its growth without antagonists (100%), was calculated at the end of the experiment (23 days). The fungus growth percentage, removed with regards to a 100% (fungus growing without antagonists), corresponds to the inhibition percentage. The inhibition zone is the intermediate area amongst the edges of the confronted colonies, which did not grow in any of the organisms. Growth data were analyzed by a completely randomized design with repeated measures; the linear model was $Y=B+T+e$, where Y stands for the measured variables (area), B is the bacteria antagonism treatment, T the measurement of time, and “e” the error effect under study. The comparison was performed using the T multiple statistic package SAS®.

Molecular identification by ARNr 16S sequencing. A PCR was performed in the colony by a method commonly used: The isolates were grown overnight in 3 mL of liquid LB, stirring at 150 rpm at 28°C. The cells were centrifuged for 2 min at 12 000 rpm, washed twice with sterile ultrapure water, and re-suspended in 1 mL of sterile ultrapure water. A total of 1 µl from a 1/1000 dilution of the cell suspension were used for the amplification reaction, as well as a reaction mixture Platinum® PCR SuperMix (containing Taq DNA Polymerase recombinant Platinum®, dNTP's and magnesium buffer), and the indicators 63f: cag gcc taa cac atg caa gtc and 1387r: ggg cgg wgt gta caa ggc designed against the 16S subunit of the ribosomal ARN (ARNr 16S) (Marchesi *et al.*, 1998), which generated a fragment of approximately 1,300 pb. The amplification products were sequenced from both ends (5' and 3'), using the same pair of primers. Both of the generated sequences from each isolate were aligned with each other using the ClustalW algorithm from the MegAlign program (DNASTAR Inc.), aiming to identify the junction area between them, generating a single consensus sequence, thus; each consensus sequence was compared using the BLASTN tool against the “nucleotide collection” (nr/nt) nucleotide database of the GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), in order to find homologous sequences indicating the bacteria identity. Alignments comparing the consensus against some of the species sequences showing homology in the BLAST analysis were generated with the CLUSTALW. The analysis utilized to show clusters between the ARNr 16S of the bacterial isolates and the sequences of known species in phylogenetic trees (phenograms) were generated with the Neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987), by means of the tools available at the Kyoto University Bioinformatics Center (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

fueron recuperados de la rizósfera de tres cultivos establecidos en zonas productoras del estado de Campeche: se obtuvieron 116 aislamientos de papaya, 71 aislamientos de caña de azúcar y 91 aislamientos de arroz (Cuadro 1). En la evaluación preliminar de la capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, sólo 31 de los 278 aislamientos inhibieron el crecimiento del hongo. Distintos aislamientos bacterianos ejercieron diferentes grados de inhibición del crecimiento del hongo (Figura 1A). En esta primera etapa de discriminación el análisis fue diseñado para evaluar una gran cantidad de aislados bacterianos, por lo que el efecto de cada aislado se registró solamente como positivo, si ejerció algún grado de inhibición sobre el crecimiento del hongo; o como negativo, si no ejerció ninguna inhibición. En los casos en los que no hubo inhibición (247 aislamientos), el hongo creció sobre la colonia bacteriana como se observa en la primer caja de la Figura 1A.

Evaluación cualitativa de antagonismo. Mediante ensayos de confrontación dual se estableció la capacidad individual de cada uno de los 31 aislamientos preseleccionados para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* comparando, al final del experimento, la distancia entre los bordes de las colonias en cada confrontación (Prapagdee *et al.*, 2008). Este tipo de experimentos permite establecer diferencias métricas entre confrontaciones y comparar cualitativamente el antagonismo entre los aislamientos bacterianos. Los resultados de esta evaluación se presentan en el Cuadro 2. Ocho de los aislamientos bacterianos (Ar009, Ar038, Ar042, Ar059, Ar061, Ca039, Ca044, Pa106) mostraron una mayor capacidad para inhibir el crecimiento del hongo. Sin embargo, al evaluar las repeticiones de *C. gloeosporioides*

RESULTS

Bacterial isolates with antagonistic capacity. A total of 278 bacterial isolates were recovered from the rhizosphere of three crops grown in the state of Campeche: the number of isolates obtained were 116 from papaya, 71 from sugarcane and 91 from rice (Table 1). Only 31, out of the 278 isolates, reached to inhibit fungus growth in the preliminary assessment of the ability to inhibit the *C. gloeosporioides* mycelia growth. Different fungal growth inhibition degrees were exerted by the different bacterial isolates (Fig. 1A). A large number of bacterial isolates were designed to be evaluated in this first stage of discrimination analysis; as a result, each isolate was labeled as positive only if a growth inhibition degree had been exerted over the fungal growth, or as negative if no inhibition had been exerted at all. The fungus grew over the bacterial growth in those cases where no inhibition had been revealed (247 isolates), as it can be observed in the first Petri dish on Fig. 1A.

Antagonism qualitative assessment. The individual capacity of each of the 31 isolates preselected to inhibit *C. gloeosporioides* growth comparing, at the end of the experiment, the distance among the edges of the colonies in each comparison was established by using dual confrontation tests (Prapagdee *et al.*, 2008). This type of experiment allows identifying metric differences among confrontations and it aids to perform a qualitative comparison among the bacterial isolates. The results of this evaluation are presented in Table 2. A greater ability to inhibit fungal growth was revealed by eight of the bacterial isolates (Ar009, Ar038, Ar042, Ar059, Ar061, Ca039, Ca044, and Pa106). However, some inconsistencies were observed, in both size and shape of the bacterial colony

Cuadro 2. Evaluación cualitativa de aislamientos bacterianos por confrontación dual para determinar el grado de inhibición a *C. gloeosporioides*.

Table 2. Qualitative assessment of bacterial isolates by dual confrontation to determine the degree of inhibition of *C. gloeosporioides*.

Aislamiento	Origen	Inhibición*	Aislamiento	Origen	Inhibición*
<i>Pa106</i>	papaya	++++	<i>Ar038</i>	arroz	++++
<i>Ca036</i>	caña	++	<i>Ar039</i>	arroz	+
<i>Ca039</i>	caña	++++	<i>Ar040</i>	arroz	+
<i>Ca041</i>	caña	++	<i>Ar041</i>	arroz	+++
<i>Ca042</i>	caña	++	<i>Ar042</i>	arroz	++++
<i>Ca044</i>	caña	++++	<i>Ar043</i>	arroz	++
<i>Ar001</i>	arroz	++	<i>Ar044</i>	arroz	+++
<i>Ar009</i>	arroz	++++	<i>Ar048</i>	arroz	++
<i>Ar013</i>	arroz	++	<i>Ar049</i>	arroz	+++
<i>Ar014</i>	arroz	++	<i>Ar056</i>	arroz	+
<i>Ar017</i>	arroz	+	<i>Ar057</i>	arroz	++
<i>Ar032</i>	arroz	++	<i>Ar058</i>	arroz	++
<i>Ar033</i>	arroz	+	<i>Ar059</i>	arroz	++++
<i>Ar034</i>	arroz	++	<i>Ar060</i>	arroz	++
<i>Ar036</i>	arroz	++	<i>Ar061</i>	arroz	++++
<i>Ar037</i>	arroz	++			

*Escala de inhibición (Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008): < 5 mm (+); 5.1 a 10 mm (++); 10.1 a 15 mm (+++); > 15.1 mm (++++). En cursivas se señalan los aislamientos con mayor efecto.

creciendo en confrontación dual con un mismo aislamiento bacteriano, se observaron algunas inconsistencias ya sea en el grado de inhibición observado, o bien en el tamaño y forma de la colonia bacteriana. Como ejemplo, en la Figura 1B se muestran tres repeticiones del efecto antagonista de cuatro distintos aislamientos (Ar032, Ca044, Ar048, Ar059). Debido a que la cantidad de inóculo inicial de los microorganismos durante la confrontación no fue controlada, el tamaño de las colonias bacterianas variaron entre repeticiones; como se aprecia en el caso de las aislamientos Ca044, Ar048 y Ar059, cuyas colonias variaron claramente de tamaño en al menos una de las repeticiones. Con esta metodología no es posible determinar el grado de variación entre las colonias. En algunos casos, adicionalmente a la variación en el tamaño de la colonia, también se observaron variaciones en la distancia entre los bordes de las colonias confrontadas (Ca044); pero en otros casos, aunque el tamaño de la colonia varió, no se apreciaron diferencias cualitativas en la distancia entre los bordes (Ar059). En casos como Ar032 y Ar048 fue difícil asignar un valor para la distancia entre las colonias confrontadas ya que la forma de las colonias bacterianas es irregular y el borde del micelio es difuso. Por la inconsistencia encontrada entre las repeticiones, se realizaron ajustes a esta metodología para: controlar la cantidad de inóculo de bacterias y hongo al inicio del experimento, homogenizar el estado de desarrollo del micelio inoculado, y para obtener datos cuantitativos comparativos entre los aislamientos a evaluar.

