



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA PRESIDENTE JUÁREZ

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL**

TESIS

**Como requisito para obtener el grado de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Persea americana* Mil var. *hass* A
BACTERIAS ENDÓFITAS AISLADAS DE FRUTO CON SÍNTOMAS DE
ABSCISIÓN**

ELVA ALICIA CERVANTES CÁRDENAS

Tutora: Doctora en Ciencias Agrícolas
Ma. Blanca Nieves Lara Chávez

Cotutora: Dra. En Ciencias Agrícolas
Maribel Gutiérrez Contreras

Uruapan Michoacán, Marzo del 2016

CONTENIDO

	Página	
LISTA DE CUADROS	iii	
LISTA DE FIGURAS	v	
RESUMEN GENERAL	vii	
OVERVIEW	viii	
INTRODUCCIÓN GENERAL	1	
LITERATURA CITADA	5	
CAPÍTULO I	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A LA ABSICIÓN TEMPRANA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> MILL. var. <i>hass</i>)	8
	RESUMEN	8
	ABSTRACT	9
	INTRODUCCIÓN	10
	MATERIALES Y MÉTODOS	13
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
	CONCLUSIONES	27
	LITERATURA CITADA	27
	APÉNDICE	33
CAPÍTULO II	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE FRUTOS DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>)	35
	RESUMEN	35
	ABSTRACT	36
	INTRODUCCIÓN	37
	MATERIALES Y MÉTODOS	39
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42

	CONCLUSIONES	51
	LITERATURA CITADA	52
	APÉNDICE	57
CAPÍTULO III	RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>) A LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS	58
	RESUMEN	58
	ABSTRACT	59
	INTRODUCCIÓN	60
	MATERIALES Y MÉTODOS	63
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
	CONCLUSIONES	72
	LITERATURA CITADA	72
	APÉNDICE	75
	CONCLUSIONES GENERALES	77

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A LA ABSICIÓN TEMPRANA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> MILL. var. <i>hass</i>)	
Cuadro 1. Colectas de frutos con y sin síntomas de abscisión del pedúnculo en <i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i> en huertos de la franja aguacatera de Michoacán.	14
Cuadro 2. Cultivos bacterianos obtenidos de frutos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>) con síntomas y sin síntomas de abscisión en los huertos seleccionados en Michoacán.	18
Cuadro 3. Características morfológicas coloniales de los cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de <i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i> con y sin síntomas de abscisión.	21
Cuadro 4. Identificación de las cepas bacterianas obtenidas de la cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos de la patología abscisión del fruto de aguacate, mediante pruebas bioquímicas establecidas para bacterias fitopatógenas.	23
Cuadro 1A. Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a cada uno de los cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos de abscisión del fruto de aguacate.	33
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE LA SEMILLA DE FRUTOS DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>)	
Cuadro 1. Secuencias homologas del GenBank utilizadas en los análisis filogenéticos de las cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate con síntomas de abscisión.	44
Cuadro 2. Contenido de GC (porcentaje) en las secuencias resultantes de las 18 cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.	49
Cuadro 1A. Cepas de cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de frutos de aguacate identificados mediante pruebas fenotípicas.	57
CAPÍTULO III. RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>) A LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS	

Cuadro 1A. Caracterización de las cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal del fruto de aguacate y su respuesta a pruebas fenotípicas de patogenicidad.

75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A LA ABSICIÓN TEMPRANA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> MILL. var. <i>hass</i>)	
Figura 1. Pruebas bioquímicas empleadas en la identificación de las cepas bacterianas. A) anaerobiosis, B) fluorescencia, C) colonias amarillas sobre YDC, D) ureasa, E) oxidasa, F) crecimiento a 40°C, G) producción de indol, H) leche Litmus.	15
Figura 2. Frutos de <i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i> provenientes de seis huertos del estado de Michoacán. A) fruto asintomático de la abscisión del fruto y B) fruto sintomático.	17
Figura 3. Frecuencia de cultivos bacterianos aislados de frutos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>) con y sin síntomas de abscisión, cultivados en huertos bajo condición de temporal y riego a tres niveles de altitud (baja, media y alta).	19
Figura 4. Crecimientos bacterianos de 24 h de edad aislados de la cubierta seminal de <i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i> , en medio de cultivo PDA.	20
Figura 5. Pruebas de patogenicidad de bacterias aisladas de frutos de <i>Persea americana</i> var <i>hass</i> asintomáticos y sintomáticos de abscisión. A) pudrición en papa, izquierda testigo reacción negativa, derecha reacción positiva; B) pudrición en zanahoria, izquierda testigo reacción negativa, derecha reacción positiva; C) hipersensibilidad en tabaco, reacción positiva (↑).	25
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE LA SEMILLA DE FRUTOS DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>)	
Figura 1. Visualización del ADN de los 36 cultivos bacterianos, obtenidos de la cubierta seminal del fruto de aguacate. Identificados con la letra B de bacteria y un número que representa el consecutivo del orden de aislamiento. Las cepas B11 y B14 fueron excluidas de este estudio.	42
Figura 2. Visualización del producto de PCR de 20 cultivos bacterianos, obtenidos de la cubierta seminal del fruto de aguacate.	43
Figura 3. Cladograma obtenido con base a Neighbor Joining con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.	46

Figura 4. Cladograma obtenido con base en la máxima parsmonia con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.	47
Figura 5. Cladograma obtenido con base a la máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.	48
CAPÍTULO III. RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL FRUTO DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill var. <i>hass</i>) A LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS	
Figura 1. Inoculación <i>in situ</i> de bacterias aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate. A) solución bacteriana, B) desinfestación, C) perforación, D) inoculación, E) sellado, F y G) condición de incubación.	64
Figura 2. Escala para la sintomatología externa (S_e) de abscisión del fruto de aguacate. A) sin lesión, B) anillamiento en el pedúnculo sin cambio en la epidermis y C) anillamiento en el pedúnculo con cambio de coloración en la epidermis.	65
Figura 3. Escala de la sintomatología interna de abscisión del fruto de aguacate. A) sin lesión, B) lesión de la testa, C) lesión en semilla y testa y D) lesión en más del 50 % del fruto.	65
Figura 4. Tiempo de aparición de la lesión (T_{as}) post inoculación (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).	67
Figura 5. Severidad de la lesión en sintomatología externa del fruto (S_e) (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).	69
Figura 6. Severidad de la lesión en sintomatología interna del fruto (S_i) (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).	70
Figura 7. Severidad mostrada en la parte externa e interna del fruto, post inoculación de las cepas bacterias aisladas de la patología abscisión del fruto de aguacate.	71

