

Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean

Efecto inhibitorio de bacterias antagonistas contra *Sclerotium rolfsii*, agente causal del tizón sureño del frijol

Juan Carlos Martínez-Álvarez[§], Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México; Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, C.P. 81101; ¹Flavio Camacho-Angulo[§], ¹Unidad de Investigación en Ambiente y Salud, ²Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis, Sinaloa, México. Blvd. Macario Gaxiola S/N, Col. Conrado Espinoza, C.P. 81223, México; ³Yolani de Jesús Bojórquez-Armenta ³Universidad Autónoma de Occidente, UR Guasave, Sinaloa, México. Avenida Universidad S/N, C.P. 81048, México; ²Bardo Sánchez-Soto; ³Jesús Damián Cordero-Ramírez; ²Cecilia de los Ángeles Romero-Urías; ²Rubén Felix-Gástelum, ¹Guadalupe Arlene Mora-Romero*. [§]Igual colaboración de autores.

*Autor de correspondencia: arlene.mora@uadeo.mx.

Recibido: 17 de Junio, 2020.

Aceptado: 20 de Septiembre, 2020.

Martínez-Álvarez JC, Camacho-Angulo F, Bojórquez-Armenta Y de J, Sánchez-Soto B, Cordero-Ramírez JD, Romero-Urías CA, Felix-Gástelum R and Mora-Romero GA. 2021. Inhibitory effect of antagonistic bacteria against *Sclerotium rolfsii*, causal agent of southern blight of common bean. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-5>

Primera publicación en línea: 11 de Diciembre, 2020.

First publication on line: December 11, 2020.

Resumen. El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* e *in planta*. Se recolectaron muestras de suelo en los municipios de Ahome, Guasave y Angostura,

Abstract. The objective of the present study was to select bacterial strains from the rhizosphere of common bean crop and to determine their potential to control *Sclerotium rolfsii* under *in vitro* and *in planta* conditions. Soil samples were collected in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, México. The strains were evaluated under *in vitro* conditions, afterwards the best isolates were tested *in planta*, and were identified based on 16S region of ribosomal DNA (three strains). Sixty-five bacterial isolates were tested against *Sclerotium rolfsii* with an inhibition from 2.5 to 65%. *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) and *Burkholderia* sp. (GLS06) inhibited 55, 60 and 65% under *in vitro* conditions; and resulted not hemolytic and their molecular identification was based on 16S rDNA. Only *Burkholderia* sp. exerted the highest percentage inhibition *in planta* to control *S. rolfsii*

Sinaloa, México, durante el ciclo agrícola 2018-2019. Los aislados se evaluaron bajo condiciones *in vitro* y se seleccionaron los mejores para la evaluación *in planta* e identificación molecular (tres aislados) con base a la región 16S del ADN ribosomal. Se evaluaron 65 aislados bacterianos *in vitro* contra *S. rolfsii* con un porcentaje de inhibición de 2.5 a 65%. *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06) inhibieron 55, 60 y 65% bajo condiciones *in vitro*; además resultaron no hemolíticas. Solo *Burkholderia* sp. ejerció mayor porcentaje de inhibición *in planta* para el control de *S. rolfsii*, con reducción de incidencia y severidad de la enfermedad en un 40 y 50% respectivamente, y promovió el peso seco de la planta. *A. pittii* o *P. putida* no fueron eficientes para el control del hongo *in planta*. Se sugiere hacer estudios con las bacterias en invernadero y campo.

Palabras clave: antagonista, biocontrol, *Phaseolus vulgaris*

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los principales cultivos en Sinaloa, México. Su producción es afectada por diversos factores, entre los que destacan las enfermedades fungosas como el tizón sureño *Sclerotium rolfsii* (teleomorfo *Athelia rolfsii*), el cual causa pudrición de la raíz y tallo. *S. rolfsii* es un patógeno polífago reportado en zonas tropicales y subtropicales, asociado con pérdidas económicas significativas (Gholami *et al.*, 2019). Para el control de la enfermedad se utilizan tratamientos químicos, pero se requieren esfuerzos para la implementación de estrategias amigables con el ambiente para el manejo de la enfermedad.

Se han reportado microorganismos del suelo con potencial para el control de *S. rolfsii* en algunos cultivos, pero los estudios realizados en el cultivo

with a reduction of incidence and disease severity of 40 and 50% respectively, and promoted the dry weight of the plant. *A. pittii* and *P. putida* were not efficient in controlling the fungus *in planta*. Greenhouse and field studies with these bacteria are suggested.