Evaluación cuantitativa del antagonismo de los cultivos bacterianos contra *C. gloeosporioides*. El antagonismo de los ocho aislamientos hacia el crecimiento de *C. gloeosporioides* fue evaluado de forma cuantitativa a través del seguimiento diario del crecimiento de los organismos confrontados; tomando como referencia los crecimientos del hongo y de la bacteria creciendo en forma independiente (Figura 2); como se puede observar en la figura, la imagen editada en alto contraste refleja fielmente la imagen digitalizada original. El registro realizado permitió observar el día en que el crecimiento del micelio del hongo se disminuye hacia la colonia (considerando la Figura 3). A partir de ese momento la colonia del hongo comienza a “achatare” y crece sólo hacia las zonas laterales, fuera de la influencia de la actividad antagónica de los aislados bacterianos (Figura 2A). Esto ocurrió en el día siete en el caso de Ar042, ejemplo mostrado en la Figura 2. En el caso del testigo donde el hongo crece sin antagonistas, la colonia se desarrolló continuamente hasta cubrir por completo el medio de cultivo en el día 23. La digitalización (Figura 2B) permitió convertir la zona cubierta por las colonias, tanto por la bacteria como por el hongo, a un dato preciso de área en cm^2 , y calcular los parámetros utilizados en este trabajo para comparar la capacidad de los ocho aislamientos como antagonistas; así como hacer un análisis estadístico del fenómeno. La dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* en presencia de los ocho aislamientos bacterianos, de la cepa testigo BsGB03, o del hongo creciendo sin antagonistas, se muestra en la Figura 3. Las curvas de crecimiento del hongo en presencia de los antagonistas bacterianos se separan claramente de la curva

when evaluating *C. gloeosporioides* repetitions growing in confrontation with a single dual bacterial isolation. As an example, three repetitions of the antagonistic effect of four different isolates (Ar032, Ca044, Ar048, and Ar059) are shown in Fig. 1B. The size of the bacterial colonies differed among repetitions because the amount of microorganisms initial inoculums during the comparison was not controlled, as seen in the case of the Ca044, Ar048 and Ar059 isolates, whose colonies clearly varied in size at least in one of the repetitions. Consequently, it is not possible to determine the variation degree among colonies with this particular methodology. Moreover, in some cases, variations in distance among the edges of the colonies faced (Ca044) were also observed, in addition to the variation in the size of the colony; nonetheless, in other cases, despite of the variation in colony size, no qualitative differences were observed in the distance among the edges (Ar059). It was hard to assign a value, in cases as Ar032 and Ar048, for the distance among the faced colonies, since the shape of the bacterial colonies was irregular and the edge of the mycelium was diffused. Due to the inconsistency revealed among repetitions adjustments to this methodology were performed in order to control the amount of bacteria inoculums and fungus at the beginning of the experiment, homogenize the state of development of the inoculated mycelium, and to obtain quantitative data by comparing the isolates to evaluate.

Antagonism quantitative evaluation of the bacterial cultures against *C. gloeosporioides*. The antagonism of the eight isolates towards the growth of *C. gloeosporioides* was evaluated quantitatively through daily monitoring of the confronted organisms, with reference to the growth of fungus, as well as the bacteria to grow independently (Figure 2). As shown in the figure, the original scanned image is accurately reflected by the edited image in high contrast. Such record made it possible to observe the day on which the mycelium growth stopped, interrupting the frontal growth towards the antagonist bacterial colony. The fungus colony began to “flatten” from that very moment, starting to grow only to the sides, outside the influence of the bacterial isolates antagonistic activity (Figure 2A). This occurred on the 7th day in the case of Ar042, example shown in Figure 2. Regarding the case of the witness where the fungus grew without antagonists, the colony developed itself continuously to have the culture medium fully covered by day 23.

It was allowed by the scanning (Figure 2B) to turn the area covered by the colonies, for both the bacteria and the fungus, into a data of a precise area in cm^2 , as well as to calculate the parameters used in the study hereby to compare the ability of the eight isolates as antagonists, and to perform a statistical analysis of the phenomenon. The *C. gloeosporioides* growth dynamics in the presence of eight bacterial isolates from the control strain BsGB03, or the fungus growing without antagonists, is shown in Figure 3. The fungus curves growth in the presence of bacterial antagonists is clearly separated from the curve where the fungus grows without antagonists; this is evident, for all isolates, from the 10th day. As shown in the digitalized

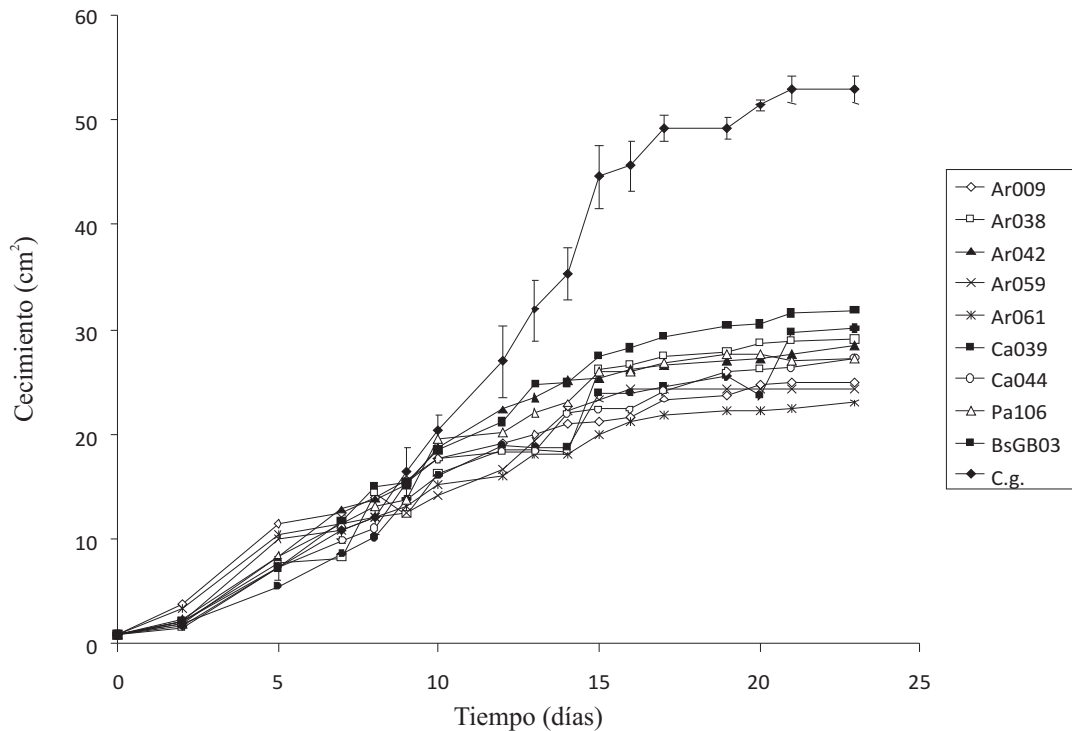


Figura 3. Dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* creciendo en presencia de ocho aislamientos bacterianos, la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación (Cg). Las áreas cubiertas por el crecimiento de *C. gloeosporioides* en tres repeticiones fueron cuantificadas (cm²) con el ImageTool a partir de imágenes digitalizadas. Debido a la densidad de datos se presentan únicamente los valores de la desviación estándar de *C. gloeosporioides* creciendo sin antagonistas.