RESUMEN GENERAL

México es el principal país productor de aguacate a nivel mundial, sin embargo, el rendimiento que presenta (10.17 t ha^{-1}) no es el mejor. Las enfermedades de fruto son consideradas de las más importantes. La abscisión temprana del fruto regionalmente conocida como anillamiento del pedúnculo se presenta en los primeros estados de desarrollo del fruto y puede llegar a provocar hasta un 45 % de pérdida. Aunque es una enfermedad mundialmente reportada, son muy pocos los estudios que se han hecho en torno a la misma. Como causantes de ésta, se señalan un conjunto de factores asociados, entre los que destacan las bacterias cuando existe una pudrición en la cubierta seminal del fruto. Debido a que la entrada de las bacterias a la planta normalmente es por heridas o aberturas naturales (lenticelas, estomas, hidátodos), se asume que las bacterias están asociadas de manera endofítica. Actualmente no existe información documentada sobre bacterias endófitas causantes de la abscisión del fruto del aguacate; por lo que en el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo aislar, caracterizar y determinar el efecto de bacterias endófitas presentes en el fruto de aguacate *hass*, sobre su desarrollo fisiológico. Se realizaron seis colectas en huertos de aguacate *hass* pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, de los cuales, se aislaron 36 cultivos bacterianos de la cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos, de éstos se caracterizaron fenotípicamente los géneros *Pantoea*, *Erwinia*, *Burkholderia* y corineformes, mientras que en la caracterización molecular los géneros identificados fueron: *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus*; éstos últimos, son nuevos reportes asociados a la abscisión temprana del fruto de aguacate. Con la inoculación sobre los frutos se causó el efecto del daño de las cepas bacterianas aisladas del síntoma de abscisión. Lo anterior determinó que las bacterias endófitas encontradas en la cubierta seminal del fruto de aguacate, produjo la abscisión temprana de frutos.

Palabras clave: aguacate, pedúnculo, patogenicidad, cepas e inoculación.

OVERVIEW

México is the first producer of avocado in the world, nevertheless, the yield presents (10.17 t ha⁻¹) isn't the best. Fruits disease are considered the most important. Early fruit abscission regionally known as peduncle banding occurs in the early stages of fruit development and may eventually lead to a 45% loss. Although it is a worldwide disease reported, very few studies have been done about it. To cause this, a set of associated factors, among which bacteria stand when there is a rot in the seed coat of the fruit are. Because the entry of bacteria to the plant is normally by wounds or natural openings (lenticels, stomata, hydathodes), it is assumed that the bacteria are associated endophytic manner. Currently there is no documented information on endophytic bacteria causing the avocado fruit abscission; so in the present investigation the objective was to isolate, characterize and determine the effect of endophytic bacteria in the fruit of *hass* avocado on their physiological development. Six collections were made in orchards of *hass* avocado belonging to the avocado strip the state of Michoacan, of which 36 bacterial cultures were isolated of the seed coat of symptomatic fruits and asymptomatic, of these isolated were phenotypically characterized the genera *Pantoea*, *Erwinia*, *Burkholderia* and coryneform, while in the molecular characterization the genera identified were: *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* and *Bacillus*; the latter are new reports associated with early fruit abscission avocado. With the inoculation on the fruits the damage effect of the bacterial strains isolated of the abscission symptom. This determined that endophytic bacteria found in the seminal cover avocado fruit produced early fruit abscission.

Key words: avocado, peduncle, pathogenicity, strains and inoculation.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Miller) y su comercialización, generan alrededor de 47 mil empleos directos y 70 mil empleos estacionales, equivalente a 10.5 millones de jornales anuales, además de 187 mil empleos indirectos permanentes (Téliz y Marroquín, 2007).

Actualmente la producción de aguacate se encuentra distribuida en los cinco continentes; en América, se concentra la mayor producción mundial (70.3 %), seguido de África (15.2 %), Asia (10.9 %), Europa (1.9 %) y Oceanía (1.6 %) (FAOSTAT, 2015). Los principales países productores son: México con una producción total de 1,467,837 t, seguido de República Dominicana (387, 546 t), Colombia (303, 340 t), Perú (288,387 t) e Indonesia (276,311 t). Sin embargo, México no es el país que presenta el mayor rendimiento por ha, no se posiciona dentro de los cinco países con mayor rendimiento; México representa sólo un 33 % en su rendimiento por hectárea respecto a República Dominicana, quien se mantiene en el primer lugar con una producción de 29.99 t ha⁻¹ (FAOSTAT, 2015).

Éstos rendimientos en México, pueden atribuirse a factores climáticos que provocan estrés como son heladas y granizadas, los cuales están determinados por la zona de establecimiento de los huertos (Gazit y Degani, 2007) o por enfermedades causadas por agentes bióticos, ambos factores señalados como limitantes para la producción de este cultivo (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010). Las enfermedades que se presentan en el aguacate pueden llegar a afectar hasta el 40 % de la producción (Morales y Vidales, 1994).

Mundialmente las principales enfermedades del fruto son: antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), pudrición peduncular ("stem end rot"), mancha por *Cercospora* (*Pseudocercospora purpurea*) y sarna (*Sphaceloma persea*) (Pegg *et al.*, 2007). Sin embargo, existe una enfermedad que afecta directamente el rendimiento, conocida comúnmente como anillamiento del pedúnculo (Martínez y Domínguez, 1974) o anillo del cuello del fruto (Coit, 1928); se presenta como una

abscisión temprana del fruto en los primeros estados de desarrollo (Coit, 1928). Esta patología se encuentra ampliamente distribuida en países productores como, Estados Unidos, Australia, Israel, Perú, Argentina y Sudáfrica (Snowdon, 1990). Aunque es una enfermedad mundialmente reportada, son muy pocos los estudios que se han hecho en torno a la misma. El primer estudio documentado sobre la abscisión del fruto, lo realizó Haas (1936), en donde concluye que el cloro presente en el agua con la que se realizan las labores de campo (riego y aspersiones foliares) es el factor determinante de este problema. Más tarde, Toerien (1979) estableció la relación nutrimental asociada a esta problemática; sin embargo, Coit (1928) señala, que puede existir un organismo causal.

En Michoacán, México, se ha observado la caída hasta de 200 frutos en sus distintas etapas de desarrollo en un solo árbol (Ochoa, 2000). Es tan fuerte su impacto en la producción, que llega a provocar hasta un 45 % de pérdida (Cosío-Vargas *et al.*, 2008). De la misma manera, en México, se señala que son varios factores asociados los que pueden causar o provocar la abscisión del fruto de aguacate en estados tempranos de desarrollo (Morales y Vidales, 1994; Ochoa *et al.*, 2001; Salazar-García *et al.*, 2006).

