

## Endófitos Bacterianos con Potencial Antagónico y Promoción de Crecimiento Vegetal en Maíz Blanco (*Zea mays* L.) Bacterial Endophytes with Antagonistic Potential and Plant Growth Promotion in White Corn (*Zea mays* L.)

Rosa María Longoria-Espinoza<sup>1</sup> , Rubén Félix-Gastélum<sup>2</sup>  y  
Gloria Margarita Zamudio-Aguilasocho<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave, Departamento de Ciencias Biológicas, Avenida Universidad s/n, Fraccionamiento Villa Universidad. 81120 Guasave, Sinaloa, México; (R.M.L.E.), (G.M.Z.A.).

† Autora para correspondencia: rosa.longoria@uadeo.mx, rosamarialongoria@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, Unidad el Fuerte. 812223 Los Mochis, Sinaloa, México; (R.F.G.).

### RESUMEN

En el estado de Sinaloa, México, la producción de maíz blanco se realiza bajo un modelo de agricultura intensiva, lo que implica un uso indiscriminado de agroquímicos, técnicas de labranza inadecuada que deterioran la calidad de los suelos, contaminación de mantos freáticos y actualmente escasez de agua. Sin embargo, paulatinamente se van cambiando estos sistemas de producción por una agricultura de conservación como alternativa sustentable. El objetivo de este estudio es caracterizar molecularmente bacterias endófitas aisladas de plantas de maíz blanco (*Zea mays* L.) y evaluar *in vitro* la capacidad promotora de crecimiento vegetal y actividad antagónica contra hongos fitopatógenos. Se recolectaron plantas de maíz blanco híbrido PIONEER 4032 DEKALB, variedad sembrada durante el ciclo otoño-invierno 2022-2023; se aislaron bacterias endófitas de tejido (foliar, tallo y raíz); la diversidad de colonización presentó variaciones significativas en el tejido de la planta. Los aislados se caracterizaron a través de la amplificación y secuenciación del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S rADN; se muestra la asociación al phyla *Firmicutes* del género *Bacillus* sp., los aislados endófitos de raíz como: *Bacillus subtilis*; *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*. La evaluación metabólica muestra a *B. subtilis* con capacidades relevantes de la promoción de crecimiento vegetal con alta producción de hormonas y solubilización de fosfatos. En el análisis *in vitro* de antagonismo, la cepa *B. subtilis* presentó el valor máximo de inhibición del hongo *Sclerotium rolfssii*, (87.09%). El género *Bacillus* se utiliza en la comprensión de procesos metabólicos y antagónicos ante patógenos que atacan cultivos de importancia económica. Es importante mencionar que existen pocos reportes de especies de *Bacillus* en maíz blanco cultivado en el municipio de Guasave, Sinaloa, México. Por lo tanto, estos resultados establecen bases para el establecimiento de bioensayos *in planta* con las cepas de *bacillus* aisladas de maíz blanco en pro de un modelo de agricultura sustentable.

**Palabras clave:** antagonismo, *Bacillus* sp, *B. cereus*, *B. subtilis*, solubilización de fosfatos.

### SUMMARY

In the state of Sinaloa, Mexico, white corn production is performed under an intensive agriculture model, which implies an indiscriminate use of agrochemicals, inadequate tillage techniques that deteriorate soil quality, groundwater contamination, and currently water scarcity. However, these production systems are gradually being changed to conservation agriculture as a sustainable alternative. Thus, the objective of this study is to molecularly characterize endophytic bacteria isolated from white



#### Cita recomendada:

Longoria-Espinoza, R. M., Félix-Gastélum, R., & Zamudio-Aguilasocho, G. M. (2024). Endófitos Bacterianos con Potencial Antagónico y Promoción de Crecimiento Vegetal en Maíz Blanco (*Zea mays* L.). *Terra Latinoamericana*, 42, 1-10. e1918. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i.1918>

Recibido: 21 de marzo de 2024.

Aceptado: 19 de septiembre de 2024.

Artículo. Volumen 42.

Noviembre de 2024.

Editor de Sección:

Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar

Editor Técnico:

Dr. Gerardo Cruz Flores



**Copyright:** © 2024 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

corn plants (*Zea mays* L.) and *in vitro* evaluate their plant growth-promoting capacity and antagonistic activity against phytopathogenic fungi. PIONEER 4032 DEKALB hybrid white corn plants were collected, planting a variety during 2022-2023 fall-winter cycle; endophytic bacteria were isolated from tissue (leaf, stem, and root); colonization diversity showed significant variations in the plant tissue. The isolates were characterized through amplification and 16S rDNA gene sequencing by polymerase chain reaction product, showing association with *Firmicutes* phyla of *Bacillus* sp. genus, root endophytic isolates, such as: *B. subtilis*; *B. amyloliquefaciens* and *B. cereus*. The metabolic evaluation shows *B. subtilis* with relevant capacities for promoting plant growth with high hormone production and phosphate solubilization; in the *in vitro* antagonism analysis, *B. subtilis* strain showed the maximum inhibition value of the fungus *Sclerotium rolfsii*, (87.09%). *Bacillus* genus is used in understanding metabolic processes and antagonism against pathogens that attack crops of economic importance. Thus, it is important to mention that few reports exist of *Bacillus* species in white corn grown in the municipality of Guasave, Sinaloa. These results are the basis for establishing *in planta* bioassays with *Bacillus* strains isolated from white corn in support of a sustainable agriculture model.