Figure 3. Growth dynamics of *C. gloeosporioides* growing in the presence of eight bacterial isolates, the control strain BsGB03, or without confrontation (Cg). The areas covered by *C. gloeosporioides* growth in three replicates were quantified (cm²) with the Image Tool from scanned images. Only the *C. gloeosporioides* growing standard deviation values are presented without antagonists.

donde el hongo crece sin antagonistas; esto es evidente, para todos los aislamientos, a partir del día 10. En las imágenes digitalizadas se observó que la interrupción del crecimiento frontal y “achatamiento” de la colonia del hongo ocurrió entre el día siete y nueve, dependiendo del aislamiento (datos no mostrados). En la Figura 4A y el Cuadro 3 se muestra el área final alcanzada por *C. gloeosporioides* creciendo en confrontación dual con cada uno los ocho aislamientos bacterianos, y en los testigos. En todos los casos el área de crecimiento del hongo es significativamente menor ($p < 0.001$) al crecer en confrontación con respecto al testigo creciendo sin antagonistas. Los aislamientos Ar061 y Ar059 son los que más efecto tuvieron sobre el crecimiento del hongo. Todos los aislamientos mostraron tener mayor efecto inhibitorio que la cepa comercial BsGB03 utilizada como testigo. El porcentaje de inhibición ejercida por cada aislamiento bacteriano sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* se muestra en el Cuadro 3. Los aislamientos bacterianos que causaron mayor porcentaje de inhibición fueron Ar061, Ar059 y Ar009; con valores de 56.7, 54.2 y 52.8% de inhibición, respectivamente. La cepa testigo BsGB03 sólo inhibió el 39.9 % del crecimiento del hongo, valor inferior al obtenido con cualquiera de los aislamientos nativos evaluados.

images, it is observed that, depending on the isolation, both the interruption and “flattening” of the fungus colony took place between the 7th and the 9th day (data not shown). The final area reached by *C. gloeosporioides* is shown growing in dual confrontations with each one of the eight bacterial isolates, as well as in controls. The area of fungal growth is significantly lower ($p < 0.001$) in all cases, as these are grown in confrontation to the control which is growing with no antagonists. The Ar061 and Ar059 isolates had the greatest effect on the fungus growth. A higher inhibitory level than the BsGB03 commercial strain, used as control, was revealed by all of the isolates. The inhibition percentage for each bacterial isolate exerted on *C. gloeosporioides* growth is shown on Table 3. The bacterial isolates causing the highest inhibition percentage were Ar061, Ar059 and Ar009; with values of 56.7, 54.2 and 52.8% inhibition, respectively. The BsGB03 control strain only reached to inhibit 39.9% of the fungus growth, which is below the values obtained by any of the native isolates tested.

A change in growth rate is implied by the change in the slope of the fungus growth curves confronted by the antagonistic bacteria (Figure 3). As it is shown in Fig. 4B, this value decreased in all cases by the effect derived from the antagonistic bacteria. Highly significant differences

Cuadro 3. Área total final (cm²) alcanzada a los 23 días por *C. gloeosporioides* y los aislamientos bacterianos; creciendo individualmente o en confrontación dual.

Table 3. Final total area (cm²) achieved at 23 days for *C. gloeosporioides* and bacterial isolates, growing singly or in dual confrontation.

Aislamiento	H	Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> (%)	B	B*	Zona de inhibición**
Ar038	29.0 ± 4.0	45.1	5.9 ± 0.8	3.0 ± 0.03	31.6 ± 2.8
Ca039	30.0 ± 2.6	43.2	8.5 ± 2.8	7.8 ± 0.6	25.8 ± 1.2
Ca044	27.2 ± 1.5	48.5	13.0 ± 1.4	13.6 ± 2.6	26.1 ± 0.8
Pa106	27.2 ± 2.3	48.7	6.1 ± 1.2	10.3 ± 0.2	22.8 ± 1.9
Ar009	25.0 ± 6.8	52.8	4.3 ± 0.6	3.00 ± 1.00	35.6 ± 3.4
Ar042	28.4 ± 2.5	46.2	4.00 ± 0.5	2.2 ± 0.3	33.0 ± 2.3
Ar059	24.2 ± 0.81	54.2	50.6 ± 1.6	31.4 ± 2.0	8.0 ± 1.0
Ar061	22.9 ± 2.0	56.7	51.5 ± 2.5	12.1 ± 1.2	28.6 ± 1.7
Bs GB03	31.8 ± 1.9	40	5.1 ± 0.6	6.3 ± 1.4	25.5 ± 1.3
<i>C. gloeosporioides</i> *	52.9 ± 1.3	-	-	-	-

H: *C. gloeosporioides* creciendo en confrontación con cada aislamiento bacteriano.

B: Aislamiento bacteriano creciendo individualmente.

B*: Aislamiento bacteriano creciendo en confrontación dual.

* Área total de hongo, al final del experimento creciendo sin confrontación.

** Área que no es cubierto por el crecimiento de los microorganismos.

El cambio en la pendiente de las curvas de crecimiento del hongo confrontado con las bacterias antagonistas (Figura 3), implica un cambio en la tasa de crecimiento. La Figura 4B muestra que, en todos los casos, este valor disminuyó por efecto de las bacterias antagonistas. El análisis estadístico, mostró diferencias ($p < 0.001$) en la tasa de crecimiento del hongo confrontado con todos los aislamientos bacterianos, con relación al testigo sin confrontación. *C. gloeosporioides* creció a una tasa promedio de 2.69 cm² día en ausencia de antagonistas, mientras que el crecimiento del hongo en confrontación varió entre 0.88 y 1.42 cm² día⁻¹. Las menores tasas promedio de crecimiento se observaron en confrontación con Ar061 y Ar059, seguidas por Ar009, Pa106, Ar042, Ca044 y la cepa testigo BsGB03. El aislamiento Ar061 fue el que más inhibió el crecimiento del hongo, disminuyendo su tasa de crecimiento a 0.88 cm² día⁻¹ (tres veces menor que en el testigo). En la Figura 5 se muestra una imagen, al final de la evaluación, de una repetición de los experimentos de confrontación dual de *C. gloeosporioides* contra cada uno de los ocho aislamientos bacterianos, y los testigos. Conforme con los análisis anteriores, se observa que el tamaño de la colonia de *C. gloeosporioides* es menor en cualquiera de los ensayos de confrontación que cuando crece sin antagonistas. Adicionalmente se observa que la coloración de la colonia fúngica también se alteró en respuesta a la confrontación con algunos aislamientos; y que hay gran variación en el tamaño de las diferentes colonias bacterianas, así como en el área sin crecimiento entre los bordes de ambas colonias (zona de inhibición). Los valores del área cubierta por las colonias bacterianas, y los de las zonas de inhibición, se reportan en el Cuadro 3. Ar061 y Ar059, los dos aislamientos que mostraron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de

were revealed by the statistical analysis ($p < 0.001$), in the fungus growth rate when confronted with all of the bacteria isolates with regards to the control without confrontation. A 2.69 cm² day⁻¹ average growth rate was revealed as well by *C. gloeosporioides* in the absence of antagonists, whereas the fungus growth in comparison varied between 0.88 and 1.42 cm² day⁻¹. The lowest average growth rates were observed in comparison with Ar061 and Ar059, followed by Ar009, Pa106, Ar042, Ca044 and the control strain BsGB03. The Ar061 was the most inhibiting isolation of the fungus growth, having its growth declining to 0.88 cm² day⁻¹ three times lower than in the control). An image of a repetition, at the end of the evaluation, of the *C. gloeosporioides* dual confrontation experiments against each of the bacterial isolates and witnesses, is shown in Figure 5. Consistent with previous analyses, it is clear that the size of the *C. gloeosporioides* colony is lower in any of the confrontation tests as when it is grown without antagonists. Additionally, it was observed that the fungal colony coloration was also altered in response to the confrontation with some isolates, and that there was a great variation in the size of individual bacterial colonies, as well as in area without any growth among the edges of both colonies (inhibition zone). The values of the area covered by the bacterial colonies and the inhibition zones are reported in Table 3. Both Ar061 and Ar059, which were the two isolates revealing a higher inhibitory effect on *C. gloeosporioides* growth (Figure 4) had an invasive behavior, generating large colonies that competed against the fungus colony for the available space, as well as a comparatively small inhibition zone (Figure 5).