Key words: antagonist, biocontrol, *Phaseolus vulgaris*

The common bean crop (*Phaseolus vulgaris*) is one of the main crops in Sinaloa, Mexico. Its production is affected by a diversity of factors, mainly fungal diseases such as the southern blight *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*), which causes root and stem rot. *S. rolfsii* is a polyphagous pathogen reported in tropical and subtropical areas, related to significant economic losses (Gholami *et al.*, 2019). Chemical treatments are used to control the disease, although efforts are required to implement eco-friendly strategies for the control of the disease.

Soil microorganisms have been reported with the potential to control *S. rolfsii* in some crops, although studies performed on the common bean crop are scarce. Volpiano *et al.* (2018) reported that *Rhizobium* spp. (SEMIA 439 and SEMIA 4088) reduce the incidence 18.3 and 14.5%. However, the use of native strains is recommended for the biological control of the pathogen, since they present tolerance to the local environmental conditions and a higher potential in the control of the disease. Thus, the objective of the study was to select bacterial strains from the common bean crop rhizosphere collected in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, Mexico during the 2018-2019 growing season and determine their potential for the control of *S. rolfsii*.

de frijol son escasos. Volpiano *et al.* (2018) reportaron que el tratamiento con *Rhizobium* spp. (SEMIA 439 y SEMIA 4088) reducen la incidencia en 18.3 y 14.5%. Sin embargo, se recomienda el uso de cepas nativas en el control biológico del patógeno, porque exhiben tolerancia a las condiciones ambientales locales y muestran un mayor potencial en el control de la enfermedad. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol recolectadas en los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México durante el ciclo agrícola 2018-2019 y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii*.

Aislamiento bacteriano. Se realizaron muestreos dirigidos a cultivos de frijol, en etapa vegetativa, en tres municipios de Sinaloa. Se recolectaron muestras de suelos de la rizósfera de plantas asintomáticas, se incluyeron cuatro localidades (con 10 lotes cada una) en cada uno de los municipios (Ahome, Guasave y Angostura), con un total de 12 muestras compuestas. En el laboratorio se mezclaron 5 g de muestra de suelo en 50 mL de solución salina estéril al 0.85% para realizar diluciones seriales hasta 10^{-4} ; enseguida 100 μ L de las dos últimas diluciones se distribuyeron por triplicado en cajas Petri con agar nutritivo (AN, BD Bioxon®), las cajas se incubaron a 25 °C durante 24 h. Las colonias se purificaron, con base en su color y forma, y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15%.

Aislamiento e identificación de *S. rolfsii*. Los aislados de *S. rolfsii* se obtuvieron a partir de esclerocios presentes en plantas de frijol en campos agrícolas del Municipio de Ahome, Sinaloa, los cuales se desinfectaron, sembraron y purificaron en medio PDA. La confirmación de la patogenicidad del aislado de *S. rolfsii* utilizado en este estudio, se evidenció a través de la inoculación en

Bacterial isolation. Samples were taken from common bean plants in a vegetative state from three Municipalities of Sinaloa. Soil samples were taken from the rhizospheres of asymptomatic plants. Four locations were included (with 10 fields each) in each of the Municipalities (Ahome, Guasave and Angostura), for a total of 12 compound samples. In the laboratory, 5 g of soil samples were mixed with 50 mL of a sterile saline solution at 0.85% to carry out serial dilutions up to 10^{-4} ; next, 100 μ L of the last two dilutions were distributed in triplicate in Petri dishes with nutrient agar (AN, BD Bioxon®) and the dishes were incubated at 25 °C for 24 h. The colonies were purified based on their color and shape, and stored at -70 °C in 15% glycerol.

Isolation and identification of *S. rolfsii*. The *S. rolfsii* isolates were obtained from sclerotia present in the common bean plants in the fields in the Municipality of Ahome, Sinaloa; they were disinfested, seeded and purified in PDA medium. The pathogenicity of the *S. rolfsii* isolates used in this study was confirmed under greenhouse conditions with the inoculation in common bean seeds; the symptoms were corroborated 13 days after the inoculation and re-isolation of the fungus. The pathogen was identified preliminarily by carrying out morphological studies on the hyphae, as well as colony and sclerotia morphology (Nandi *et al.*, 2017). The identity was confirmed with the amplification and sequencing of a fragment of the ribosomal region, with oligonucleotides ITS4/ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'/5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') which amplify ~ 587 pb (White *et al.*, 1990).

Antagonism test of bacteria against *S. rolfsii*. The *in vitro* evaluation of the antagonism of bacteria was carried out using the dual culture technique in Petri dishes with PDA (Yáñez-Mendizábal *et*

semillas de frijol, la corroboración de síntomas a los 13 días después de la inoculación y el re-aislamiento del hongo, bajo condiciones de invernadero. La identificación preliminar del patógeno se efectuó mediante estudios morfológicos de las hifas, colonias miceliales y esclerocios (Nandi *et al.*, 2017). La identidad se confirmó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de la región ribososomal, con los oligonucleótidos ITS4/ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') que amplifican ~ 587 pb (White *et al.*, 1990).