**Index words:** antagonism, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. subtilis*, phosphate solubilization.

## INTRODUCCIÓN

El maíz, por su importancia cultural, social y económica es considerado la base en la dieta de los mexicanos (SADER, 2020). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, coloca al maíz como el segundo cereal más producido en el mundo, México cuenta con 64 variedades de maíz, de las cuales 59 son catalogadas nativas (maíces criollos). El estado de Sinaloa, México es líder en la producción de maíz blanco representando el 75% de lo producido en todo el país (SADER, 2020).

La producción de maíz en el estado de Sinaloa enfrenta principalmente problemas fitosanitarios que provocan altas pérdidas en rendimiento desde el establecimiento del cultivo hasta el almacenamiento del grano; aunado a los altos costos de producción, resultando cada día menos sostenible el modelo de producción convencional donde el uso indiscriminado de agroquímicos y actualmente la escases de agua para riego ha generado desgaste y disminución de la producción. Actualmente el uso de bioinsumos a base de microorganismos ha adquirido gran importancia para el sector agrícola; restableciendo la interacción planta-microorganismo. Diversos estudios reportan beneficios que los microorganismos endófitos inducen en las plantas por diferentes mecanismos como: respuesta de adaptación al estrés ambiental, antagonismo contra fitopatógenos y promoción del crecimiento vegetal (Ruiz-Sánchez, Mejía, Cristóbal, Valencia y Reyes, 2014; Orberá, Serrat y Ortega, 2014; Liu, Zuo, Zou, Wang y Song, 2013). Las bacterias endófitas comprenden un grupo heterogéneo asociadas a diversas partes de la planta, sin embargo la relación planta hospedante y comunidad bacteriana endófitas, refleja un proceso de colonización influenciado por diversos factores como: genotipo, edad fenológica de la planta, estado fisiológico y tejido, otras variables importantes como tipo de suelo, temperatura, humedad y prácticas agronómicas (Gupta, Parihar, Ahirwar, Senehi y Singh, 2015). Diversos estudios han reportado en diferentes genotipos de maíz, así como en Teozintle (ancestro del maíz), que la inducción de germinación y rendimiento se relaciona directamente con la inoculación de bacterias endófitas de diversas especies de *Bacillus* (Sánchez-Bautista, De León, Aranda, Zavaleta, Nava, Goodwin, Leyva, 2018). Actualmente en la comunidad científica se ha despertado interés por conocer los microecosistemas endófitos-planta, todavía hay varias preguntas sobre cómo y por qué los endófitos se desarrollan, mantienen el equilibrio y cómo favorecen los procesos de crecimiento en las plantas. Es importante la realización de investigación continua en la agricultura, ampliando el entendimiento de los mecanismos de la interacción bacteria endófitas-planta, así como la influencia de dichos microorganismos en la salud del suelo y productividad agrícola (Gonzales-Torrico, Cortes, Blanco y Loayza, 2024; Li, Xiong, Wen, Li y Xu 2023). Actualmente se trabaja en la aplicación de innovadoras estrategias en la búsqueda de la sostenibilidad agrícola; destacando las características de biocontrol de los microorganismos endófitos en enfermedades fúngicas agrícolas, así como la promoción del buen desarrollo de las plantas (Montañez-De Azcué, Cristóbal, Uc, Moo y Tun, 2024).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar molecularmente bacterias endófitas aisladas de plantas de maíz (*Zea mays* L.), así como evaluar *in vitro* la capacidad de promoción de crecimiento vegetal (BPCV) y actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos (*Sclerotium rolfsii* y *Colletotrichum coccodes*) y Oomycete *Phytophthora capsici* como una alternativa sustentable en la producción del cultivo de maíz en el estado de Sinaloa, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de Material Vegetal y Esterilización

Se recolectaron plantas de maíz blanco híbrido PIONEER 4032 DEKALB, variedad sembrada durante el ciclo otoño-invierno 2022-2023 en terrenos del campo cuatro caminos, con tipo de suelo franco arcilloso, localizado en el municipio de Guasave, Sinaloa; México, 25.5675° N y 108.4676° O. El muestreo de las plantas se realizó en la fase reproductiva (visualizando la espiga), al azar y en forma de zig-zag, considerando plantas sin signos de enfermedad o daño. Se recolectó tejido foliar considerando la parte central de cada planta; de la parte alta se tomó de tallo, la muestra de raíz se tomó aproximadamente a seis centímetros de profundidad. Las muestras de tejido se tomaron utilizando material estéril (guantes, tijeras pinzas), en cada toma de muestra el material se esterilizaba con etanol al 96%. Cada muestra se rotuló, con fecha de muestreo y se colocaron en bolsas de plástico estériles, conservándose en hieleras a 4 °C para su procesamiento dentro de las 24 h de su colecta en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave, Sinaloa, México. El tejido vegetal recolectado en campo (foliar, tallo y raíz), fue separado, para su lavado, se descartaron impurezas de manera cuidadosa con agua de grifo durante cinco minutos, posteriormente se agregaron tres gotas de detergente líquido y se realizaron tres lavados más de manera similar. El tejido vegetal se desinfectó por un minuto, en solución de etanol al 70% (Sigma-Aldrich), posteriormente se realizaron lavados en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min adicionando Tween-80 al 10% (v/v) por un minuto, para finalizar, se realizaron seis lavados con agua destilada estéril.