Conversely, the largest inhibition zones were observed on Ar009, Ar038 and Ar042 isolates (35.6, 31.6 and 33.0 cm², respectively). The colonies of these three

C. gloeosporioides (Figura 4), presentaron un comportamiento invasivo, generando colonias extensas que compiten con la del hongo por el espacio disponible, así como una zona de inhibición relativamente pequeña (Figura 5). Por el contrario, las zonas de inhibición más extensas se observaron con los aislamientos Ar009, Ar038 y Ar042 (35.6, 31.6 y 33.0 cm², respectivamente). Las colonias de esos tres aislamientos bacterianos fueron las de menor tamaño, cubriendo áreas de 3.0, 3.0 y 2.2 cm², respectivamente (Cuadro 3); áreas de 10 a 14 veces menos extensas que la cubierta por Ar059. El análisis conjunto de todas las curvas de crecimiento, tanto de *C. gloeosporioides* como de las bacterias, confrontados o sin confrontación, no permitió identificar dos diferentes tipos de comportamiento entre los ocho aislamientos analizados. En un grupo de aislamientos, conformado por Ar009, Ar038, Ar042, Ca039, Ca044 y Pa106, los cuales desarrollan una colonia relativamente pequeña y generaron una amplia zona de inhibición (Figura 5), la pendiente de la curva de crecimiento del fitopatógeno se modificó alrededor del día siete, reduciendo su tasa de crecimiento, alcanzando la fase estacionaria de la curva prematuramente con respecto al crecimiento del hongo sin confrontación y disminuyó de forma importante el área final cubierta por el hongo. En cambio, las curvas de crecimiento de la bacteria, en presencia y en ausencia de *C. gloeosporioides*, indicaron que el hongo no tiene efecto, o tuvo un efecto inhibitorio mínimo (Ar038), sobre el crecimiento de las bacterias. Ejemplos de esa respuesta se muestran en la Figura 6A (cepa testigo BsGB03) y Figura 6B (Ar042). En el otro grupo de aislamientos, conformado por Ar061 y Ar059, cuya colonia creció de forma invasiva cubriendo por completo el área disponible en la caja Petri cuando se sembraron individualmente (Figura 6C), mostraron una zona de inhibición poco extensa (Figura 5), las curvas de crecimiento, tanto del fitopatógeno como de su antagonista, se modificaron al crecer en confrontación con respecto a cuándo crecieron de forma aislada; como se muestra, para el caso de Ar059 (Figura 6C). La presencia del hongo en la confrontación dual inhibe el crecimiento de Ar061 y Ar059 (Cuadro 3).

Identificación molecular de aislamientos bacterianos. Los iniciadores universales reportados previamente (Marchesi *et al.*, 1998), amplificaron un fragmento de ARNr 16S de aproximadamente 1300 pb a partir de los ocho aislamientos seleccionados. Las secuencias consenso fueron depositadas en el GenBank con el número de acceso presentado en el Cuadro 4. Mediante el análisis BLAST se encontró que las secuencias de los diversos aislamientos presentaron una alta identidad (99%), con secuencias previamente reportadas para el género *Burkholderia* (*Pseudomonas*) o *Bacillus* (Cuadro 4). Para establecer con más precisión la posible identidad, a nivel de especie de las bacterias aquí caracterizadas, secuencias de diversas especies de *Burkholderia* o *Bacillus* homólogas en un 99% a nuestras secuencias consenso, se alinearon y posteriormente se agruparon mediante un análisis filogenético generando el fenograma presentado en la Figura 7. El agrupamiento de las secuencias de ARNr 16S

bacterial isolates were the smallest, covering areas of 3.0, 3.0 and 2.2 cm², respectively (Table 3), which were areas 10 to 4 times smaller than that covered by Ar059. The combined analysis of all of the growth curves, from both *C. gloeosporioides* and bacteria, either with or without confrontation, were not sufficient to identify the two different types of behavior among the eight tested isolates: The slope of the growth curve of the phytopathogen became modified around day seven in a group of isolates formed by Ar009, Ar038, Ar042, Ca039, Ca044 and Pa106, which developed a relatively small colony, and generated a large inhibition zone (Figure 5), reducing its growth rate and reaching the curve stationary phase prematurely with regards to the fungus growth without confrontation, decreasing the final area covered by the fungus, significantly. Nevertheless, it was not indicated by the bacteria growth curves in the presence and absence of *C. gloeosporioides* that the fungus does neither have nor had a minimal inhibitory effect (Ar038) on bacteria growth. Examples of this behavior are shown on Figure 6 (BsGB03 control strain) and on Figure 6B (Ar042). The growth curves of both the plant pathogen and its antagonists became clearly modified as those grew in confrontation with regards to the point where they were grown in isolation, as shown for the Ar059 case, in the other group of isolates formed by Ar061 and Ar059 (Table3), whose colony grew invasively, fully covering the area available in the Petri dish when grown individually (Fig. 6C), and showing a very extensive inhibition zone.

Bacterial Isolates molecular identification. A fragment of ARNr 16S, of approximately 1300 bp from the eight selected isolates, was amplified by the universal primers previously reported (Marchesi *et al.*, 1998). The consensus sequences were deposited in the GenBank under the access number shown in Table 4. It was revealed, by BLAST analysis, that the sequences of several isolates had a high identity (99%) with sequences previously reported for the *Burkholderia* (*Pseudomonas*) or *Bacillus* genus (Table 4). Sequences from diverse *Burkholderia* or *Bacillus*, 99% homologous to our consensus, were aligned and then pooled

Cuadro 4. Identificación de aislamientos bacterianos por homología del ARNr 16S.

Table 4. Identification of bacterial isolates by 16S rRNA homology.

Aislamiento	GenBank	Mejor Hit	Homología ^x
Ar009	JF 962418	<i>Burkholderia</i>	99%
Ar038	JF 962419	<i>Burkholderia</i>	99%
Ar042	JF 962416	<i>Bacillus</i>	99%
Ar059	JF 962417	<i>Bacillus</i>	99%
Ar061	JF 962420	<i>Burkholderia</i>	99%
Ca039	JF 962422	<i>Bacillus</i>	99%
Ca044	JF 962421	<i>Bacillus</i>	99%
Pa106	JF 962423	<i>Bacillus</i>	99%

^xLa homología es con referencia al género mencionado (p.ej. 99% similar a *Burkholderia*).

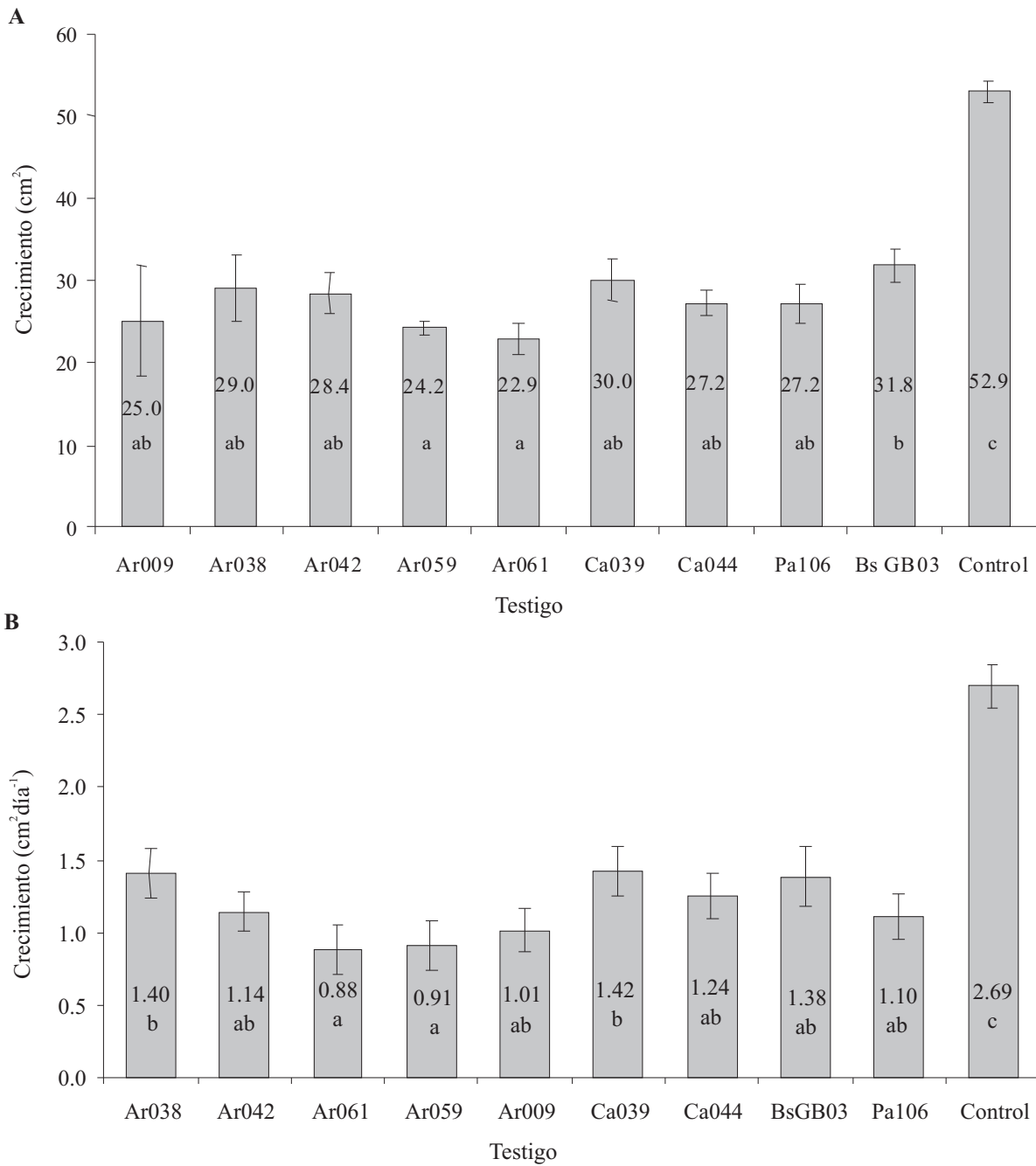


Figura 4. Cuantificación del efecto de aislamientos bacterianos sobre el crecimiento *C. gloeosporioides*. A. Área de crecimiento total de *C. gloeosporioides* al final de la evaluación con los ocho aislamientos, comparando con la cepa testigo BsGB03, o creciendo sin antagonistas (Cg). B. Tasa promedio de crecimiento diario de *C. gloeosporioides* confrontado con los ocho aislamientos bacterianos, la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación. Los valores dentro de las columnas corresponden al área total final (cm²) o a la tasa de crecimiento (cm²día⁻¹), (A y B, respectivamente). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.001).