Prueba de antagonismo de bacterias contra *S. rolf sii*. La evaluación del antagonismo *in vitro* de las bacterias en estudio se realizó mediante la técnica de cultivo dual en cajas Petri con PDA (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2011), como testigo se utilizaron cajas Petri con PDA solo con *S. rolf sii*. Las cajas se incubaron a 25 °C hasta que el crecimiento del micelio en el testigo alcanzó 4 cm de diámetro. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIRG) de acuerdo a los procedimientos descritos por Kumar *et al.* (2011), con la fórmula $PIRG = (R1-R2 / R1)$ multiplicado por 100, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno y R2 es el crecimiento radial del patógeno que interactúa con las bacterias.

Pruebas de hemólisis. Se realizaron pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002) a los aislamientos bacterianos que mostraron porcentajes de inhibición mayor a 40%. Se utilizaron cajas de medio de cultivo agar-sangre a las cuales se les realizaron perforaciones de 0.5 cm de diámetro. Los aislados bacterianos se cultivaron en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. De cada aislado bacteriano se centrifugó 1 mL a 13,000 rpm por 5 minutos, se tomaron 100 µL del sobrenadante y se colocaron en las perforaciones

al., 2011); Petri dishes with PDA containing only *S. rolf sii* were used as a control. The dishes were incubated at 25 °C until the growth of the mycelia reached a diameter of 4 cm. The percentage of inhibition of radial growth (PIRG) was calculated following the procedures described by Kumar *et al.* (2011), with the formula $PIRG = (R1-R2 / R1)$ multiplied by 100, where R1 is the radial growth of the pathogen and R2 is the radial growth of the pathogen that interacts with the bacteria.

Hemolysis tests. Hemolysis tests were carried out (Forbes *et al.*, 2002) on the bacterial isolates that displayed percentages of inhibition higher than 40%. Agar-blood culture media dishes were used, in which holes with a diameter of 0.5 cm were made. The bacterial isolates were grown in 5 mL of Luria Bertani (LB) medium at 30 °C on a shaker at 250 rpm for 24 h. Out of each bacterial isolates, 1 mL was centrifuged at 13,000 rpm for 5 minutes, 100 µL of the supernatant were taken and placed in the holes of the dishes containing agar-blood. The dishes were incubated for 24 h at 37 °C. The criteria for the hemolysis test were as follows: alpha hemolysis (α -hemolysis) or partial hemolysis when a dark green halo appears in the culture medium; beta hemolysis (β -hemolysis) or total hemolysis when a pale halo appears in the culture medium as an effect of the total lysis of the erythrocytes; and gamma hemolysis (γ -hemolysis) or non-hemolytic, is the culture medium presents no halo (Forbes *et al.*, 2002).

Evaluation of antagonistic bacteria *in planta*. For this evaluation, the three bacterial isolates with the highest percentage of inhibition, non-hemolytic, were chosen. A 0.5 cm PDA plug with active fungal growth was placed in pots with sterile vermiculite/sand (1:1, v/v), on top of which the previously disinfested common bean seed with

de las cajas de agar-sangre. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C. Los criterios de la prueba de hemólisis fueron los siguientes: hemólisis alfa (α -hemólisis) o hemólisis parcial cuando se presenta un halo con obscurecimiento verde en el medio de cultivo; hemólisis beta (β -hemólisis) o hemólisis total cuando se observa un halo claro del medio de cultivo por el efecto de lisis total de los eritrocitos, y hemólisis gama (γ -hemólisis) o no hemolítico si el medio de cultivo no presenta ningún tipo de aclaramiento (Forbes *et al.*, 2002).

Evaluación de bacterias antagonistas *in planta*.

Para esta evaluación se seleccionaron los tres aislados con mayor porcentaje de inhibición, no hemolíticos. Se colocó un disco de 0.5 cm de PDA con crecimiento activo del hongo en macetas con vermiculita/arena (1:1, v/v) estéril, sobre éste se sembró la semilla de frijol previamente desinfectada con NaClO al 0.5%. A cada semilla en el sustrato se le agregó 1 mL de suspensión bacteriana (COHUI 06, SANMI 02 o GLS 06) en medio LB, incubada durante 24 h (Densidad óptica a 595 nm = 1.0). Las semillas testigo se trataron con 1 mL de medio LB sin bacteria. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, se distribuyeron en un arreglo completamente al azar y se mantuvieron en condiciones controladas (8 h de luz/16 h de oscuridad, 25 °C) durante 13 días.