### Aislamiento de Bacterias

Se realizó el aislamiento de bacterias aplicando la técnica denominada contacto directo en condiciones asépticas realizando pequeños cortes transversales y longitudinales al tejido, colocándolos en cajas Petri preparadas con medio agar Lb (Schaad, Jones y Chun, 2001); el establecimiento se realizó por triplicado en cada tejido, posicionado el corte de cara al medio de cultivo, para posteriormente incubarlos durante ocho días a 27 °C (Yang *et al.*, 2011). Como control de esterilización se tomaron 100 µL de agua destilada del último lavado estableciéndose bajo las mismas condiciones del tejido. Pasado el tiempo se realizaron seis rondas de purificación hasta obtener colonias con características morfológicas similares; la realización del análisis morfológico se realizó en estereoscopio después de 48 h de crecimiento; considerando: forma, bordes, aspecto, color, tamaño.

La densidad poblacional de bacterias aisladas de las muestras de tejido (foliar, tallo y raíz), se realizó por conteo directo en placa utilizando contador de colonias (Quebec®, Darkfield Colony Counter). Expresando en unidades formadoras de colonias por gramo de peso fresco (UFC g<sup>-1</sup>), transformándose a Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>. Se realizó un análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el programa estadístico SAS Versión 9.1.3 (SAS Institute, 2004), evaluando diferencias entre comunidades de bacterias en relación al tipo de tejido (UFC g<sup>-1</sup>).

### Ensayo Hemolítico en Sangre y Tinción de Gram

La prueba de hemólisis se realizó por triplicado descartando aislados bacterianos que podrían ser patógenos para los humanos siguiendo el protocolo citado por Noble (2002). Donde se consideró β-hemólisis completa como una zona clara alrededor del pocillo en el medio de agar sangre, lo que indica rotura completa de los eritrocitos, α-hemólisis parcial un color verde oscuro, indica el daño parcial de eritrocitos. Las bacterias con γ-hemólisis no presentaron alteración de color u opacidad en el medio que indique ausencia de hemólisis, de igual manera se realizó tinción de Gram de acuerdo con el protocolo del kit comercial (Golden Bell lote No. 0512227). Los aislados se separaron creando reservas las cuales fueron criopreservadas a -70 °C por triplicado, en LB líquido con 15% glicerol (v/v) según Pasarell y McGinnis (1992), para posteriores análisis.

## Evaluación *in vitro* de Promoción de Crecimiento Vegetal en Bacterias

La evaluación de sideróforos, solubilización de fosfatos, producción de quitinasas, auxinas, IAA y actividad proteasa se realizaron de manera cualitativa, por triplicado, utilizando la cepa (B25) *Bacillus cereus* (Figuerola-López *et al.*, 2016), como control positivo.

Para la producción de sideróforos, se utilizó medio agar de cromo azulol S (CAS), de acuerdo con el protocolo descrito por Schwyn y Neilands (1987); las colonias que presentaron coloración amarillo/naranja, fueron consideradas positivas. La producción de quitinasas, se realizó siguiendo la metodología descrita por Shanmugaiyah, Mathivanan, Balasubramanian y Manoharan (2008), utilizando quitina como única fuente de carbono en el medio de cultivo, después de cinco días de crecimiento se observó una zona clara alrededor de la bacteria, considerándose positiva. Para evaluar la solubilización de fosfato, se utilizaron placas de agar Pikovskaya las cuales se incubaron durante una semana a 25 °C Pikovskaya (1948), las colonias que presentaron una zona clara alrededor de la bacteria, se consideraron positivas. La producción de auxinas se evaluó cultivando las colonias en caldo LB durante 24 h y el sobrenadante fue tratado con el reactivo de Salkowsky (Loper y Schroth, 1986); según el protocolo citado por Bric, Bostock y Silverstone (1991), en la misma reacción, pasados varios minutos, se evaluó la producción de IAA identificada por cambio de color en el sobrenadante. La evaluación de la actividad proteasa se realizó en agar con leche desnatada (SMA) preparado con leche descremada comercial, según Jones, Sun y Marchesi (2007); se consideró con actividad proteasa el aclaramiento alrededor de las colonias bacterianas.

## Pruebas de Antagonismo *in vitro*

Los aislados bacterianos se enfrentaron con los siguientes fitopatógenos: Oomycete *Phytophthora capsici* y los hongos *Sclerotium rolfsii* y *Colletotrichum coccodes*, los cuales fueron aislados de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y chile jalapeño (*Capsicum annuum*), la cepa del hongo *Fusarium oxysporum* aislado de plantas de maíz (*Zea mays* L.), en el estado de Sinaloa, México. Las cepas de hongos fitopatógenos fueron donados por el Centro de Investigación y Desarrollo (CIAD) en Culiacán, Sinaloa. Los hongos fitopatógenos y el Oomycete *Phytophthora capsici* utilizados en este trabajo se han relacionado con la pudrición de raíz en plantas de chile, jitomate, y maíz (Fernández-Herrera, Acosta, Ponce y Manuel, 2007; García-Aguirre y Martínez, 2010).