Figure 4. Quantification of the bacterial isolation effect on *C. gloeosporioides* growth. A. Area of *C. gloeosporioides* total growth at the end of the evaluation with the eight isolates, compared to the BsGB03 control strain, or growing without antagonists (Cg). B. Average rate of *C. gloeosporioides* daily growth with the eight bacterial isolates, the BsGB03 control strain, or without confrontation. Values within the columns correspond to the final total area (cm²) or to the growth rate (cm²day⁻¹), (A and B, respectively). Values with the same letter are not significantly different (p<0.001).

muestra que los aislamientos Ar061 y Ar038 quedan ubicados dentro del grupo similar a *Burkholderia lata* y Ar009 es más similar a *Burkholderia cepacia*. Los aislamientos Ar042, Ca039 y Ar059, quedan agrupados dentro del grupo de *Bacillus cereus*; Ca044 queda ubicado dentro del grupo similar a *Bacillus subtilis*; y Pa106 se asocia al grupo de *Bacillus pumilus*. Los cinco aislamientos bacterianos relacionados mediante el análisis molecular a especies del género *Bacillus* presentaron la morfología típica correspondiente a este género en cuanto al crecimiento de la colonia (Figura 5), morfología celular en estado vegetativo, y formación de esporas (datos no mostrados). Es importante mencionar que frecuentemente las colonias de los aislamientos identificados como *Bacillus*, debido a la motilidad de la bacteria, muestran una forma irregular emitiendo lóbulos digitiformes, como es el caso de Pa106 en la Figura 5. Se observó que en este aislamiento, la emisión de estos lóbulos se incrementó en los últimos días de la evaluación (datos no mostrados), ocasionando que los datos de área de la bacteria creciendo en confrontación se muestre como estimulada por la presencia del hongo con respecto a su tamaño creciendo de forma aislada.

DISCUSIÓN

Es difícil establecer la potencialidad de algún aislamiento basado únicamente en la evaluación cualitativa del área de inhibición al final de una confrontación. Tratando de incrementar la exactitud de las mediciones, algunos trabajos reportan el crecimiento radial de las colonias mediante el uso de micrómetros (Tequida *et al.*, 2002); este tipo de medición, asume que el crecimiento radial es una variable constante en todas sus direcciones, sin embargo la colonia desarrollada casi nunca es un círculo perfecto. Ejemplos de esta situación es reportado por Ramos *et al.* (2010), en ambos trabajos evalúan ascomycetes en su actividad antagonista contra *Phytophthora capsici*; aunque miden el radio para calcular el área, tanto de la colonia del hongo como de los ascomycetes, se demuestra el crecimiento irregular de las colonias. A diferencia de lo anterior, en nuestra evaluación, el método de digitalización y la medición de las áreas de crecimiento permitió, independientemente de la forma de la colonia, hacer comparaciones precisas entre aislamientos bacterianos mediante parámetros cuantitativos como: el tamaño de las colonias confrontadas al final de la evaluación, la tasa promedio de crecimiento, el porcentaje de inhibición, y el tamaño final de la zona de inhibición; los cuales consideramos descriptores igualmente importantes para evaluar la potencialidad de algún aislamiento. Estos parámetros nos permitieron establecer, cuantitativa y estadísticamente, que ocho aislamientos bacterianos de la rizósfera de plantas cultivadas en el trópico húmedo, inhiben el crecimiento de *C. gloeosporioides in vitro*, con igual o mayor capacidad que la cepa comercial BsGB03. En términos aplicados, la selección de un aislamiento para su utilización en el control de un patógeno, se basa en su capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno. A nuestro criterio, los aislamientos con mayor potencial para ser evaluados en campo, en orden de importancia son

using a phylogenetic analysis to generate the dendrogram shown in Fig. 7, looking forward to establish a more precise possible identity, at species level, of the bacteria characterized in the study hereby. It was revealed by the grouping of the ARNr 16S sequences that the Ar061 and Ar038 isolates were located within the group similar to *Burkholderia lata*, and that Ar009 was more similar to *Burkholderia cepacia*. The Ar042, Ca039 and Ar059 isolates are grouped within the *Bacillus cereus* group; Ca044 was located within the group similar to *Bacillus subtilis*, and Pa106 was associated to the *Bacillus pumilus* group. A typical morphology was revealed by the five bacterial isolates related by molecular analysis to the *Bacillus* genus species, regarding colony growth and cell morphology, in both vegetative and spore formation (data not shown). It is noteworthy that an irregular shape and finger emitting lobes is often shown by the colonies from the isolates identified as *Bacillus*, as it is the case of Pa106 in Fig. 5. It was observed that for this isolation the issuance of these lobes increased in the last days of evaluation (data not shown), causing the data of the bacterial area growing in confrontation to display itself as stimulated by the presence of the fungus with regards to its size growing in isolation.

DISCUSSION

It is difficult to establish the potential based solely on the inhibition area qualitative assessment at the end of a confrontation. Aiming to increase measurement accuracy, the radial growth of some colonies has been reported to be measured by using micrometers (Tequida *et al.*, 2002). As a consequence, it is assumed by the use of such measurements that the radial growth is a constant variable in all of its directions; however, the developed colony is not likely to make a perfect circle. Examples of this situation are reported by Ramos *et al.* (2010); ascomycetes in their antagonistic activity against *Phytophthora capsici* are evaluated in both of these studies. The irregular growth of the colonies is demonstrated by these studies, even though the radius is measured in order to calculate the area of both the fungus colony and the ascomycetes. Unlike the above, it was allowed by the scanning method and the growth areas measurement, in the study hereby, to make accurate comparisons among bacterial isolates by quantitative parameters, such as: size of the colonies confronted at the end of the evaluation, average growth rate, inhibition percentage and the final size of the inhibition zone, regardless the shape of the colony, which were considered as equally important descriptors to assess the potential for isolation. It was allowed by these parameters to establish, both quantitatively and statistically, that eight bacterial isolates from the rhizosphere of plants grown in the humid tropics reach to inhibit *C. gloeosporioides* growth *in vitro*, with equal or even greater capacity than BsGB03 commercial strain. The isolate selection, in terms applied for its utilization in pathogen control, is based on their ability to inhibit the growth of the pathogen. Considering, based on parameters set forth herein, the isolates with the greatest potential to be evaluated in the field, in order of importance, are Ar009, Ar042, Ar038 and Ca039. The fungus growth rate

