

Mecanismos de acción de microorganismos marinos y el inductor de resistencia ulvan para el control de *Fusarium proliferatum* en frutos de *Cucumis melo* L. var. *Reticulatus*

Tomás Rivas García*, Luis Guillermo Hernández Montiel y Bernardo Murillo Amador

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.,
elton_r@hotmail.com

Resumen: El control biológico y el uso de inductores de resistencia son estrategias alternativas al uso de agroquímicos para el control de plagas y patógenos. En este trabajo se evaluaron los mecanismos de acción de la levadura *Debaryomyces hansenii*, la bacteria *Stenotrophomonas rhizophila* y ulvan para controlar la pudrición del fruto de melón (*Cucumis melo* L.). Se aisló e identificó al hongo fitopatógeno (*F. proliferatum*). Mediante inoculación *in vitro* y en fruto, se demostró que *D. hansenii* y *S. rhizophila* son antagonistas de *F. proliferatum* por mecanismos como: parasitismo, competencia por nutrientes y producción de enzimas líticas, compuestos volátiles y surfactantes; y que ulvan no es antimicrobiano. *D. hansenii* y *S. rhizophila* en conjunto con ulvan inducen una mayor actividad antioxidante, resistencia del fruto y el control de la pudrición de melón en poscosecha. **Palabras claves:** control biológico, microorganismos marinos, *Cucumis melo*.

Abstract: Biological control and the use of resistance inducers are alternative strategies to the use of agrochemicals for the control of pests and

parasitismo, competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas líticas, compuestos volátiles, surfactantes e inducción de resistencia, entre otros, es una alternativa viable al tratamiento convencional (Kohl et al 2019). Además, el polisacárido ulvan extraído de la macroalga *Ulva* spp. ha sido utilizado previamente como inductor de resistencia en plantas y en tratamiento conjunto con los agentes de control biológico puede incrementar la eficiencia del tratamiento propuesto (Chiquito-Contreras et al 2019). Por lo anterior, es importante elucidar los mecanismos de acción involucrados en este tratamiento conjunto para optimizar su desempeño en contra de patógenos en los cultivos.

Usuarios. El presente estudio está dirigido a los productores cuya finalidad es la exportación de productos libres de agroquímicos y/o aquellos productores que buscan tratamientos compatibles con la producción orgánica. También, al disminuirse los riesgos asociados al uso de agroquímicos, se beneficia la sociedad en general.

Objetivos. Evaluar mecanismos como competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas líticas, inhibición por compuestos volátiles, producción de biosurfactantes e inducción de resistencia de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan como tratamiento

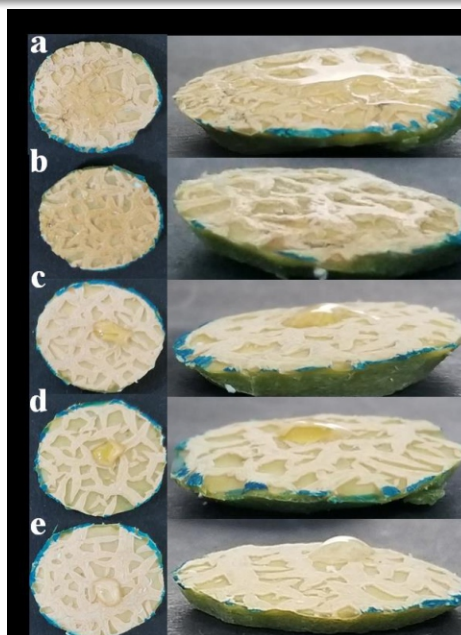


Figura 2. Actividad biosurfactante por *D. hansenii* y *S. rhizophila* en cascara de melón. Gotas de: a) Sobrenadante de *D. hansenii* cultivado por 7 días, b) Sobrenadante de *S. rhizophila* cultivado por 7 días. Como tratamientos control: c) CPD, d) CST y e) agua destilada estéril. NOTA: La capacidad surfactante permite la extensión de la gota sobre el exocarpo de melón (membrana hidrófoba).

la producción de compuestos volátiles (Raza et al 2016) se determinó por cultivo dual de cajas selladas con parafilm; la producción de biosurfactantes (Otsu et al., 2004) por sobrenadantes de medios líquidos inoculados con *D. hansenii* y *S. rhizophila* sobre membranas hidrófobas (parafilm);