La evaluación de antagonismo *in vitro* se realizó en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), con la técnica de cultivo dual (cajas de Petri, 90 × 15 mm), colocando el patógeno en el centro de la caja. En cada evaluación se realizaron tres repeticiones y se consideró utilizar tres testigos (cajas de Petri) por separado de cada uno de los fitopatógenos utilizados para este estudio. Las cajas Petri inoculadas, se incubaron por 10 días bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, EUA) a 28 °C. El crecimiento radial de las colonias se midió cada 24 h; al octavo día post-incubación, se midió el halo de inhibición entre las colonias en confrontación (Aquino-Martínez, Vázquez y Reyes, 2008). Para la evaluación del antagonismo se registraron las siguientes variables: crecimiento radial del antagonista (CRA), crecimiento radial del patógeno (CRP) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). El PICR se determinó al sexto día de post-incubación usando la fórmula propuesta por Ezziyyani, Pérez, Sid, Requena y Candela (2004),  $PRGI = [(R1 - R2) / R1] \times 100$ , donde R1 el crecimiento radial de la colonia testigo (patógeno) y R2 el crecimiento radial de la colonia del patógeno en la confrontación *in vitro*.

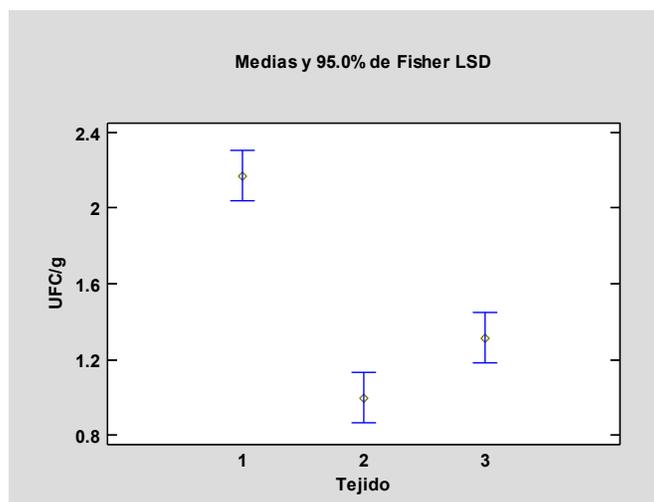
## Amplificación del Gen 16S rADN y Análisis Filogenético

La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación parcial del gen 16S ADNr, utilizando oligonucleótidos específicos F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi, Reeves, Gilichinsky y Friedmann, 1997). Posteriormente se purificó el producto de PCR con el kit Wizard®\_SV Gel y PCR Clean-Up System para su secuenciación, realizada en Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) en CINVESTAV-IPN; las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) en el programa BLASTn (NIH, 2024). Las inferencias filogenéticas se obtuvieron con el método Neighbor Joining basado en el modelo kimura-2-parámetro con prueba bootstrap 1.000 réplicas con el programa MEGA X. (Longoria-Espinoza, Leyva, Zamudio y Félix, 2024).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el aislamiento de bacterias en tejido foliar, tallo y raíz de plantas de maíz se utilizaron métodos tradicionales logrando obtener once aislados, la densidad poblacional de bacterias endófitas presentó significancia en aislados de raíz ( $2.4 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$ ), tallo ( $1.0 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ ) y tejido foliar ( $1.3 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ ), (Figura 1). Los aislados presentaron colonias traslúcidas con bordes lisos y algunas en forma de bastón y ligeramente mucosas, Gram-positivas, ocho aislados  $\beta$ -hemolíticos y tres  $\gamma$ -hemolíticos con los cuales se realizó el trabajo. Los aislados seleccionados se identificaron con base en el tejido origen (R: raíz, M: maíz), y se asignó numeración consecutiva RM1, RM2 Y RM3. Este estudio arrojó resultados similares a los reportados por Rojas *et al.* (2016), en plantas de maíz (*Zea mays* L.) híbrido P-7928, donde aislaron diez cepas de bacterias endófitas. Por otra parte, la secuenciación del producto de PCR de la amplificación parcial del gen 16S rADN permitió identificar los aislados endófitos de raíz los cuales se asociaron al phyla *Firmicutes* siendo el total de las cepas del género *Bacillus* sp., donde: RM1 (PQ187428) *B. subtilis*; RM2 (PQ187429) *B. amyloliquefaciens* y RM3 (PQ187430) *B. cereus* (Cuadro 1; Figura 2). Coincidiendo con otros estudios sobre diversidad de endófitos en maíz, donde las bacterias asociadas a raíz fueron *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira, Ibáñez, Rosenblueth, Etcheverry y Martínez, 2011) y *Burkholderia* spp. (Ikeda *et al.*, 2013). Figueiredo *et al.* (2009), reportan mayor densidad poblacional del género *Bacillus* entre las bacterias endófitas en maíz tierno brasileño. Hernández, Caballero, Pazos, Ramírez y Heydrich (2003), coinciden que las bacterias más frecuentes son el género *Bacillus*, después de *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter* en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en diferentes tipos de suelos. Lo anterior nos permite relacionar que dependiendo del hospedero, tipo de suelo, tejido y ubicación geográfica se presentan modificaciones en la composición y funcionalidad de la comunidad endófitas.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), son consideradas como opción sustentable, ya que se ha reportado que mediante la producción de fitohormonas, son utilizadas como agentes de control o inhibición de la colonización de fitopatógenos (Nehra, Saharan y Choudhary, 2016). Diferentes géneros se han reportado por sus diferentes características metabólicas como: *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., *Rhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Erwinia* spp., *Azospirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Micrococcus* spp., *Arthrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., *Caulobacter* spp., *Agrobacterium* spp., y *Serratia* spp. (Abraham-Juárez *et al.*, 2018).