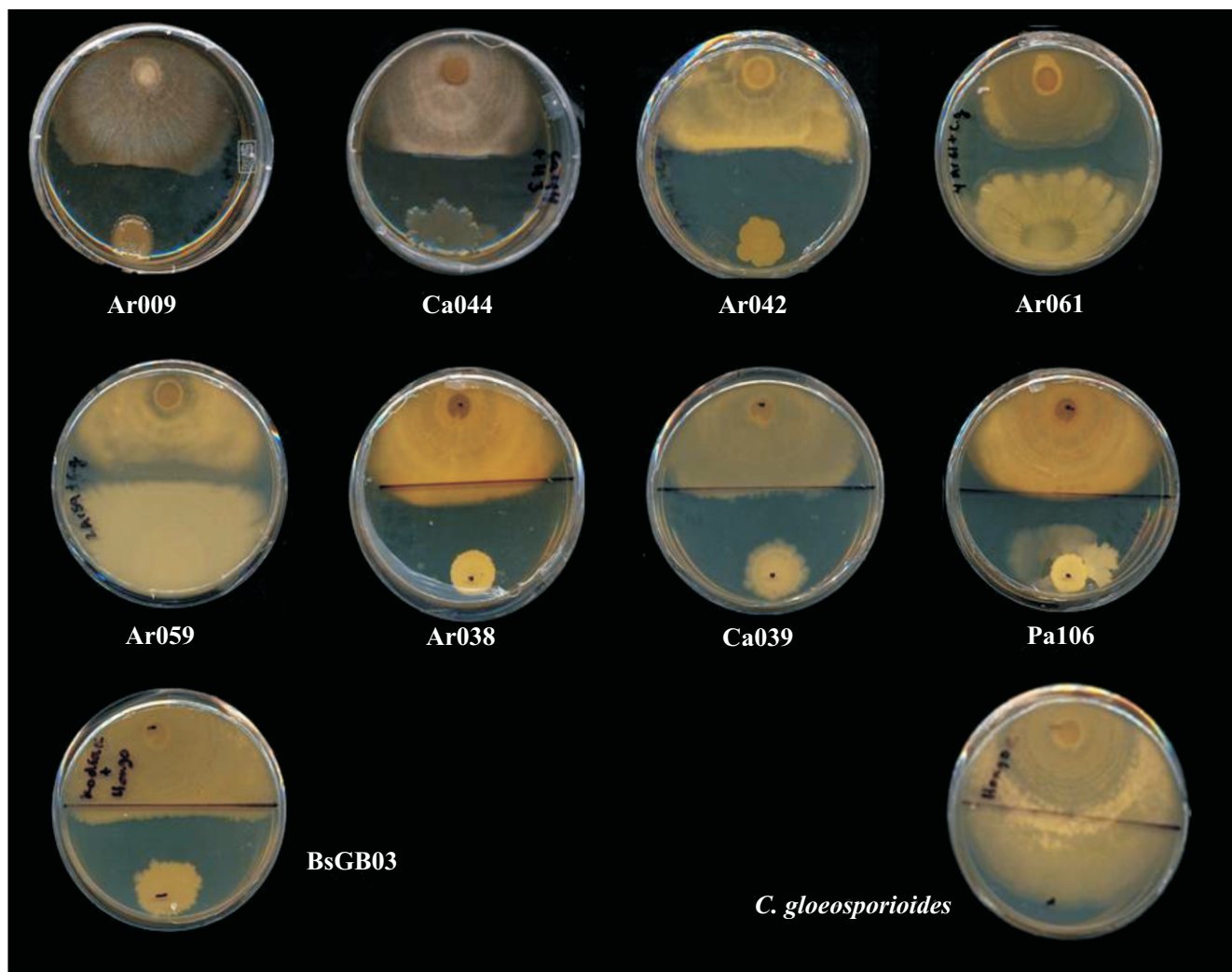


Figura 5. Imagen del efecto inhibitorio de ocho aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* al final de la evaluación (23 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

Figure 5. Picture of eight bacterial isolates inhibitory effect on *C. gloeosporioides* growth at the end of the evaluation (23 days), comparing with its growth in isolation.

Ar009, Ar042, Ar038 y Ca039. Todos estos aislamientos redujeron la tasa de crecimiento del hongo mostrando mayor inhibición que la cepa comercial; generaron amplias zonas de inhibición (efecto a distancia), sin requerir desarrollar una colonia muy extensa para ejercer su efecto antagonista; y adicionalmente no hay efecto fuerte de antagonismo del hongo sobre las bacterias. La utilidad de estos aislamientos como agentes de control biológico debe ser confirmada con una evaluación en campo.

Entre los mecanismos reportados por bacterias para la inhibición del crecimiento en hongos, se menciona la generación de metabolitos inhibidores liberados al medio circundante, y la inhibición por competencia (de Weger *et al.*, 1986; Juhnke *et al.*, 1987; Besson y Michel, 1990; Eshita *et al.*, 1995). No fue objetivo de este trabajo identificar el mecanismo de inhibición de los aislamientos evaluados. Sin embargo, los resultados observados durante el desarrollo de *C. gloeosporioides* en confrontación con los

was reduced by all of these isolates, generating large inhibition zones (distance effect) showing a greater inhibition than the commercial strain, without needing to develop a larger colony to exert its antagonistic effect; furthermore, there is a lack of a strong fungus antagonistic effect on the bacteria. The service of these isolates as biological control agents must be confirmed by a field evaluation.

The generation of inhibiting metabolites to the surrounding medium, as well as the inhibition by competence, has been reported among the mechanisms for bacteria by fungal growth inhibition (de Weger *et al.*, 1986; Juhnke *et al.*, 1987; Besson and Michel, 1990; Eshita *et al.*, 1995). The present study was not aimed to identify the isolates tested inhibition mechanism. However, it is suggested by the results obtained during *C. gloeosporioides* development in confrontation with the Ar009, Ca044, Ar042, Ar038, Ca039 and Pa106 isolates, that in a clear

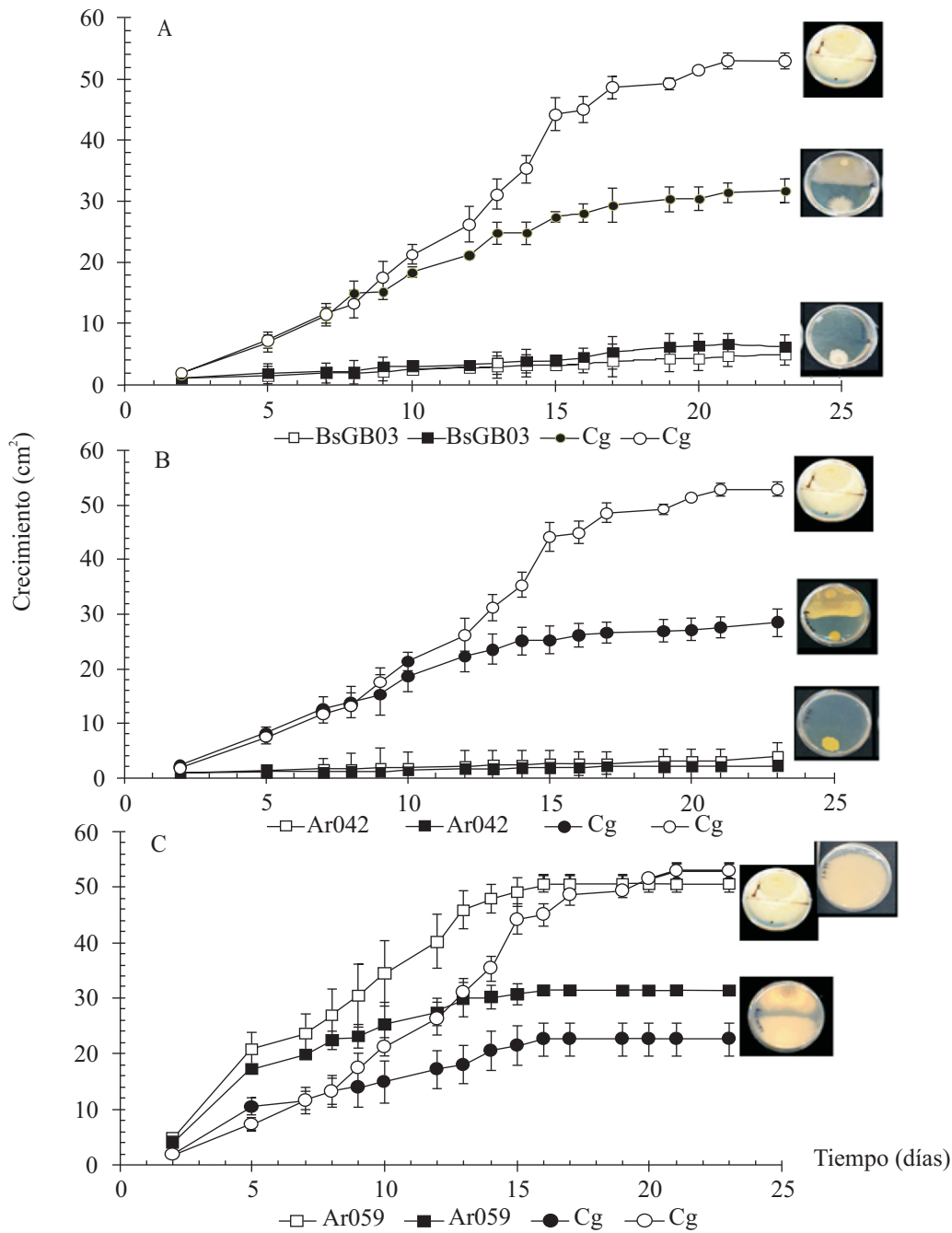


Figura 6. Dinámica de crecimiento de *C. gloeosporioides* y del antagonista creciendo bajo condiciones de confrontación o de forma aislada. Se ejemplifican dos diferentes comportamientos identificados: BsGB03 (A) y Ar042 (B), los cuales no se afectaron por la presencia del hongo; y Ar059 (C), la cual se inhibe al crecer en presencia del hongo. A la derecha de cada curva de crecimiento se muestra la imagen correspondiente al punto final de cada evaluación. Crecimiento de *C. gloeosporioides* sin antagonistas (○); *C. gloeosporioides* en confrontación (●); crecimiento del aislamiento bacteriano (□); aislamiento bacteriano en confrontación (■). Las barras verticales indican el error estándar para cada dato.