La efectividad biológica de los tratamientos en el control de la enfermedad se determinó con base en la incidencia (número de plantas con síntomas entre el total de plantas evaluadas en cada tratamiento por 100) (Cuadro 2). También se evaluó el índice de severidad con la escala de 0 a 4 (Moreno y Acevedo, 2002), donde: 0 = sin daños; 1= 1-25% de hojas amarillas y marchitamiento inicial del tallo; 2= 26-50% de hojas amarillentas y comienzo de la muerte del tallo; 3= 51-75% de hojas necróticas amarillentas y muerte progresiva de tallos y 4=

0.5% NaClO was placed. One mL of bacterial suspension (COHUI 06, SANMI 02 or GLS 06) in LB broth, incubated for 24 h (Optical density at 595 nm = 1.0) was added to each seed in the substrate. The control seeds were treated with 1 mL in LB broth without bacteria. Ten plants were used per treatment, which were randomly distributed and kept under controlled conditions (8 h of light/16 h of darkness, 25 °C) for 13 days.

The biological effectiveness of the treatments in the control of the disease was determined based on the incidence (number of plants with symptoms divided by the total number of plants evaluated in each treatment times 100) (Table 2). The severity index was also evaluated with a scale of 1 to 4 (Moreno and Acevedo, 2002), where: 0=no damage; 1= 1-25% of yellow leaves and initial wilting of the shoot; 2= 26-50% of yellowing leaves and the start of the stem death; 3= 51-75% of necrotic yellow leaves and progressive death of stem, and 4= 76-100% of necrotic tissue, mycelial growth and sclerotia. In addition, the variables of plant height, and fresh and dry weights of roots and the aerial section were registered (data not shown). The data were subject to the Shapiro-Wilk normality test; then they were included in the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney non-parametric tests with a value of $p<0.05$.

Molecular identification. The bacterial isolations with the highest percentage of inhibition were molecularly identified; genomic DNA, extracted with DNAzol® (Invitrogen, Cat. No. 10503-027), was used as a template to amplify a fragment of ~1400 pb of the 16S rDNA region by PCR, with the oligos F₂C/C (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3' and 5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3') (Shi *et al.*, 1997). The PCR products were visualized by electrophoresis through an 0.8% (w/v) agarose gel. Afterwards, the PCR products were purified using

76-100% de tejido necrótico, micelio en crecimiento y esclerocios. Además, se registraron las variables altura de planta, peso fresco y seco, tanto de la raíz, como de la parte aérea (datos no mostrados). Los datos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y se recurrió a las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

Identificación molecular. Los aislados de bacterias con mayor porcentaje de inhibición se identificaron molecularmente, se partió de ADN genómico extraído con DNazol® (Invitrogen, Cat. No. 10503-027), que se utilizó como templado para amplificar un fragmento de ~1400 pb de la región 16S rADN por PCR, con los oligos F₂C/C (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3' y 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3') (Shi *et al.*, 1997). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Después se realizó la purificación de los productos de PCR, con el kit QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104), los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se compararon con el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), en la plataforma BLASTn para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con los organismos que mostraran una identidad mayor al 90%. El árbol filogenético se construyó en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución de dos parámetros (Kimura, 1980). La solidez de la topología se evaluó mediante la prueba de bootstrap con 1000 réplicas.

Se aislaron un total de 65 bacterias de la rizósfera del cultivo de frijol, con un porcentaje de inhibición *in vitro* contra *S. rolfii* que osciló de 2.5 hasta 65% (Cuadro 1). Solo 14 aislados mostraron un porcentaje de inhibición superior a 40%. En las

the QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104); the purified products were sequenced in both directions. The sequences obtained were compared with the data bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), in the BLASTn platform to determine the similarity of the obtained sequences with the organisms that displayed an identity higher than 90%. The phylogenetic tree was created using the software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) with the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) and the two-parameter substitution model (Kimura, 1980). The solidness of the topology was evaluated using the bootstrap test with 1000 replications.

A total of 65 bacteria were isolated from the rhizosphere of the common bean plants, with a percentage of inhibition *in vitro* against *S. rolfii* that ranged from 2.5 to 65% (Table 1). Only 14 isolations displayed a percentage of inhibition higher than 40%. In the hemolysis tests (Forbes *et al.*, 2002), six displayed total hemolysis (β), two displayed partial hemolysis (α) and six were non-hemolytic (γ) (Table 1).