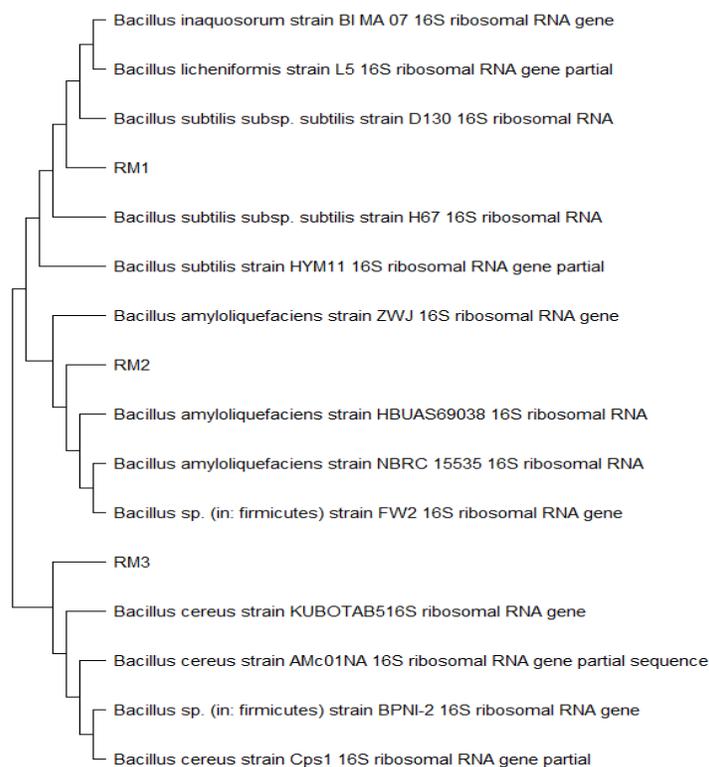
**Figura 1. Densidad poblacional de bacterias endófitas aisladas en tejido de plantas de maíz recolectadas en terrenos del campo cuatro caminos, municipio de Guasave, Sinaloa, México. Dónde: (1) raíz, (2) tallo y (3) hoja.**

**Figure 1. Population density of endophytic bacteria isolated from corn plant tissue collected from fields in the field Cuatro Caminos, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico. Where: (1) root; (2) stem; and (3) leaf.**

**Cuadro 1. Identificación molecular de bacterias endófitas aisladas de tejido vegetal en plantas de maíz blanco.**  
**Table 1. Molecular identification of endophytic bacteria isolated from plant tissue in white corn.**

Cepa	Especie/Cepa con mayor identidad en el NCBI	Pares de bases (bp)	Identidad %	No. Acceso
RM1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain V783 16 S ribosomal RNA gene partial sequence	1437	100	PQ_013975.1
	<i>Bacillus subtilis</i> strain KP1116S ribosomal RNA gene, partial sequence.	976	99	PP_708111.1
RM2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Cpl10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	1472	99	MN_960274.1
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ZWJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	1501	100	MG_575898.1
RM3	<i>Bacillus cereus</i> strain KUBOTAB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	1512	99	MK_855405.1
	<i>Bacillus cereus</i> strain AMc01NA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	1512	99	MT_052656.1

Los resultados de este trabajo, muestran a *B. subtilis* con capacidad de producción de hormonas y solubilización de fosfatos, considerándolo como buen candidato en promover crecimiento vegetal (Cuadro 2). *B. subtilis* representa gran interés como endófito, diversos estudios han demostrado que la eficiente colonización de raíces, desencadena diferentes mecanismos de biocontrol de enfermedades bióticas y abióticas (Corrales-Ramírez, Caycedo, Gómez, Ramos y Rodríguez, 2017).



**Figura 2. Neighbor-Joining Dendrograma a partir de las secuencias del gen que codifica la subunidad 16S del ADNr de bacterias endófitas aisladas en plantas de maíz recolectadas en terrenos del campo cuatro caminos, municipio de Guasave, Sinaloa, México.**

**Figure 2. Neighbor-Joining Dendrogram from the 16S Ribosomal gene subunit DNA sequences that encodes the of endophytic bacteria isolated in corn plants collected in fields of Cuatro Caminos field, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

**Cuadro 2. Características relacionadas a promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de bacterias aisladas en plantas de maíz recolectadas en terrenos del campo cuatro caminos, municipio de Guasave, Sinaloa, México.****Table 2. Characteristics related to promotion of *in vitro* plant growth of bacteria isolated in corn plants collected in the fields of the field Cuatro Caminos, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.**

Aislado	Sideróforos	Quitinasas	Fosfatos	Auxinas	IIA	Proteasas
<i>B. subtilis</i> (RM1)	+++	++	++	++	+	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> (RM2)	+++	+	+++	+++	++	++
<i>B.cereus</i> (RM3)	++	++	+++	+++	++	++
<i>B Cereus</i> **(25)	++	++	++	+	+	+

Ausencia actividad (-); + < 3mm; ++ > 3 < 4 mm; +++ > 4 mm. La letra R significa raíz, M maíz, \*\* Control positivo.  
Absence of activity (-); + < 3mm; ++ > 3 < 4 mm; +++ > 4 mm. The letter R means root, M corn, \*\* Positive control.