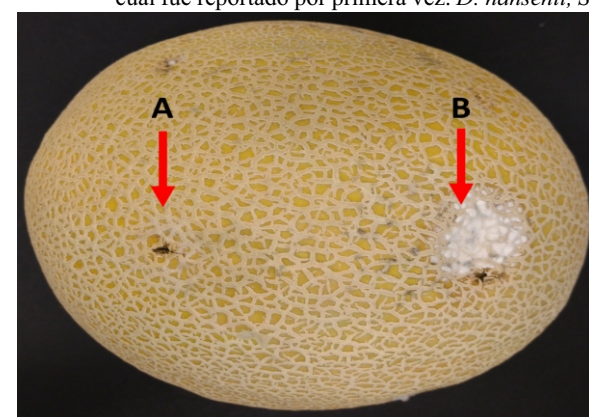
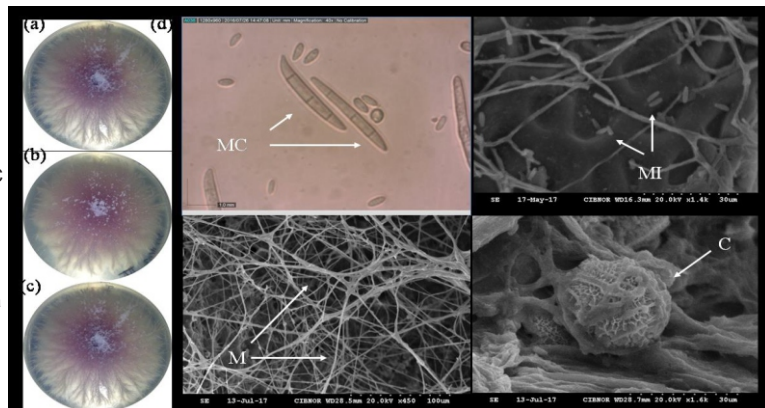


Figura 3. Tiempos de inoculación. Frutos de melón inoculados con A) *D. hansenii* + *S. rhizophila* + ulvan, 24 h antes de la inoculación del patógeno; B) Tratamiento control (*F. proliferatum*).

Figura 1. Identificación de *Fusarium proliferatum*. Características morfológicas macroscópicas de tres de las cepas aisladas (a, b, c) en PDA a 28 °C por 7 días. Principales estructuras microscópicas en microscopio óptico (d), macroconidio y en microscopía electrónica de barrido (MEB) [MC], microconidio [MI], micelio [M] y clamidosporas [C].



pathogens. In this work the mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces hansenii*, the bacteria *Stenotrophomonas rhizophila* and ulvan were evaluated to control the rot of the melon fruit (*Cucumis melo* L.). The phytopathogen fungus (*F. proliferatum*) was isolated and identified. Through

in vitro and fruit inoculation, it was demonstrated that *D. hansenii* and *S. rhizophila* are antagonists of *F. proliferatum* by mechanisms such as parasitism, competition for nutrients and production of lithic enzymes, volatile compounds and surfactants; and that ulvan is not antimicrobial. *D. hansenii* and *S. rhizophila* in conjunction with ulvan induce increased antioxidant activity, fruit resistance and control of postharvest melon rot. **Keywords:** biological control, marine microorganisms, *Cucumis melo*.

Área 6: Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

Introducción: A pesar de que el melón es comercializado mundialmente por su sabor y contenido nutricional, hay pérdidas de hasta el 50% de la producción mundial por enfermedades fúngicas tales como la pudrición del fruto por *Fusarium* spp, ya que esta enfermedad disminuye la calidad del fruto y su vida de anaquel (Rivas-García et al 2018). Los fungicidas sintéticos son el tratamiento convencional; sin embargo, su mal uso ocasiona problemas de salud, contaminación y resistencia microbiana (Dukare et al 2019). El control biológico con levaduras y bacterias mediante mecanismos de acción como:

conjunto o individual para el control de *F. proliferatum* en frutos de melón.

Materiales y Métodos. La morfología del hongo fitopatógeno se determinó por medio de claves taxonómicas descritas por Nelson et al. (1994). Para la identificación molecular se amplificaron por PCR tres fragmentos de genes (ITS1-5.8s-ITS4, β -Tubulina, TEF-1 α) del ADN del hongo fitopatógeno y sus secuencias se compararon con las secuencias de hongos almacenadas en la base de datos del GenBank del NCBI. Para seleccionar la levadura y bacteria con mejor actividad antifúngica *in vitro*, se realizó una prueba de antagonismo por cultivo dual en placa con microorganismos de la colección de cepas del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR S. C.). Posteriormente, con la levadura (*D. hansenii*) y la bacteria (*S. rhizophila*) seleccionadas se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* del crecimiento micelial e inhibición de la germinación de esporas del fitopatógeno. Para determinar el efecto de ulvan tenía un efecto antimicrobiano, se inocularon a *D. hansenii*, *S. rhizophila* y *F. proliferatum* en medios líquidos y sólidos con ulvan a diferentes concentraciones. En la competencia por nutrientes se cuantificó glucosa (Kit Randox, 490 nm), fructosa (triptamida-HCl, 518 nm) y sacarosa (HCl-DNS, 570 nm) en medio suplementado con tejido de melón (Rivas-García et al 2019). En los mecanismos de acción evaluados:

la producción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas y proteasas) (Hernández-Montiel et al., 2018) se evaluó por técnicas colorimétricas. Finalmente se evaluaron variables de inducción de resistencia (enzimas antioxidantes), parámetros de calidad del fruto (pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles totales, pH) y tiempos de inoculación (Wang et al 2018). En todos los experimentos el diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento y el experimento se realizó dos veces. Los datos fueron tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de medias de Fisher (LSD) a un nivel de significancia del 5% ($P \leq 0.05$), con el programa estadístico Statistica v.10.0 (StatSoft 2011)..

Resultados y Discusión: Se aisló e identificó a *F. proliferatum* como agente causal de la pudrición de los frutos de melón enfermos colectados (Figura 1). Las secuencias obtenidas tuvieron un porcentaje de identidad del 100% con secuencias de cepas de *F. proliferatum* del NCBI (claves de acceso: KT218534.1; KP964908.1; KT803067.1) De la selección realizada por antagonismo en cultivo dual se tomaron a una cepa de *D. hansenii* y una de *S. rhizophila* por tener

mayor actividad antagonística *in vitro*. En la prueba de inhibición de la germinación de esporas *D. hansenii* y *S. rhizophila* tuvieron un 52% y 78% de inhibición respectivamente. En comparación con el tratamiento control, ulvan no inhibió el crecimiento en medio líquido y sólido de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y *F. proliferatum*. En la cuantificación de glucosa, sacarosa y fructosa para determinar la competencia por nutrientes, el medio donde se inocularon en conjunto a *D. hansenii* y *S. rhizophila* tuvo la menor concentración de carbohidratos y el mayor porcentaje de inhibición de la germinación de *F. proliferatum*. Al evaluar los posibles mecanismos de acción de *D. hansenii* y *S. rhizophila*, el tratamiento conjunto mostró la mayor producción de glucanasa (120 U mL⁻¹), quitinasa (6000 U mL⁻¹) y proteasa (2100 μ g mL⁻¹) respectivamente. Ambos microorganismos inhibieron el crecimiento de *F. proliferatum* en un 48 y 37% por producción de compuestos volátiles y también produjeron compuestos biosurfactantes (Figura 2). El tratamiento individual y conjunto de *D. hansenii*, *S. rhizophila* y ulvan incrementaron la actividad de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y fenil alanina amonio liasa). En comparación con el tratamiento control, las variables de calidad de los frutos mostraron que se retrasó la maduración, con lo cual se incrementó la vida de anaquel de los frutos. En los tiempos de inoculación, todos los tratamientos fueron eficientes para inhibir la pudrición del melón de manera preventiva, es decir, cuando se aplicaron antes o en conjunto con el fitopatógeno *F. proliferatum* no se presentó ninguna enfermedad (Figura 3). En conclusión, *F. proliferatum* es el agente causal de la pudrición de frutos de melón, lo cual fue reportado por primera vez. *D. hansenii*, *S.*

rhizophila y ulvan en tratamiento individual o conjunto son una alternativa para el control de la enfermedad. Sin embargo, su eficiencia es condicionada a un tratamiento preventivo. *D. hansenii* y *S. rhizophila* inhiben la proliferación de *F. proliferatum* por mecanismos como: parasitismo directo, competencia por nutrientes, producción de enzimas líticas, biosurfactantes y compuestos volátiles para tener información con mayor detalle, precisión y refinamiento de la escala.

Impacto socioeconómico: La reducción significativa de la incidencia de la enfermedad con el tratamiento propuesto puede ser útil para disminuir las pérdidas poscosecha del melón que son de hasta el 50% de la producción. Dicho tratamiento podría ser aplicado en las áreas de empaque sustituyendo el sumergimiento de los frutos en fungicidas como Imazalil y Pirimetanil. Este tratamiento da valor agregado al producto siendo compatible con la agricultura orgánica. **Agradecimientos:** Proyecto SEP-CONACYT 181973 y Proyecto de Problemas Nacionales 2015-01-352 CONACYT.

Contacto PCTI:
hnlasco2008@hotmail.com