Figure 6. Growth dynamics of *C. gloeosporioides* and the antagonist growing under either confrontation or isolation conditions. The identification of two different behaviors, BsGB03 (A) and Ar042 (B), are exemplified, which were not affected by the fungus presence; Ar059 (C), which becomes inhibited as it grows in the presence of the fungus. The image corresponding to the end of each assessment is shown to the right of each growth curve. The *C. gloeosporioides* growth without antagonists (○); *C. gloeosporioides* in confrontation (●); bacterial isolate growth (□); bacterial isolate in confrontation (■). The standard error for each data is indicated by the vertical bars.

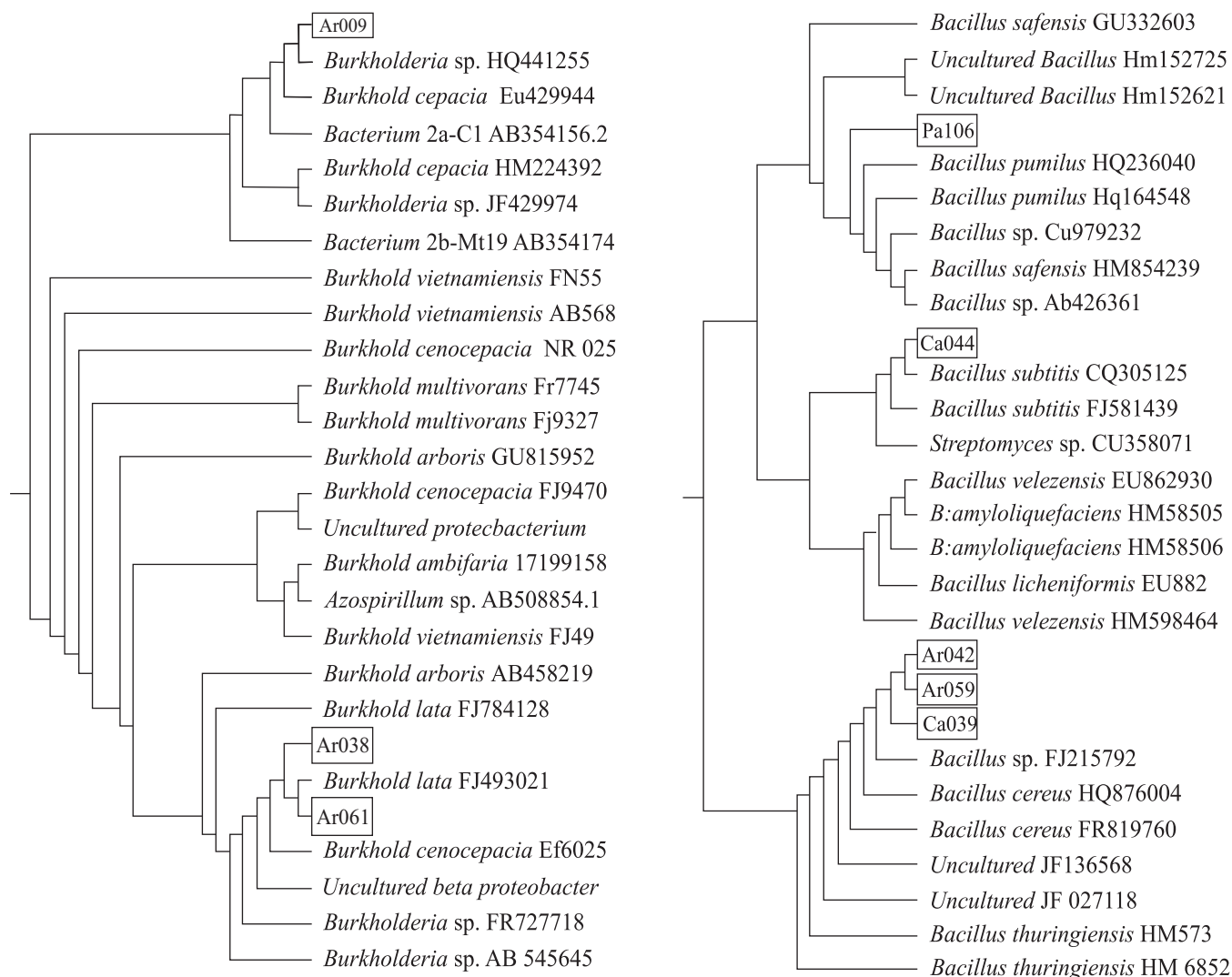


Figura 7. Filograma de los ocho aislamientos bacterianos agrupados por homología con secuencias relacionadas de ARNr 16S de especies conocidas reportadas en el GeneBank. Agrupamiento para secuencias relacionadas con el género *Burkholderia* (izquierda); agrupamiento para secuencias relacionadas con el género *Bacillus* (derecha).

Figure 7. Phylogram of eight bacterial isolates grouped by sequence homology to ARNr 16S sequences of known species reported in the Gene Bank. Grouping for sequences related to the *Burkholderia* genus (left); grouping for sequences related to the *Bacillus* genus (right).

aislamientos Ar009, Ca044, Ar042, Ar038, Ca039 y Pa106 sugieren que el micelio del hongo detiene su crecimiento frontal cuando alcanza la zona de inhibición generada por estos aislamientos, debido a que en dicha zona podría existir una concentración efectiva de metabolitos con la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, secretados por la bacteria antagonista hacia el medio de cultivo. A partir de ese punto el hongo solo puede crecer hacia las zonas laterales, donde los metabolitos inhibidores se encuentran en menor concentración, o no existen. Pa106, al detectar la presencia del hongo (por posibles metabolitos del hongo), responde emitiendo los lóbulos. Este tipo de respuesta se ha descrito para algunas especies de *Bacillus* (Seenesi *et al.*, 2002;

antibiosis effect, the fungus mycelium stops growing when the frontal inhibition zone produced by these isolates is reached, due to the fact that in this area there could be an effective metabolites concentration with the ability to inhibit fungus growth secreted by the antagonistic bacteria to the growth medium. The fungus can only form itself to the sides from that point on, where the metabolites are either an inhibitor in lower concentrations or it is absent. As the presence of the fungus is detected by Pa106 (by possible fungus metabolites) it responds by emitting lobes. Such response has been previously described by some *Bacillus* species (Seenesi *et al.*, 2002; Ingham and Ben-Jacob, 2008) that the genus Pa106 belongs to. The alteration observed in

Ingham and Ben-Jacob, 2008), género al cual pertenece Pa106. La alteración observada en la coloración de las colonias fúngicas crecidas en confrontación con algunos de los aislamientos bacterianos (Figura 5), posiblemente se debe a reacciones diferenciales del hongo ante los distintos metabolitos que produce cada aislamiento. En cambio, Ar061 y Ar059, bacterias de crecimiento invasivo (Figuras 5 y 6), presentaron un posible antagonismo por competencia de nutrientes y/o de espacio, comportamiento reportado ya para otras especies (Lam *et al.*, 2009). En estos dos casos se registró un antagonismo mutuo entre el hongo y los aislamientos, ya que el hongo también ejerció un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias, este hecho también ha sido reportado (Ansari *et al.*, 2005). La presencia de un halo de inhibición en estas confrontaciones, aunque fue de área muy limitada, muestra que también hay un efecto de antibiosis.