Salazar-García *et al.* (2006) indican, que la abscisión del fruto conocido como “caída de junio”, es debida a una competencia por carbohidratos y agua; además, también han sido asociadas a deficiencias nutricionales de zinc y boro (Morales y Vidales, 1994; Ochoa, 2000) y a un desequilibrio hormonal por parte del árbol (Bower y Cutting, 1988; Salazar-García *et al.*, 2006) Una investigación realizada en Israel mostró que, previo a la caída del fruto, se observó un aumento en la concentración de hormonas llamadas inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico y el etileno (Blumenfeld y Gazit, 1974). En Michoacán, se han encontrado asociados los organismos causales a esta enfermedad a hongos (Salgado y Saavedra, 1994; Tovar *et al.*, 2005) y bacterias (Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005).

Se asume la participación de bacterias en frutos con síntomas de abscisión, cuando existe una pudrición en la testa de la semilla (Ochoa *et al.*, 2001) o

cubierta seminal. Diversos autores han identificado mediante técnicas morfológicas y bioquímicas a bacterias de los géneros *Xanthomonas* (Martínez y Domínguez, 1974; Gudiño, 1998; Ochoa *et al.*, 2001), *Pseudomonas* (Gudiño, 1998; Ochoa, 2000; Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005), *Corynebacterium* y *Erwinia* (Gudiño, 1998).

Debido a que la entrada de las bacterias a la planta normalmente es por heridas o aberturas naturales (lenticelas, estomas, hidátodos) (Sigee, 2005), se podría suponer que las bacterias están asociadas de manera endofítica. Las endófitas son reconocidas como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente en espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares (Bacon y White, 2000); estas se encuentran de manera latente o activa y colonizan los tejidos de la planta local o sistémicamente (Hallmann, 1997). Sin embargo, las asociaciones planta-bacteria son dinámicas y cualquier desbalance en las condiciones ambientales, genéticas o microbiológicas que perturben la asociación, puede favorecer a una de las partes sobre la otra (Misaghi y Donndelinger, 1990). Cuando ésto ocurre, el hábitat se convierte en no apto para la bacteria o la planta que la acoge, se vuelve susceptible a ella con la creación de una relación patogénica (Sigee, 2005; Kado, 2010). El límite entre patógenos y endófitos no siempre está claramente limitado, ya que evolutivamente, las endófitas aparecen como intermediarios entre bacterias saprófitas y patogénicas (Pérez *et al.*, 2010).

Actualmente, en el cultivo del aguacate no existe información documentada sobre bacterias endófitas asociadas a la patología abscisión del fruto de aguacate, por lo que en la presente investigación se plantea la siguiente hipótesis y objetivos.

Hipótesis:

- Bacterias endófitas aisladas de frutos de aguacate con síntomas de abscisión son las causantes de la enfermedad conocida como abscisión del fruto de aguacate.

Objetivo general:

- Aislar, caracterizar y determinar el efecto de bacterias endófitas presentes en fruto de aguacate *hass*, sobre su desarrollo fisiológico.

Objetivos específicos:

- Aislar bacterias presentes en la cubierta de la semilla de frutos de aguacate *hass* con y sin síntomas de abscisión.
- Identificar mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares las bacterias aisladas.
- Evaluar el efecto de las bacterias endófitas sobre la abscisión de frutos de aguacate.

LITERATURA CITADA

- Bacon C. W. and J. F. White (2000)** Microbial Endhopytes. Marcel Dekker Inc. New York. 492 p.
- Blumenfeld A. and S. Gazit (1974)** Development of seeded and seedless avocado fruits. *Journal of the American Society Yearbook* 54:100-104.
- Bower J. and J. Cutting (1988)** Avocado fruit development and ripening physiology. *In: J. Janick. Horticultural Reviews* 10:229-271.
- Coit J. E. (1928)** Pests and deseases of the avocado. California Avocado Growers Association Yearbook. 18-21
- Cossio-Vargas L. E., S. Salazar-García, I. J. González-Durán y R. Medina-Torres (2008)** Fenología del aguacate ‘Hass’ en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 319-324.
- Cruz M. J., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, C. M. Gutiérrez, P. S. Aguirre, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005)** Control del anillamiento del aguacate con productos biodegradables. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Notas Científicas. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Uruapan, Michoacán, México. pp: 77-84.*
- FAOSTAT (2015)** <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> (Accesada en Agosto 2015).
- Gazit S. y C. Degani (2007)** Biología reproductiva. *In: El palto. Botánica, producción y usos. A. W. Whiley, B. Schaffer y B. N. Wolstenholme. Ediciones Universitarias de Valparaiso. pp:131-144.*
- Gudiño J. J. L. (1998)** Efecto de 8 niveles de fertilización para reducir el anillamiento del pedúnculo del fruto; aislamiento de fitopatógenos y patogenicidad, para aguacate Persea americana Mill CV ‘Hass’ en Tingambato, Mich. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” U.M.S.N.H. Uruapan, Michoacán, México.98 p.
- Gutiérrez-Contreras M., M. B. N. Lara-Chávez, H. Guillén-Andrade y A. T. Chávez-Bárceñas (2010)** Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia* 35:647-653.

- Haas A. R. C. (1936)** Chlorine in relation to ring-neck in avocado fruits. *California Avocado Association Yearbook* 21:60-62.
- Hallmann J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee and J. W. Kloepper (1997)** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:895-914.
- Kado C. I. (2010)** Plant Bacteriology. APS Press. E.U.A. 336 p.
- Martínez B. R. y C. J. M. Domínguez (1974)** Identificación del agente causal del anillamiento del pedúnculo del aguacate en la región de Uruapan, Mich. *In: Simposio Nacional de Fitopatología Agrícola*. Mazatlán, Sinaloa. Noviembre de 1974 pp:72.
- Misaghi I.J. y C. R. Donndelinger (1990)** Endophytic bacteria in symptom- free Cotton plants. *Phytopathology* 80:808-811.
- Morales G. J. L. y F. J. A. Vidales (1994)** Enfermedades del aguacate en Michoacán. Folleto para productores N° 24. SARH-INIFAP-CIPAC. Uruapan, Michoacán, México. 19 p.
- Ochoa A. S. (2000)** Anillamiento del pedúnculo, patógenos varios. *In: Enfermedades del aguacatero en el estado de Michoacán, México. Memorias del III Seminario Taller sobre aguacate, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Uruapan Michoacán, México.* pp:26-35.
- Ochoa A. S., M. J. Campos y G. R. Mendoza (2001)** Identificación de bacterias asociadas en el anillamiento del Pedúnculo del Aguacatero. *In: Memorias del Primer Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate*. Uruapan, Michoacán, México. pp:198-199.
- Pegg K. G., L. M. Coates, L. Korsten y R. M. Harding (2007)** Enfermedades foliares, del fruto y el suelo. *In: El Palto Botánica, Producción y Usos*. A. W. Wiley, B. Schaffer y B. N. Wolstenholme, Traducción 1a ed. Ediciones Universitarias de Valparaiso. Litogarín, Valparaiso. pp:275-310
- Pérez C. A., S. J. Rojas y C. F. Fuentes (2010)** Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 15: 219-228
- Salazar-García S., L. E. Cossio-Vargas, I. J. L. González-Durán, R. Medina-Torres y C. J. Lovatt (2006)** Efecto de aspersiones con biorreguladores

vegetales sobre la intensidad de la “caída de fruto de junio”, rendimiento y tamaño de fruto en aguacate ‘Hass’. Congreso de Ciencia y Tecnología Nayarit 2006. Tepic, Nayarit. 17-19 Mayo. pp:1-10