The three, non-hemolytic, with the highest *in vitro* inhibition, were *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) and *Burkholderia* sp. (GLS06) (Figure 1). For the *in planta* evaluation, the plants produced from seeds treated with *Burkholderia* sp. displayed an incidence and severity of 40 and 50%, respectively (Table 2), whereas in the plants in which *P. putida* and *A. pittii* were used, even though they did display inhibition of growth *in vitro*, these did not control the disease under greenhouse conditions, since the severity indices were similar to those of the control plants inoculated only with the pathogen (Table 2). This suggests that the results of the effects of antagonism observed *in vitro* do not always correlate to the results observed *in planta*, as in with *Pseudomonas fluorescences*

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial del *Sclerotium rolfsii* (*in vitro*) con aislados bacterianos de la rizósfera del cultivo de frijol, colectados de los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México.
Table 1. Inhibition of the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* (*in vitro*) with bacterial isolations from the rhizosphere of bean plants, gathered in the Municipalities of Ahome, Guasave and Angostura, Sinaloa, Mexico.

Aislado	Municipio	Inhibición (%)	Hemólisis	Aislado	Inhibición (%)	Municipio	Hemólisis
ALHU03	Angostura	40	β	GSI 03	7.5	Guasave	
ALHU04	Angostura	22.5		GSI04	12.5	Guasave	
ALHU05	Angostura	17.5		JJR01	15	Guasave	
ALHU06	Angostura	25		JJR03	20	Guasave	
ALHU07	Angostura	20		JJR04	7.5	Guasave	
CAMA01	Ahome	12.5		JJR05	7.5	Guasave	
CAMA02	Ahome	17.5		JJR06	20	Guasave	
CAMA03	Ahome	7.5		JJR07	10	Guasave	
CAMA04	Ahome	12.5		JJR71	15	Guasave	
COHUI02	Ahome	2.5		MS01	27.5	Angostura	
COHUI03	Ahome	15		MS03	17.5	Angostura	
COHUI04	Ahome	20		MS04	25	Angostura	
COHUI41	Ahome	32.5		MS05	45	Angostura	β
COHUI06	Ahome	55	γ	OLLE02	17.5	Angostura	
COHUI05	Ahome	7.5		OLLE71	62.5	Angostura	β
COHUI07	Ahome	22.5		OLLE72	40	Angostura	β
COHUI08	Ahome	17.5		OLLE74	52.5	Angostura	β
COHUI09	Ahome	47.5	γ	PALM01	23.5	Angostura	
EB03	Guasave	25		PALM02	17.5	Angostura	
EB11	Guasave	27.5		SANMI01	45	Angostura	α
EB12	Guasave	12.5		SANMI02	60	Angostura	γ
EBAN01	Angostura	22.5		SANMI03	5	Angostura	
EBAN02	Angostura	22.5		SANMI05	30	Angostura	
EBAN04	Angostura	5		SANMI06	50	Angostura	γ
GLS01	Guasave	25		SANMI07	7.5	Angostura	
GLS02	Guasave	5		ZI 01	27.5	Ahome	
GLS03	Guasave	17.5		ZI 02	25	Ahome	
GLS04	Guasave	22.5		ZI 03	40	Ahome	β
GLS05	Guasave	42.5	α	ZI 04	12.5	Ahome	
GLS06	Guasave	65	γ	ZI 09	7.5	Ahome	
GLS07	Guasave	25		ZI 05	12.5	Ahome	
GSI01	Guasave	15		ZI 06	45	Ahome	γ
GSI02	Guasave	32.5					

β = hemólisis total, α = hemólisis parcial, γ = no hemolítica. / β = total hemolysis, α = partial hemolysis, γ = no hemolysis.

pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002), seis presentaron hemólisis total (β), dos hemólisis parcial (α) y seis resultaron no hemolíticas (γ) (Cuadro 1).

Los tres aislados, no hemolíticos, con mejor porcentaje de inhibición *in planta*, correspondieron a *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06)

against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, where an effect was observed *in vitro*, although its efficiency *in vivo* did not manifest itself (Elsherif and Grossmann, 1994).

The potential of the microorganisms to produce antimicrobial compounds *in vitro* is not always correlated with results *in situ*, since the availability

(Figura 1). Para la evaluación *in planta*, las plantas originadas de las semillas tratadas con *Burkholderia* sp. mostraron incidencia y severidad de 40 y 50%, respectivamente (Cuadro 2), mientras que las plantas donde se utilizaron *P. putida* y *A. pittii*, aun cuando mostraron inhibición del crecimiento *in vitro*, éstas no ejercieron control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero, pues los índices de severidad fueron similares a los de las plantas testigo inoculadas sólo con el patógeno (Cuadro 2). Esto sugiere que los resultados de los efectos de antagonismo observados *in vitro* no siempre correlacionan con los resultados observados *in planta*, como ocurre con *Pseudomonas fluorescentes* contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, donde se observó efecto *in vitro*, pero su eficacia *in vivo* no se manifestó (Elsharif y Grossmann, 1994).