El análisis molecular basado en la comparación de las secuencias bacterianas del gene ribosomal 16S (ARNr 16S) permitió una identificación precisa a nivel de género de los ocho aislamientos antagonistas aquí identificados, indicando que tres de ellos pertenecen al género *Burkholderia* (Ar009, Ar038 y Ar061) y cinco al género *Bacillus* (Ca044, Pa106, Ar042, Ar059 y Ca039). Aunque el gene ARNr 16S es altamente conservado, diferencias mínimas a lo largo de su secuencia son significativas desde el punto de vista biológico, y son suficientes para permitir clasificar los organismos en grupos específicos en base a su homología. El análisis filogenético, mostró que los aislamientos Ar061 y Ar038 son bacterias ubicadas dentro del grupo de *Burkholderia lata*, mientras que Ar009 es más similar a *Burkholderia cepacia*. Los aislamientos Ar042, Ca039 y Ar059, fueron ubicados dentro del grupo de *Bacillus cereus* (Maughan y Van der Auwera, 2011); Ca044 es similar al grupo de *Bacillus subtilis*; y Pa106 se asocia al grupo de *Bacillus pumilus*. Sobre el comportamiento antagonista, las especies aquí referidas del género *Bacillus* han sido ampliamente evaluadas no solo en su capacidad como antagonistas a fitopatógenos, sino como promotoras del crecimiento y del rendimiento en plantas (Besson y Michel, 1990; Sandrin *et al.*, 1990; Eshita *et al.*, 1995; Kajimura *et al.*, 1995). De las especies *B. pumilus* y *B. cereus* hay numerosos reportes como habitantes naturales de la rizósfera de plantas y con antagonismo demostrado hacia hongos fitopatógenos (Eshita *et al.*, 1995). La especie *Burkholderia cepacia* se ha reportado como habitante natural en la endorizósfera de una gran variedad de plantas y con una fuerte actividad antagonista (Whipps y Lynch, 1985; Ramette *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Vandamme *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2008). Actualmente estamos confirmando la identidad a nivel de especie con base en pruebas microbiológicas estándares.

La actividad antagonista *in vitro* de los aislamientos aquí caracterizados, obtenidos a partir de suelos de Campeche, México, pone en evidencia la riqueza del trópico húmedo como fuente de cepas nativas con potencial para ser explotadas comercialmente como controladores naturales de fitopatógenos. Estas cepas pueden ser especialmente útiles en las zonas tropicales debido a su adaptación a las

the color of the fungal colonies grown in confrontation with some of the bacterial isolates (Fig. 5), could be probably due to fungus differential reactions before various metabolites produced by each isolate. Conversely, a possible antagonism by competition of nutrients and/or space was revealed by Ar061 and Ar059 invasive bacteria growth (Figures 5 and 6), which had been previously reported for other species (Lam *et al.*, 2009). A mutual antagonism between the fungus and the isolates was revealed in both of these cases, since the fungus also had an inhibitory effect on bacteria growth; this fact has also been previously reported (Ansari *et al.*, 2005). Although in a very limited area, it was revealed by the presence of an inhibition halo in these confrontations that there is also an antibiosis effect. It was possible, by means of a molecular analysis based on comparing gene ribosomal 16S (ARNr 16S) bacterial sequence, to reach a precise identification of the eight isolates with an antagonist potential at genus level, recognized in this study, indicating that three of them belong to the *Burkholderia* genus, (Ar009, Ar038 and Ar061) and five to the *Bacillus* genus (Ca044, Pa106, Ar042, Ar059 and Ca039). Even though the ARNr 16S gene is highly conserved, small differences along the sequence are significant from a biological point of view, and are sufficient to allow classification of organisms into specific groups based on their homology. It was revealed by the phylogenetic analysis based on the alignment among the sequences obtained, as well as from those homologous sequences obtained from known species, that the Ar061 and Ar038 isolates are bacteria located within the *Burkholderia lata* group, whereas Ar009 is more similar to *Burkholderia cepacia*. The Ar042, Ca039 and Ar059 isolates were located within the *Bacillus cereus* group (Maughan and Van der Auwera, 2011), the Ca044 isolate is similar to the *Bacillus subtilis* group, and Pa106 is associated with the *Bacillus pumilus* group. Concerning an antagonistic behavior, the *Bacillus* species referred herein have been extensively evaluated not only with regards to their capacity as antagonists to phytopathogens, but also as growth and yield promoters for plants (Besson and Michel, 1990; Sandrin *et al.*, 1990; Eshita *et al.*, 1995; Kajimura *et al.*, 1995). There are plenty of reports of *B. pumilus* and *B. cereus* species as natural inhabitants of plants rhizosphere, as well as a proven antagonism towards phytopathogenic fungi (Eshita *et al.*, 1995). The *Burkholderia cepacia* species has been reported as an endorhizosphere natural inhabitant in a wide variety of plants, and with a strong antagonistic activity (Whipps and Lynch, 1985; Ramette *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Vandamme *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2008). The identity at species level, based on standard microbiological tests, is currently being confirmed. The wealth of the humid tropics as a source of native strains with potential to be commercially exploited as natural controllers of plant pathogens is recognized by the *in vitro* antagonistic activity of the isolates characterized in the study hereby. These strains may be particularly useful in tropical areas, due to their adaptation to the geo-climatic conditions in this region.

Acknowledgements. The contributions made by Dr.

condiciones geoclimáticas de esta región.

Agradecimientos. Se agradece las aportaciones realizadas por el Dr. Alfredo Sánchez Villareal en la revisión de este manuscrito; al MC. Rosendo Alberto Alcaraz Moreno por su ayuda en el análisis estadístico; y al Dr. Jairo Cristobal Alejo por la donación de la cepa *C. gloeosporioides* utilizada en este trabajo a Fundación avanzada Campeche.

LITERATURA CITADA

- Ansari MA, Tirry L and Moens M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl* 50:465-475.
- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, van Elsas JD, van Vuurde JW and Azevedo JL. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied Environmental Microbiology* 10:4906-4914.
- Besson F and Michel G. 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios* 25:93-99.
- Brannen PM and Kenney DS. 1997. Kodiak® A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* 3:169-171.
- Chaboud A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil* 73: 395-402.
- Cornelis P and Matthijs S. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* 4:787-798.
- de Boer W, Verheggen P, Gunnewiek JAK, Kowalchuk GA and van Veen JA. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied Environmental Microbiology* 2:835-844
- de Weger LA, van Boxtel R, van der Burg B, Gruters RA, Geels FP, Schippers B and Lugtenberg B. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *Journal of Bacteriology* 165:585-594.
- Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM and Workman RF. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolation, structures, and antifungal activities of the congeners. *Journal of Antibiotics* 11:1240-1247.
- Fitzell RD, Peak CM and Darnell RE. 1984. A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Annals of Applied Biology* 104: 451-458.
- Instituto Nacional de Ecología México (INECOL). 2000. Programa de manejo reserva de la biosfera de Calakmul. Mexico 273 p.
- Jacobs JL, Fasi AC, Ramette A, Smith JJ, Hammerschmidt R and Sundin GW. 2008. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied Environmental Microbiology* 10: 3121-3129.
- Juhnke ME, Mathre DE and Sands DC. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied Environmental Microbiology* 12: 2793-2799.
- Kajimura Y, Sugiyama M and Kaneda M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *Journal of Antibiotics* 10: 1095-1103.
- Ingham CJ and Ben Jacob E. 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiology* 8:36
- Lam K, Thu K, Tsang M, Moore M and Gries M. 2009. Bacteria on housefly eggs, *Musca domestica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. *Naturwissenschaften* 96: 1127-1132
- Lynch JM. 1991. Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. Pp. 1-10. In: J.M. Lynch (ed.). *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons. New York.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ and Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 2:795-799.
- Maughan H and Van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 789-797
- Mendes R, Pizzirani KAA, Araujo WL and Raaijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied Environmental Microbiology* 22:7259-7267.
- Nelson S. 2008. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Plant Disease* 48:1-9.
- Opelt K and Berg G. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea coast. *Applied Environmental Microbiology* 11:6569-6579.
- Ploetz R. 1999. Anthracnose: The most important disease in much of the mango-producing world. In: PLP News, The Newsletter of the Plant Pathology Department, The University of Florida, Gainesville 3:1-2.
- Prapagdee B, Kuekulyong C and Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Science* 5:330-337.
- Ramette A, LiPuma JJ and Tiedje JM. 2005. Species

- abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Applied Environmental Microbiology* 3:1193-1201.
- Ramos SRU, Gutiérrez SJG, Rodríguez GR, Salcedo MSM, Hernández LCE, Luna OHA, Jiménez BJB, Fraire VS, Almeyda LIH. 2010. Antagonismo de dos Ascomycetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 75-86.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sandrin C, Peypoux F and Michel G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 4:370-375.
- Senesi S, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Wong ACL, and Ghelardi E. 2008. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology* 148: 1785–1794.
- Tequida MM, Cortez RM, Rosas-Burgos EC, López SS y Corrales MC. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 84-88.
- Vandamme P, Opelt K, Knöchel N, Berg C, Schönmann S, De Brandt E, Eberl L, Falsen E and Berg G. 2007. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2228–2235.
- Whipps JM and Lynch JM. 1985. Effect of insertion site and metabolic load on the environmental fitness of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Applied Environmental Microbiology* 7:2634-8.