Salgado S. M. L. y G. C. Saavedra (1994) Aislamiento de hongos asociados a la enfermedad conocida como anillamiento del pedúnculo del aguacate. *In: Memoria CICTAMEX. Fundación Salvador Sánchez Colín, Coatepec Harinas México. pp:183-187.*

Sigee D. C. (2005) Bacterial plant pathology, cell and molecular aspects. Cambridge University Press. 325 p.

Snowdon L. A. (1990) A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. 1:103

Téliz O. D. y P. F. J. Marroquín (2007) Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. *In: El aguacate y su manejo integrado. O. D. Téliz y A. A. Mora. 2ª ed. Mundi Prensa. Ixtapaluca, Edo. De México. pp:1-28.*

Toerien J. C. (1979) Seasonal incidence of ring-neck on avocados and posible causes. *South Africa Avocado Grower's Association Research Report* 3:49-51

Tovar R. J. C., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005) Efecto del fertirriego sobre la incidencia del anillamiento del pedúnculo del fruto del aguacate. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Notas Científicas. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Uruapan, Michoacán, México. pp: 85-92.*

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS A LA ABSICIÓN TEMPRANA DEL FRUTO DE AGUACATE (*Persea americana* MILLER var. *hass*)

RESUMEN

La abscisión del fruto de aguacate, comúnmente conocida como anillamiento del pedúnculo es una patología que se presenta en el cultivo, en los primeros estados de desarrollo del fruto, llega a provocar un 45 % de pérdida ya que induce la caída de hasta 200 frutos por árbol. Este problema se encuentra mundialmente reportado, sin embargo, son muy pocos los estudios documentados en torno al mismo. Investigadores coincide en que son varios los factores asociados que pueden causar o provocar la abscisión del fruto de aguacate, entre ellos las bacterias; cuando existe una pudrición en la cubierta seminal del fruto a éstas se asume su participación. Debido a que la entrada de las bacterias es por heridas o aberturas naturales, se podría suponer que las bacterias están asociadas de manera endófitica; ésta relación puede ser benéfica o patogénica, sin embargo, esto dependerá de la genética de la planta y la bacteria así como las condiciones ambientales que les rodea. En el cultivo del aguacate no existen estudios reportados sobre bacterias endófitas, por lo que el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo aislar y caracterizar bacterias endófitas del fruto de aguacate mediante pruebas fenotípicas. Se realizaron colectas en seis huertos de aguacate *hass* pertenecientes a los municipios de Ario de Rosales, Tacámbaro y Santa Clara del Cobre, los cuales, se ubican en la franja aguacatera del estado de Michoacán; de cada huerto se tomaron al azar 20 frutos, 10 con síntomas de abscisión y 10 sin síntomas. De la cubierta seminal de 60 frutos sintomáticos se aislaron 30 cultivos bacterianos, mientras que de los 60 frutos asintomáticos sólo se aislaron seis. De los 36 cultivos bacterianos obtenidos, se caracterizó fenotípicamente 29 cultivos bacterianos. Los géneros resultantes fueron tanto Gram negativos (*Pantoea*, *Erwinia* y *Burkholderia*) como Gram positivos (corineformes). A excepción del género *Erwinia*, los géneros caracterizados en la presente investigación son registros nuevos en su asociación con la patología abscisión del fruto de aguacate.

Palabras claves: cepas, identificación, *Pantoea*, *Erwinia* y *Burkholderia*.

ABSTRACT

Abscission of avocado fruit, commonly known as peduncle banding is a disease that occurs in the crop, in the early stages of fruit development, comes to cause a 45% loss as it induces the drop of up to 200 fruits per tree. This problem is globally reported, however, very few studies documented around it. Researchers agree that there are several associated factors that may cause or inflict abscission of avocado fruit, including bacteria; when there is a decay in the seed coat of the fruit these participation is assumed. Because the entry of bacteria is by wounds or natural openings, one might assume that bacteria are associated endophytic manner; this relationship can be beneficial or pathogenic, however, this will depend on the genetics of the plant and the bacteria and environmental conditions around them. In the crop of avocado there are no reported studies on endophytic bacteria, so this research work objective was to isolate and characterize endophytic bacteria avocado fruit by phenotypic tests. Collections in six *hass* avocado orchards in the municipalities of Ario de Rosales, Tacámbaro and Santa Clara del Cobre, which were conducted are located in the avocado strip of the state of Michoacan; of each orchard were randomly 20 fruits, 10 with symptoms of abscisión and 10 without symptoms. Of the seminal cover of 60 symptomatic fruits 30 bacterial cultures were isolated, while of 60 asymptomatic fruit were isolated only six. Of the 36 obtained bacterial cultures, 29 bacterial cultures were characterized phenotypically. The resulting genera were both, Gram negative (*Pantoea*, *Erwinia* and *Burkholderia*) and Gram positive (coryneform). With the exception of the genus *Erwinia*, the generes characterized in this research are new records in association with pathology abscission avocado fruit.

Key words: strains, identification, *Pantoea*, *Erwinia* and *Burkholderia*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos unicelulares primitivos clasificados como procariontes (Narayanasamy, 2011); su tamaño oscila entre 1-3 micrómetros y presentan diversidad morfológica la cual es determinada por su pared celular, ésta pueden ser esférica u ovoide (coco), cilíndrica (bacilo) o espiralada (espirilo) (Madigan *et al.*, 2004).