El potencial de los microorganismos para producir compuestos antimicrobianos *in vitro* varía con respecto a lo que ocurre *in situ*; esto debido a

of nutrients for bacteria is greater in the artificial medium than in the rhizosphere (Köhl *et al.*, 2019). Therefore, the metabolites *in vitro* may not be expressed *in situ* or have a reduced effect (Hennessy *et al.*, 2017). Additionally, the *in vitro* antagonism experiments without any contact with the plant exclude other modes of bacterial action, such as the ability to induce systemic resistance (Köhl *et al.*, 2019), and therefore, we cannot discard the possibility that isolations that showed no antagonism *in vitro* can induce other action mechanisms against *S. rolfsii* in the plant.

Species of both *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera have been proposed as plant growth promoters due to their ability to solubilize phosphate, produce indole acetic acid, fixate nitrogen and produce siderophores (Daur *et al.*, 2018; Qessaoui *et al.*, 2019). *A. pittii* JD-14 is efficient for increasing growth, fresh and dry weight in alfalfa (Daur *et al.*, 2018); the strain evaluated

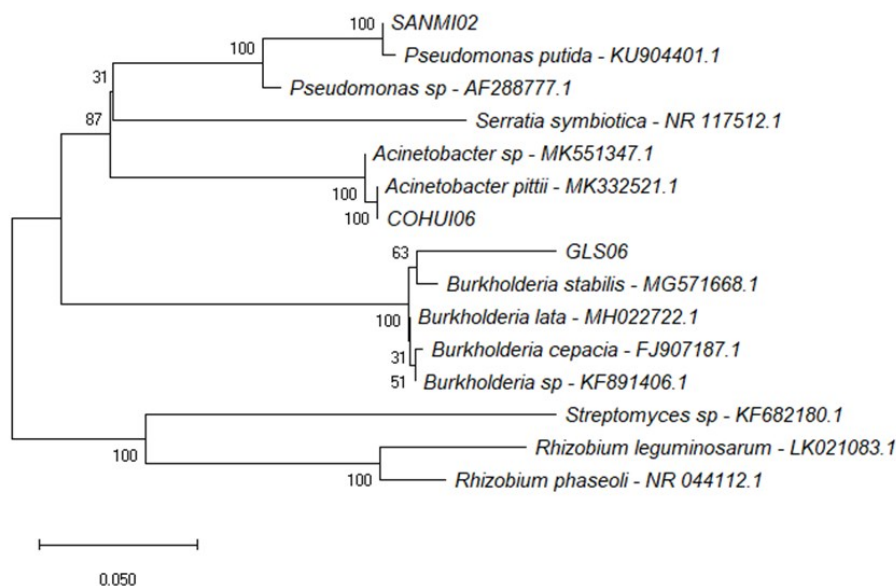


Figura 1. Relación filogenética de los aislados COHUI 06, SANMI 02 y GLS 06 basada en la secuencia del gen 16S rARN y comparada con secuencias de la base de datos de GenBank en NCBI.

Figure 1. Phylogenetic relation of isolations COHUI 06, SANMI 02 and GLS 06, based on the sequence of the gene 16S rRNA and compared with sequences from the GenBank data base in the NCBI.

Cuadro 2. Efecto de las cepas bacterianas en la incidencia y severidad del tizón sureño (*S. rolfsii*) en plantas de frijol bajo condiciones de invernadero.
Table 2. Effect of the bacterial strains on the incidence and severity of southern blight (*S. rolfsii*) on bean plants under greenhouse conditions.

Tratamiento	Incidencia		Severidad	
	(%)	Escala 0-4 (%)	Mediana	Rango
CTRL	0	0.0 (0)	0.0	22.5a ^z
COHUI 06	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
COHUI 06+SR	100	3.6 (90)	100	62.3bc
GLS 06	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
GLS 06+SR	60	1.7 (43)	37.5	42.7ab
SANMI 02	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
SANMI 02+SR	100	4.0 (100)	100	65.5c
SR	100	3.7 (93)	100	63.5c