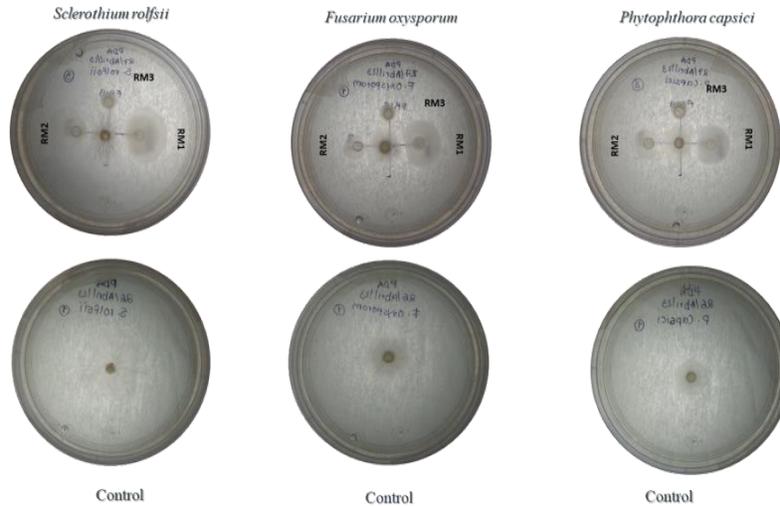
Diferentes estudios de inoculación en semilla y aisladas de tejido en plantas de maíz cepas *B. subtilis*, demuestran que presenta capacidad de producción de hormonas, favoreciendo el incremento de absorción de nutrientes (Zhang *et al.*, 2007). Por otra parte, los valores medios obtenidos de las variables mostradas en el Cuadro 2; coincide con lo reportado por ZeXun y Wei (2000); que prueban que cepas *B. amyloliquefaciens*, son productoras de fitohormonas, fijan nitrógeno y solubilizan fosfatos favoreciendo con ello el crecimiento vegetal; por otra parte diversos trabajos reportan que *B. amyloliquefaciens*, destaca por su actividad antagonista por lo que es utilizado como agente de biocontrol (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020). Estudios del genoma de *B. amyloliquefaciens*, muestran un aumento significativo en metabolitos secundarios específicos como lipopéptidos relacionados con la supresión de patógenos y desarrollo de las plantas (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020; Belbahri *et al.*, 2017).

Por otra parte *Bacillus cereus*, aislada de tejido (raíz) mostró producción de sideroforos y alta solubilización de fosfato (Cuadro 2). Coincidiendo con Chamorro-Anaya, Chamorro y Pérez (2020), quienes aislaron *B. cereus* en tejido de plantas de arroz como bacteria endófitas, presentando capacidad metabólica relacionada con promoción de crecimiento vegetal; incrementando la movilización de fosfato por diferentes mecanismos, aumentando la fertilidad de los suelos y estimulando el crecimiento en las plantas (Li *et al.*, 2023; Chamorro-Anaya *et al.*, 2020). Los resultados de la actividad antagónica experimental se muestran en la Figura 3, la inhibición del crecimiento radial del hongo osciló por arriba del 50% como se muestra en el Cuadro 3; el valor máximo de inhibición se detectó con la cepa *B. subtilis* (RM1) contra *Sclerothium rolfsii*, presentando 87.09% de inhibición. Se observó durante el ensayo de antagonismo *in vitro* que el crecimiento del hongo se detuvo a partir del sexto día lo que nos permite suponer que existe una alta competencia por espacio y nutrientes.

El control biológico, es la principal aplicación del género *Bacillus* en los agrosistemas, a su vez es utilizado para la elaboración de bioplaguicidas por su alta actividad microbiana (Chen, Tian, He, Long y Jiang, 2020). Es importante mencionar que Chamorro-Anaya *et al.* (2020), reportan a *B. cereus* en interacción positiva con la microbiota de la rizosfera, sin dejar de brindar a las plantas protección contra el ataque de patógenos. Por otra parte *B. amyloliquefaciens*, presenta diversos mecanismos metabólicos que favorecen su utilización como agente de biocontrol frente a diferentes patógenos como: *Fusarium oxysporum f.sp. Verticillium dahliae*, *Erysiphe cichoracearum*, *Phytophthora nicotianae* var. parasitica., *Fusarium avenaceum f. sp. fabae*, *Streptomyces scabies*, *Setosphaeria turcica*, *Monilinia fructigena*, *Alternaria alternata*, *F. graminearum*, *Gaeumannomyces graminis*, *lycoperisci*, *Botrytis cinerea* y *F. solani* (Castro-del Ángel, Hernández, Gallegos y Ochoa, 2021; Jiao *et al.*, 2020). Se han reportado diversas especies endofíticas de *Bacillus* aisladas en plantas de maíz, como productores de lipopéptidos antifúngicos y antimicrobianos que actúan como mecanismo de inductor a la respuesta de defensa ante el ataque de patógenos. (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020).