La asociación de las bacterias con las plantas existe desde hace mucho tiempo, mediante pasos evolutivos que involucraron la agrupación y adquisición de redes metabólicas a través de eventos de transferencia genética horizontal en respuesta a cambios ambientales (Pal *et al.*, 2005); por lo que podría referirse a ésta como el resultado de una coevolución (Sigeo, 2005). La evolución de la asociación entre planta y bacteria comienza con una bacteria saprófita, la cual desarrolló gradualmente la preferencia de tomar a las plantas como nichos, escapándose de competidores y predadores; así llegan a una relación epífita; lo que le permitió obtener características especializadas para incrementar su eficiencia en ocupar las superficies de la planta sin provocar daño alguno. La asociación constante y a largo plazo de este tipo, dio lugar a la asociación ectosimbionte, caracterizada por ser una relación mutualista en beneficio de ambas partes. Las interacciones a largo plazo entre ésta y su hospedero dan lugar a la asociación endofítica o endosimbiónica; la cual, mediante cambios en el ambiente puede perturbar la existencia de la asociación endosimbiónica y convertirla gradualmente en una asociación patogénica con la planta. En este caso la planta no se beneficia más de la asociación y la bacteria permanece mientras que la asociación patogénica continúe beneficiando la supervivencia y perpetuación del patógeno (Kado, 2010).

Aunque las bacterias endófitas son reconocidas como organismos que residen en los tejidos de las plantas, principalmente en espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Bacon y White, 2000), evolutivamente las bacterias endófitas, aparecen como intermediarios entre bacterias saprófitas y patogénicas de

plantas (Pérez *et al.*, 2009). Pueden encontrarse de manera latente o activa, colonizando los tejidos de la planta localmente o sistemáticamente (Hallmann *et al.*, 1997). Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron desde semillas, de la rizosfera, de la microflora, del filoplano o del material utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011).

En el cultivo del aguacate, no se han encontrado reporte que indiquen la presencia de bacterias endófitas, como tal, en cualquier órgano de la planta. Sin embargo, Cervantes *et al.* (2012) indican, la presencia de tres especies bacterianas *Ralstonia pickettii*, *Enterobacter ludwigii* y *Klebsiella oxytoca*, aisladas de la semilla y la cubierta seminal del fruto del aguacate asociadas a la patología denominada abscisión del fruto (anillamiento del pedúnculo). Coincidentemente, estos géneros bacterianos ya han sido descritos como endófitos en otro cultivos; el género *Enterobacter* fue aislada de maíz, soya y cítricos, mientras que el género *Klebsiella* se encontró en soya, arroz, maíz, caña de azúcar, plátano y zanahoria (Pérez *et al.*, 2009). A la especie *Ralstonia pickettii* se reporta como patógena y causa una mancha foliar en *Strelitzia alba* (Polizzi *et al.*, 2008).

La abscisión del fruto del aguacate, regionalmente conocida como anillamiento del pedúnculo, es una enfermedad que se presenta principalmente en los primeros estados de desarrollo del fruto (Coit, 1928) y afecta directamente el rendimiento, ocasionando pérdidas de hasta un 45 % de la producción (Cosio-Vargas *et al.*, 2008). El síntoma característico es la formación de un anillo café rojizo alrededor del pedúnculo y cerca del lugar de la unión con el fruto, con una zona seca y descortezada (en ocasiones); algunas veces el anillo es superficial y el fruto se retiene hasta la madurez (Fucikovsky, 1970; Campos, 1984).

Algunos investigadores concuerdan que son varios los factores involucrados que pueden provocar la abscisión del fruto, ya sea por competencia o deficiencia nutricional (Toerien, 1979; Ochoa, 2000; Salazar-García *et al.*, 2006), estrés por deficiencia de riego (Cosio-Vargas *et al.* 2007; Valencia y Téliz, 2007; Wolstenholme, 2007) un descontrol hormonal en el árbol (Salazar-García *et al.*,

2006), el uso de cloro en las labores de campo (Haas, 1936), así como la presencia de organismos causales en su mayoría hongos (Salgado y Saavedra, 1994) y bacterias (Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005). Diversos autores han identificado mediante técnicas morfológicas y bioquímicas a bacterias de los géneros *Xanthomonas* (Martínez y Domínguez, 1974; Ochoa *et al.*, 2001), *Pseudomonas* (Gudiño, 1998; Ochoa, 2000; Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005), *Corynebacterium* y *Erwinia* (Gudiño, 1998) determinando su participación en esta patología cuando existe una pudrición en la cubierta seminal (Ochoa *et al.*, 2001).

Sin embargo, las bacterias son un grupo de organismos con un mayor grado de dificultad para su identificación y caracterización, ya que no basta con los caracteres anatómicos-morfológicos para su identificación a nivel de género, menos de especie; es por ello que se toman en cuenta además aspectos fisiológicos y patogénicos en su identificación (Da Silva, 1982), estas técnicas solo permiten darnos una idea del agente etiológico (Bou *et al.*, 2011). La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. Schaad *et al.* (2001) señalan como pruebas primarias para la identificación a nivel de género: la tinción de Gram y la reacción de Ryu, el crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, la presencia de colonias amarillas sobre YDC, la presencia de fluorescencia sobre KB, ureasa, oxidasa, el crecimiento a 40 ° C y la producción de esporas. Un factor importante en la identificación son las pruebas de patogenicidad; estas nos permiten determinar la habilidad de las bacterias para reproducir la sintomatología del hospedero de donde se aisló. La penetración de las bacterias a sus hospedantes, generalmente es pasiva, ya que la forma de entrada es por heridas o aberturas naturales, característica importante al momento de hacer la inoculación, la cual debe ser la más adecuada, sencilla y eficaz (Jaimes, 1994; Rodríguez, 2010), éstas se pueden hacer de dos maneras, lenta (*in situ*) y rápida (*in vitro*) (Rodríguez, 2010). Las pruebas de patogenicidad *in vitro* son consideradas más rápidas, ya que los síntomas se presentan en poco tiempo, además son menos variables, por el mayor control que se tiene en la manipulación. Las principales son: reacción de hipersensibilidad de tabaco, pudrición del tubérculo de papa y la pudrición de zanahoria (Rodríguez,

2010).

Debido a la poca información que hay sobre las bacterias endófitas presentes en el cultivo del aguacate, en el presente trabajo se planteó como objetivo: aislar y caracterizar mediante pruebas fenotípicas, bacterias endófitas del fruto de aguacate presentes en frutos asintomáticos y sintomáticos de la patología denominada abscisión del fruto del aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y colecta. Se hicieron colectas de frutos de aguacate en seis huertos pertenecientes a los municipios de Salvador Escalante, Ario de Rosales y Tacámbaro, los cuales se ubican en la zona central de la franja aguacatera del estado de Michoacán (Cuadro 1). La selección de los huertos fue con base en la altitud sobre el nivel del mar y condición de humedad. Identificadas como zona alta (2000-2100 msnm) con clima (A)C(w₁)(w) (semicálido subhúmedo con lluvias en verano, lluvia invernal menor a 5 %, humedad intermedia) y (A)C(w₂)(w) (semicálido subhúmedo con lluvias en verano, lluvia invernal menor al 5 %, el más húmedo); zona media (1800-1900 msnm), clima (A)C(w₂)(w) y (A)C(m)(w) (semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano, lluvia invernal mayor del 5 %); y zona baja (1400-1550 msnm), con clima (A)C(m)(w) (Guillén-Andrade *et al.*, 2007); dos huertos por zona (dos condiciones de humedad), uno con riego y otro de temporal.