^zLetras diferentes, por columnas, indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), $n = 10$. CTRL (sin bacteria, sin *S. rolfsii*), COHUI 06 (solo bacteria COHUI 06), COHUI 06 + Sr (bacteria COHUI 06 + *S. rolfsii*), GLS 06 (solo bacteria GLS 06), GLS 06 + Sr (bacteria GLS 06 + *S. rolfsii*), SANMI 02 (solo bacteria SANMI 02), SANMI 02 + Sr (bacteria SANMI 02 + *S. rolfsii*) y Sr (solo *S. rolfsii*). / ^zDifferent letters in each column indicate significant differences ($p \leq 0.05$), $n = 10$. CTRL (without bacteria, without *S. rolfsii*), COHUI 06 (only COHUI 06 bacteria), COHUI 06 + Sr (COHUI 06 bacteria + *S. rolfsii*), GLS 06 (only GLS 06 bacteria), GLS 06 + Sr (GLS 06 bacteria + *S. rolfsii*), SANMI 02 (only SANMI 02 bacteria), SANMI 02 + Sr (SANMI 02 bacteria + *S. rolfsii*) and Sr (only *S. rolfsii*).

que la disponibilidad de nutrientes para las bacterias es mayor en el medio artificial que en la rizósfera (Köhl *et al.*, 2019). Por lo que los metabolitos producidos *in vitro* pueden no expresarse *in situ* o tienen una función menor (Hennessy *et al.*, 2017). Además, los experimentos de antagonismo *in vitro* sin ningún contacto con la planta excluyen otros modos de acción bacteriana, por ejemplo, la capacidad de inducir resistencia sistémica (Köhl *et al.*, 2019) por lo que no se descarta la posibilidad de que los aislados que no mostraron antagonismo *in vitro* puedan inducir otros mecanismos de acción contra *S. rolfsii* en la planta.

Tanto especies del género *Pseudomonas* como de *Acinetobacter* se han propuesto como promotoras del crecimiento vegetal por la capacidad para solubilizar fosfato, producir ácido indol acético, fijar nitrógeno y producir sideróforos (Daur *et al.*, 2018; Qessaoui *et al.*, 2019). *A. pittii* JD-14 es eficaz para aumentar el crecimiento, y el peso fresco y

in the present study promoted the increase of the dry weight of the root (data not shown). *P. putida* showed no growth promotion in the common bean variety included (data not shown).

Species of *Acinetobacter* have been reported as antagonists of fungal pathogens. *Acinetobacter* sp. (5H2) and *A. lwoffii* (A5) inhibited 69.4 and 62.7% respectively, and *in vitro* growth of *Corynespora cassicola* and significantly reduced the severity of the pathogen in *Hibiscus sabdariffa* (Patricio-Hernández *et al.*, 2020). The species *A. pittii* evaluated in this investigation was not efficient in controlling *S. rolfsii* in planta.

The *Burkholderia* has a complex taxonomy and is a dominant genus in the microbiota of the rhizosphere. The group *B. cepacia* includes plant growth-promoting species and phytopathogen control agents (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019); *B. contaminans* UFLA02-27 has been isolated from common bean plants and

seco en alfalfa (Daur *et al.*, 2018), la cepa evaluada en el presente estudio promovió aumento del peso seco de la raíz (dato no mostrado). En el caso de *P. putida* no mostró promoción de crecimiento en la variedad de frijol evaluada (dato no mostrado).

Especies de *Acinetobacter* se han reportado como antagonistas de patógenos de hongos. *Acinetobacter* sp. (5H2) y *A. lwoffii* (A5) inhibieron 69.4 y 62.7% respectivamente, el crecimiento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* y redujeron significativamente la severidad del patógeno en *Hibiscus sabdariffa* (Patricio-Hernández *et al.*, 2020). La especie *A. pittii* evaluada en esta investigación no fue eficiente para el control de *S. rolfisii* *in planta*.

El género *Burkholderia*, de taxonomía compleja, es uno de los dominantes en la microbiota de la rizósfera. El grupo *B. cepacia*, incluye especies promotoras del crecimiento vegetal y agentes de control de fitopatógenos (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019); en frijol se ha aislado y evaluado *B. contaminans* UFLA02-27, esta cepa es capaz de solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y presenta antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Da Silva *et al.*, 2012). Especies de este grupo tienen potencial biotecnológico en la agricultura porque producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas y compuestos bioactivos pero su uso es restringido por los riesgos que representan como patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Burkholderia sp. (cepa GLS06), la cual resultó no hemolítica (Cuadro 1), comparte alrededor del 95% de homología con secuencias del gen 16S de especies del grupo de *B. cepacia* (GenBank: MG571668.1, MH022722.1, FJ907187.1); se ha reportado que la homología del gen 16S de las especies del grupo *B. cepacia* es alta (>97.5%) (Da Silva *et al.*, 2012), nuestro análisis limita al aislado

evaluado. This strain can solubilize phosphate, fix nitrogen, and it antagonizes *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Da Silva *et al.*, 2012). Species of this group have a biotechnological potential in agriculture, since they produce a variety of hydrolytic enzymes and bioactive compounds, but their use is restricted, due to the risks they pose as opportunist pathogens in immunocompromised people (Eberl and Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Burkholderia sp. (strain GLS06), which resulted to be non-hemolytic (Table 1), shares around 95% of homology with sequences of gene 16S of species of the group of *B. cepacia* (GenBank: MG571668.1, MH022722.1, FJ907187.1); the homology of gene 16S of the species of group *B. cepacia* is high (>97.5%) (Da Silva *et al.*, 2012). Our analysis limits the isolate isolation GLS06 at genus level; concatenated analysis is required, with different markers to determine the species.