**Cuadro 3. Porcentaje de actividad antagónica de bacterias aisladas en plantas de maíz recolectadas en terrenos del campo cuatro caminos, municipio de Guasave, Sinaloa, México; frente a Oomycetes y hongos fitopatógenos.****Table 3. Percentage of antagonistic activity of bacteria isolated in corn plants collected in fields of Cuatro Caminos, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico; against Oomycetes and phytopathogenic fungi.**

Bacteria	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sclerothium rolfsii</i>
<i>B. subtilis</i> (RM1)	-	70.13	67.74	87.09
<i>B. amyloliquefaciens</i> (RM2)	-	50.30	51.23	62.90
<i>B.cereus</i> (RM3)	-	58.24	69.22	56.32



**Figura 3. Antagonismo *in vitro* de bacterias aisladas en plantas de maíz recolectadas en terrenos del campo cuatro caminos, municipio de Guasave, Sinaloa, México.** *B. subtilis* (RM1); *B. amyloliquefaciens* (RM2) y *B.cereus* (RM3), sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerothium rolfsii*.

**Figure 3. *In vitro* antagonism of bacteria isolated in corn plants collected in fields of Cuatro Caminos, municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico.** *Bacillus subtilis* (RM1); *B. amyloliquefaciens* (RM2) and *B.cereus* (RM3), on the mycelial growth of *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerothium rolfsii*.

## CONCLUSIONES

Es de suma importancia considerar que la abundancia de las bacterias aisladas podrían asociarse a varios factores como: condiciones climatológicas, calidad y tipo de suelo, fenología de la planta de maíz, ciclo de cultivo así como las características genéticas de la bacteria, factores que son considerados importantes en la colonización y dinámica de las comunidades de bacterias endófitas. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron identificar a *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus*, en raíz de plantas de maíz las cuales mostraron capacidad de promoción de crecimiento vegetal así como actividad antagonista contra hongos fitopatógenos. En la actualidad son pocos los reportes de especies de *Bacillus* aisladas de plantas de maíz blanco, cultivado en el municipio de Guasave, Sinaloa, México. Por lo anterior, podemos concluir que las bacterias endófitas establecen una interacción positiva, desempeñando un papel importante para el desarrollo de futuras estrategias biotecnológicas en la producción de maíz blanco, como una potencial alternativa de agricultura sostenible, que tanto requiere el campo sinaloense.

## DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

## CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

## DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

## FINANCIACIÓN

Universidad de Occidente por parte de la Dirección de Investigación y Posgrado.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: R.M.L.E. Metodología: R.M.L.E. y G.M.Z.A. Software: R.F.G. y R.M.L.E. Validación: R.M.L.E. y R.F.G. Análisis formal: R.M.L.E. Investigación: R.M.L.E. y R.F.G. Recursos: R.M.L.E. Curación de datos: R.M.L.E. y R.F.G. Escritura, preparación de borrador original: R.M.L.E. Escritura, revisión y edición: R.M.L.E. y R.F.G. Visualización: R.M.L.E. y R.F.G. Supervisión: R.M.L.E. Administración del proyecto: R.M.L.E. Adquisición de fondos: R.M.L.E.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Universidad Autónoma de Occidente y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa y Centro de Investigación y Desarrollo (CIAD) en Culiacán, Sinaloa por el apoyo para la realización de este proyecto.