Cuadro 1. Colectas de frutos con y sin síntomas de abscisión del pedúnculo en *Persea americana* Mill var. *hass* en huertos de la franja aguacatera de Michoacán.

Número de colecta	Nombre del huerto	Fecha de colecta	Municipio	Coordenadas	Clima	Altitud	Condición del huerto
1	María Emilia	21/Junio/2014	Ario de Rosales	N 19° 28.900´ W 102° 00.323	(A)C(m)(w)	1458	Riego
2	Dr. Miguel Silva	21/Junio/2014	Ario de Rosales	N 19° 09.645´ W 101° 44.230´	(A)C(m)(w)	1527	Temporal
3	La longaniza	25/Junio/2014	Ario de rosales	N 19° 12.589´ W 101° 40.226´	(A)C(w ₁)(w)	2058	Temporal
4	María Luisa	26/Junio/2014	Tacámbaro	N 19° 12.591´ W 101° 40.213	(A)C(w ₂)(w)	1835	Riego
5	San Bernardo	2/Julio/2014	Tacámbaro	N 19° 16.551´ W 101° 26.749	(A)C(w ₂)(w)	2090	Riego
6	Tarascón	8/Julio/2014	Santa Clara del Cobre	N 19° 26.037´ W 101° 49.496	(A)C(m)(w)	1870	Temporal

Se seleccionaron 20 frutos de aguacate al azar de cada uno de los huertos, de los cuales, 10 presentaban el síntoma típico de abscisión y 10 estaban aparentemente sanos. Al hacer la colecta, los frutos se desinfectaron *in situ* con NaClO al 2 % seguido de un enjuague con agua destilada estéril y secado con papel estéril, esto con el fin de eliminar cualquier contaminante superficial del fruto. Tras realizar la desinfección, los frutos se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético (ziploc) para evitar la deshidratación y se etiquetaron de manera separada (frutos con síntoma y frutos sanos), con los datos de procedencia. Las colectas se llevaron al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo ubicada en Uruapan, Michoacán, donde se hizo un registro fotográfico de cada fruto. Posteriormente, los frutos se almacenaron durante 12 a 24 horas a 4 °C para su procesamiento mediante las técnicas descritas por Agrios (2005) y Rodríguez (2010).

Aislamiento. De los 120 frutos colectados, se realizó el aislamiento de los cultivos bacterianos con base en la técnica de Agrios (2005) y Schaad *et al.* (2001), como se describe a continuación: bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar, los frutos se desinfectaron con una solución de NaClO al 2 %, seguido de un lavado con agua destilada y un secado con papel absorbente. Posteriormente, se partió

cada fruto longitudinalmente y se hicieron cortes de aproximadamente 2 mm de la cubierta seminal y del tejido adyacente a ésta y se colocaron de manera equidistante, en dos cajas Petri con medio nutritivo PDA (Bioxon®) con 20 mL.

Las cajas se incubaron a una temperatura de 24 °C durante 48 h o cuando se observó desarrollo bacteriano. Para la purificación de los cultivos bacterianos, se tomó con un asa bacteriológica una pequeña cantidad de la colonia bacteriana y se realizó un rallado en una nueva caja con el medio nutritivo señalado. Después de la purificación, los cultivos bacterianos se almacenaron de dos maneras: a) a 5 °C en agua destilada y b) a – 70 °C en una solución compuesta de medio líquido papa-agar y glicerina al 25 % en proporción 2:1 en un ultracongelador TSU Thermo Scientific (Cordero y Maldonado, 2009). En ambos casos se realizaron dos repeticiones por cultivo bacteriano para garantizar la viabilidad del almacenamiento.

Caracterización fenotípica de los cultivos bacterianos. Los cultivos bacterianos obtenidos se evaluaron mediante pruebas fenotípicas comunes como son: características morfológicas de la colonia bacteriana, pruebas bioquímicas y pruebas de patogenicidad.

Como prueba primaria se realizó la tinción de Gram de acuerdo a la metodología descrita por Schaad *et al.* (2001), para corroborar los resultados se realizó la reacción de Ryu (Suslow *et al.*, 1981) con crecimientos bacterianos de 24 h. Para la caracterización morfológica de las colonias, se utilizaron cultivos bacterianos de 36 h de edad. El color, forma, borde, luz transmitida, luz reflejada, elevación y consistencia fueron las características evaluadas, éstas se observaron y compararon con las descritas por Da Silva (1982) y Rodríguez (2010). Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: anaerobiosis, crecimiento sobre YDC, fluorescencia sobre B de King, ureasa, oxidasa, crecimiento a 40 °C, determinación de esporas y prueba de leche litmus (Figura 1), bajo la metodología descrita por Schaad *et al.* (2001), además de la prueba de producción de indol (Jaimes, 1994). Estas pruebas se hicieron con cultivos bacterianos de 36 h de edad.