Burkholderia sp. (GLS06), isolated from rhizosphere samples obtained in Guasave, Sinaloa, Mexico, displayed potential in the control of southern blight of common bean caused by *S. rolfisii*, which justifies future studies at an intermediate level and on the field to determine its potential as a biocontrol agent in an integrated disease management system, in strict adherence to ethical criteria related to care for human health and the environment.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

GLS06 a nivel género; se requiere de análisis concatenado con distintos marcadores para determinar la especie.

*Burkholderia* sp. (GLS06) aislada de muestras de rizósfera de frijol colectadas en Guasave, Sinaloa, México, mostró potencial en el control de la

putrición sureña del frijol causada por *S. rolfisii*, lo que justifica estudios futuros a nivel invernadero y campo para determinar su potencial como agente de biocontrol en un sistema de manejo integrado de la enfermedad, esto en estricto apego a los criterios éticos relativos al cuidado de la salud humana y el ambiente.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Occidente (PIFIP-2019) y al Instituto Politécnico Nacional (SIP 20196294) por apoyar parte de esta investigación. FCA e YJBA a la beca CONACyT 634315 y 706421, respectivamente.

#### LITERATURA CITADA

- Da Silva K, Cassetari AES, Lima AS, de Brandt E, Pinnock E, Vandamme P and Moreira FM. 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology* 35(4):253-262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>.
- Daur I, Saad MM, Eida A A, Ahmad S, Shah ZH, Ihsan MZ, Muhammad Y, Sohrab SS and Hirt H. 2018. Boosting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) production with rhizobacteria from various plants in Saudi Arabia. *Frontiers in microbiology* 9: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00477>.
- Eberl L and Vandamme P. 2016. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research* 5:1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>.
- Elsherif M and Grossmann F. 1994. Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiological Research* 149(4): 371-377. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80084-4).
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00550-1>.
- Forbes BA, Sahn DF and Weissfeld AS. 2002. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 11<sup>th</sup> Ed. Mosby, St. Louis, MO. 1136 p
- Gholami M, Ebrahimi A, Mozafari J, Bihanta MR and Rahaie M. 2019. Phenotypic and genotypic screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces for resistance to collar rot fungus (*Sclerotium rolfisii* Sacc.) in North of Iran. *Journal of Plant Pathology* 102: 67-78. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00373-9>.
- Hennessy R C, Glaring MA, Olsson S and Stougaard P. 2017. Transcriptomic profiling of microbe-microbe interactions reveals the specific response of the biocontrol strain *P. fluorescens* In5 to the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *BMC research notes* 10: 376. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2704-8>.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg W J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science* 10: 845-845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.
- Kumar DDP, Thenmozhi R, Anupama PD, Nagasathya A, Thajuddin N and Paneerselvam A. 2011. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Research Journal of Biological Sciences* 6(10): 523-531. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2011.523.531>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Moreno B and Acevedo R. 2002. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Rev Iberoam Micol* 19: 115-119. <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/115119.pdf>
- Nandi S, Hembaram S, Adhikari A, Tiwari BK and Dutta S. 2017. Host infection beyond the traditional range of *Sclerotium (Athelia) rolfisii* with *Physalis minima*. *Bioinformatics* 13(10):333-338. <https://doi.org/10.6026/97320630013333>.
- Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J. 2020. Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 450-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-1>.
- Qessaoui R, Bouharrou R, Furze JN, El Aalaoui M, Akroud H, Amarraque A, Van Vaerenbergh J, Tahzima R, Mayad EH and Chebli B. 2019. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. *Scientific Reports* 9: 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>.
- Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA and Estrada-de los Santos P. 2019. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* 51(1): 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA and Friedmann EI. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology* 33: 169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>.

- Volpiano CG, Lisboa BB, São José JFB, de Oliveira AMR, Beneduzi A, Passaglia LMP and Vargas LK. 2018. *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium (Athelia) rolfsii* on the common bean. *Plant and Soil* 432: 229-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3799-y>.
- White TJ, Bruns TS, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, USA. 1990p.
- Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, Casals C, Marín S, Solsona S and Teixidó N. 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology* 21(4): 409-426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>.