## LITERATURA CITADA

- Abraham-Juárez, M., Espitia-Vázquez, I., Guzmán-Mendoza, R., Olalde-Portugal, V., Ruiz-Aguilar, G. M., García-Hernández, J. L., ... & Núñez-Palenius, H. G. (2018). Development, yield, and quality of melon fruit (*Cucumis melo* L.) inoculated with mexican native strains of *Bacillus subtilis* (EHRENBERG). *Agrociencia*, 52(1), 91-102.
- Aquino-Martínez, J. G., Vázquez-García, L. M., & Reyes-Reyes, B. G. (2008). Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. Con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 127-137.
- Belbahri, L., Chenari Bouket, A., Rekiq, I., Alenezi, F. N., Vallat, A., Luptakova, L., ... & Rateb, M. E. (2017). Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>
- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>
- Castro-del Ángel, E., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., & Ochoa-Fuentes, Y. M. (2021). Actividad antifúngica de bacterias endófitas para el control de *Fusarium verticillioides* en maíz. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2), e2790. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2790>
- Chamorro-Anaya, L. M., Chamorro-Anaya, L. M., & Pérez-Cordero, A. (2020). *Bacillus cereus* bacteria endófitas promotora de crecimiento vegetal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(2), 18-23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n2.81723>
- Chen, K., Tian, Z., He, H., Long, C. A., & Jiang, F. (2020). *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological Control*, 151, 104419. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419>
- Corrales-Ramírez, L. C., Caycedo-Lozano, L., Gómez-Méndez, M. A., Ramos-Rojas, S. J., & Rodríguez-Torres, J. N. (2017). *Bacillus* spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, 15, 45-65. <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>
- Ezziyiani, M., Pérez, C., Sid-Ahmed, A., Requena, M., & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., Ponce-González, F., & Manuel-Pinto, V. (2007). Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25, 35-42.
- Figuroa-López, A. M., Cordero-Ramírez, J. D., Martínez-Álvarez, J. C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G. J., Félix-Gastélum, R., ... & Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 5(1), 330. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1780-x>
- Figueiredo, J. E. F., Gomes, E. A., Guimarães, C. T., Lana, U. G. D. P., Teixeira, M. A., Lima, G. V. C., & Bressan, W. (2009). Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 522-534. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300014>
- García-Aguirre, G., & Martínez-Flores, R. (2010). Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(1), 15-20. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2010.001.206>
- Gonzales-Torrico, E. M., C. Cortes-Gumucio, R., Blanco-Cáceres, R., & Loayza-Aguilar, J. (2024). Microorganismos endófitos una evaluación de su importancia en la agricultura ecológica. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 5(3), 1186-1194. <https://doi.org/10.56712/latam.v5i3.2107>
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahiwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. Estados Unidos. *Journal Microbial Biochemical Technology*, 7(2), 96-102. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Hernández, A., Caballero, A., Pazos, M., Ramírez, R., & Heydrich, M. (2003). Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 45-55.
- Ikeda, A. C., Bassani, L. L., Adamoski, D., Stringari, D., Cordeiro, V. K., Glienke, C., ... & Galli-Terasawa, L. V. (2013). Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology*, 65, 154-160. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0104-0>

- Jiao, R., Munir, S., He, P., Yang, H., Wu, Y., Wang, J., ... & He, Y. (2020). Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion. *Biological Control*, 143, 104160. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104160>
- Jones, B. V., Sun, F., & Marchesi, J. R. (2007). Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 418-420. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x>
- Li, Z., Xiong, K., Wen, W., Li, L., & Xu, D. (2023). Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms24021153>
- Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y., Wang, J., & Song, W. (2013). Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology*, 63, 71-79.
- Longoria-Espinoza, R. M., Leyva-Ruiz, C., Zamudio-Aguilasocho, G. M., & Félix-Gastélum, R. (2024). Caracterización de bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 1-10. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-4>.
- Loper, J. E., & Schroth, M. N. (1986). Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4), 386-389. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386>
- Montañez-De Azcué, D., Cristóbal-Alejo, J., Uc-Vázquez, A., Moo-Koh, F. A., & Tun-Suárez, J. M. (2024). Efecto antifúngico in vitro de hongos endófitos de cucurbitáceas criollas de Yucatán. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 11(2), e3992. <https://doi.org/10.19136/era.a11n2.3992>
- Nehra, V., Saharan, B. S., & Choudhary, M. (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *Springerplus*, 5, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2584-8>
- NIH (National Center for Biotechnology Information) (2024). Programa Informático BLASTn. Consultado el 20 de enero, 2024, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Noble, M.A. (2002). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. *Clinical Chemistry*, 48(10), 1816-1816. <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1816>
- Orberá, T., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada*, 31(1), 7-12.
- Pasarell, L., & McGinnis, M. R. (1992). Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4), 1000-1004.
- Pereira, P., Ibáñez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M., & Martínez-Romero, E. (2011). Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture dependent and culture independent methods. *International Scholarly Research Notices*, 2011(1), 1-10. <https://doi.org/10.5402/2011/938546>
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of Phosphorus in Soil in Connection with Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Rojas, M. M., Tejera, B., Bosh, D. M., Ríos, Y., Rodríguez, J., & Heydrich, M. (2016). Potentialities of *Bacillus* strains for promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3), 485-496.
- Rodríguez-Hernández, M. G., Gallegos-Robles, M. Ángel, Rodríguez-Sifuentes, L., Fortis-Hernández, M., Luna-Ortega, J. G., & González-Salas, U. (2020). Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 313-321. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonista de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325-1332. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v5i7.877>
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) (2020). Maíz mexicano, un alimento con mucho valor. Consultado el 13 de febrero, 2022, desde <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-mexicano-un-alimento-con-mucho-valor?idiom=es>
- SAS Institute (2004). *Statistical Analysis System. User's Guide. Release 9.1.3* Cary, NC, USA: SAS Institute, Inc.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3ª ed.). St. Paul, Minnesota, USA: Aps Press.
- Sánchez-Bautista, A., León-García de Alba, C. D., Aranda-Ocampo, S., Zavaleta-Mejía, E., Nava-Díaz, C., Goodwin, P. H., & Leyva-Mir, S. G. (2018). Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 35-55. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-3>
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., Balasubramanian, N., & Manoharan, P. T. (2008). Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporus* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, 7(15), 2562-2568.
- Shi, T., Reeves, R. H., Gilichinsky, D. A., & Friedmann, E. I. (1997). Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology*, 33, 169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>
- Yang, C. J., Zhang, X. G., Shi, G. Y., Zhao, H. Y., Chen, L., Tao, K., & Hou, T. P. (2011). Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. *African Journal of Microbiology Research*, 5(2), 131-136.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., ... & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 839-851. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>
- ZeXun, L., & Wei, S. (2000). Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 6, 66-69.