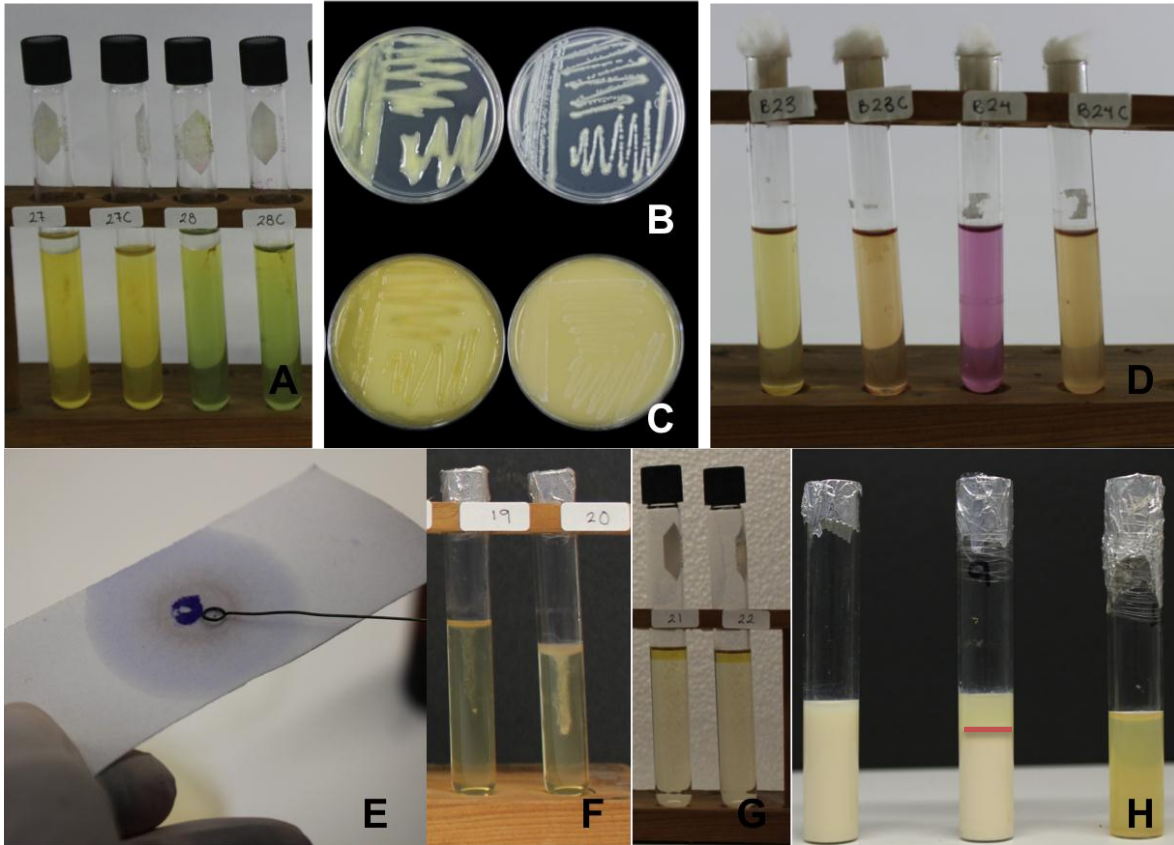


Figura 1. Pruebas bioquímicas empleadas en la identificación de las cepas bacterianas. A) anaerobiosis, B) fluorescencia, C) colonias amarillas sobre YDC, D) ureasa, E) oxidasa, F) crecimiento a 40°C, G) producción de indol, H) leche Litmus.

Las pruebas de patogenicidad realizadas *in vitro* fueron: pudrición de papa y zanahoria bajo la metodología de Rodríguez (2010) e hipersensibilidad en tabaco con base en Sigee (2005).

Análisis de resultados. Los resultados de las pruebas fenotípicas de los cultivos bacterianos aislados para su identificación a nivel de género fueron comparadas con las características determinadas por Da Silva (1982), Schaad *et al.* (2001) y Rodríguez (2010). De estas variables cualitativas, se realizó un análisis de comparación simple con las claves anteriormente señaladas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta. Las diferencias físicas entre los frutos asintomáticos y sintomáticos de las seis colectas realizadas se muestran en la Figura 2, en esta se puede observar los síntomas típicos de la abscisión del fruto; los cuales son, una coloración roja violácea en el pericarpio del fruto así como la presencia de un anillo a 1 cm de altura de la base del pedúnculo Fucikovsky (1970) y Campos (1984).

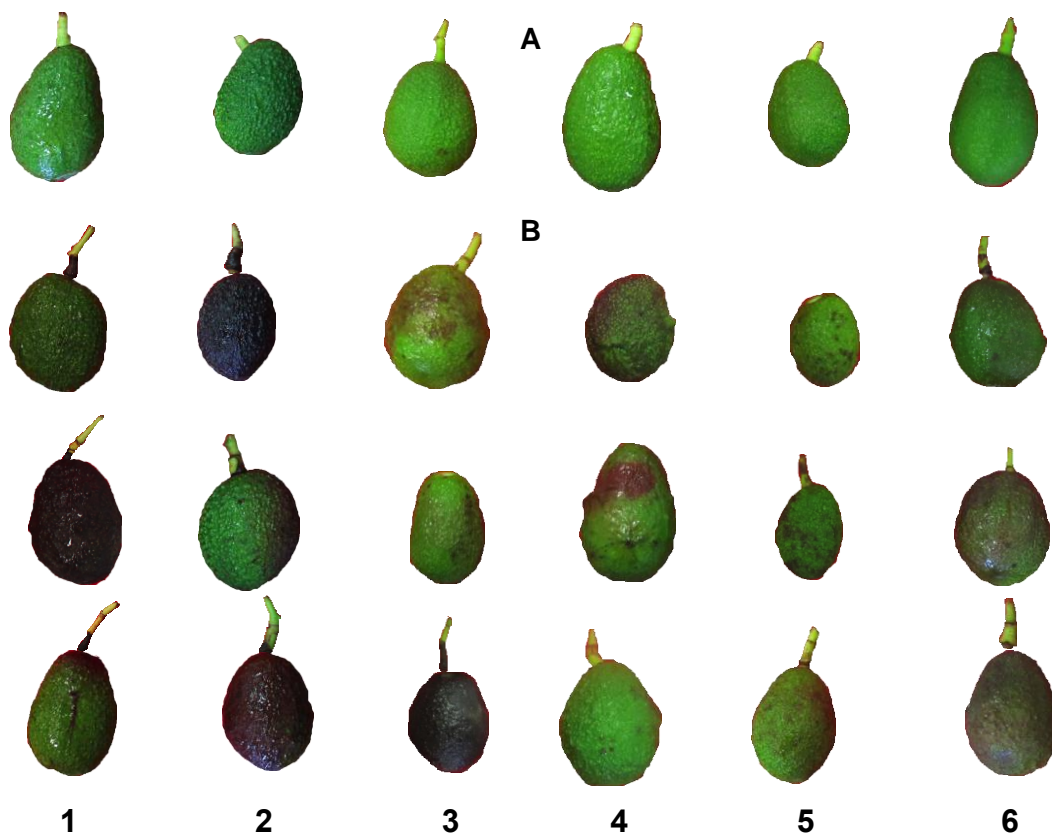


Figura 2. Frutos de *Persea americana* Mill var. *hass* provenientes de seis huertos del estado de Michoacán. A) fruto asintomático de la abscisión del fruto y B) fruto sintomático.

Aislamiento. De las seis colectas realizadas, se obtuvieron, un total de 38 cultivos bacterianos identificados con la letra B correspondiente a bacteria y un número consecutivo referido al número de aislamiento, cabe señalar, que durante el manejo de las cepas bacterianas dos de ellas (B11 y B14) se perdieron por contaminación. La diferencia en la frecuencia de aislados provenientes de frutos asintomáticos y sintomáticos es muy notoria. El 84 % de los cultivos bacterianos se aislaron de frutos sintomáticos y el resto (16 %) de los asintomáticos. En el Cuadro 2 se observar que el mayor número de cultivos bacterianos (17) se obtuvieron de la altitud baja (1400-1550 msnm); seguido en número de aislados (14) la altitud media (1800-1900 msnm); mientras que en la altitud alta (2000-2100 msnm) se obtuvo el menor número (5).

Lo anterior exhibe variabilidad de frecuencia, donde a menor altitud mayor cantidad de aislamientos bacterianos, esto puede deberse a que en estas condiciones (baja y media) el clima predominante es el semicálido húmedo, con temperaturas promedio entre los 20 y 22 °C (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010), lo cual favorece la presencia de microorganismos, las bacterias en general se desarrollan mejor en temperaturas templadas a altas, idelamente de los 20 hasta 37 °C; temperaturas por debajo de los 15 °C disminuye en un gran porcentaje el tiempo de crecimiento y la reproducción (Vidaver y Lambrecht, 2004).

Cuadro 2. Cultivos bacterianos obtenidos de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*) con síntomas y sin síntomas de abscisión en los huertos seleccionados en Michoacán.

Clave de cepa bacteriana	Zona altitudinal (msnm)	Condición del huerto	Condición patológica	Clave de cepa bacteriana	Zona altitudinal (msnm)	Condición del huerto	Sintomatología
B1	1458	Riego	Sintomático	B21	2058	Temporal	Asintomático
B2	1458	Riego	Sintomático	B22	1835	Riego	Asintomático
B3	1458	Riego	Asintomático	B23	1835	Riego	Sintomático
B4	1458	Riego	Sintomático	B24	1835	Riego	Sintomático
B5	1458	Riego	Sintomático	B25	1835	Riego	Sintomático
B6	1458	Riego	Sintomático	B26	1835	Riego	Sintomático
B7	1458	Riego	Sintomático	B27	1835	Riego	Sintomático

B8	1458	Riego	Sintomático	B28	1835	Riego	Sintomático
B9	1458	Riego	Sintomático	B29	1835	Riego	Sintomático
B10	1527	Temporal	Asintomático	B30	1835	Riego	Sintomático
B12	1527	Temporal	Sintomático	B31	2090	Riego	Asintomático
B13	1527	Temporal	Sintomático	B32	2090	Riego	Asintomático
B15	1527	Temporal	Sintomático	B33	2090	Riego	Sintomático
B16	1527	Temporal	Sintomático	B34	1870	Temporal	Sintomático
B17	1527	Temporal	Sintomático	B35	1870	Temporal	Sintomático
B18	1527	Temporal	Sintomático	B36	1870	Temporal	Sintomático
B19	1527	Temporal	Sintomático	B37	1870	Temporal	Sintomático
B20	2058	Temporal	Sintomático	B38	1870	Temporal	Sintomático

El mayor número de aislados se obtuvo de frutos de huertos en la condición de riego (Figura 3), en las tres altitudes de colecta lo cual difiere de lo reportado por Cossio-Vargas *et al.* (2007), Valencia y Téliz (2007), Wolstenholme (2007) y Vidales (2009) que indican que la mayor incidencia (45 %) de la patología estudiada se presenta en huertos bajo condiciones de estrés hídrico (temporal).

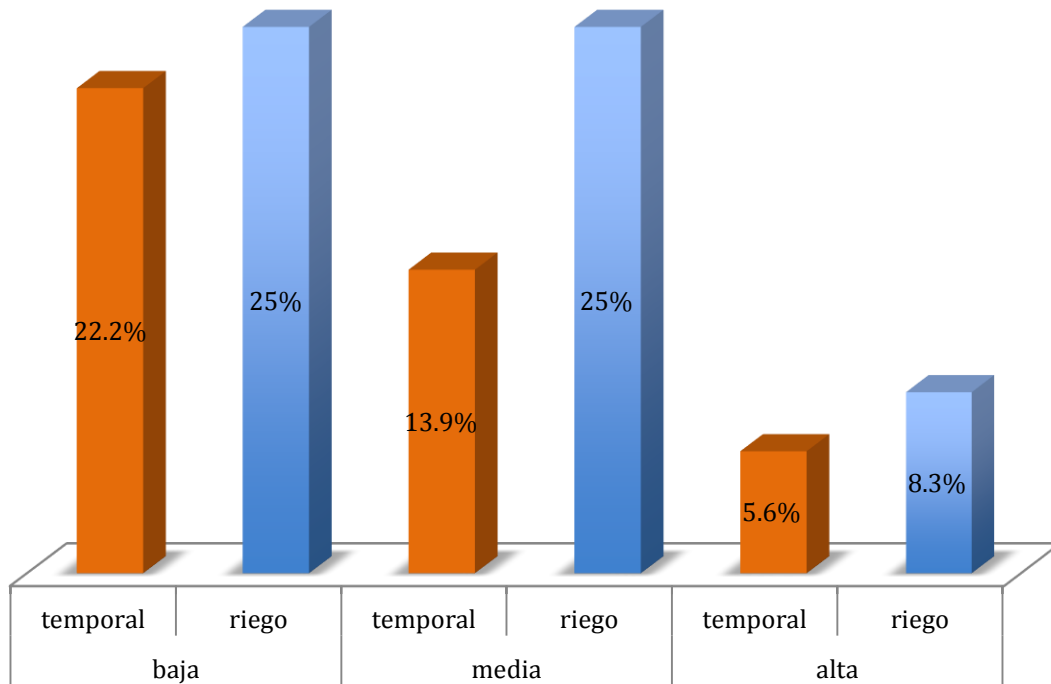


Figura 3. Frecuencia de cultivos bacterianos aislados de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*) con y sin síntomas de abscisión, cultivados en huertos bajo condición de temporal y riego a tres niveles de altitud (baja, media y alta).

Caracterización fenotípica. En lo que respecta a morfología, se puede notar diferencias de desarrollo entre los cultivos bacterianos aislados, a las 24 h de crecimiento (Figura 4). La mayor diversidad en las características morfológicas de las colonias bacterianas evaluadas se obtuvo en la coloración (blanco, blanco amarillento, amarillo pálido y amarillo pastel) con base en las claves de color de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978); seguido por la forma de la colonia bacteriana (circular, irregular y circular a huso), elevación (elevada, convexa y elevada a convexa) y consistencia (seca, húmeda y mucoide); y con solo dos variaciones, el borde (entero e irregular), la luz transmitida (translúcida y opaca) y luz reflejada (opaca y brillante) (Da Silva, 1982 y Rodríguez, 2010), las cuales se especifican en el Cuadro 3.

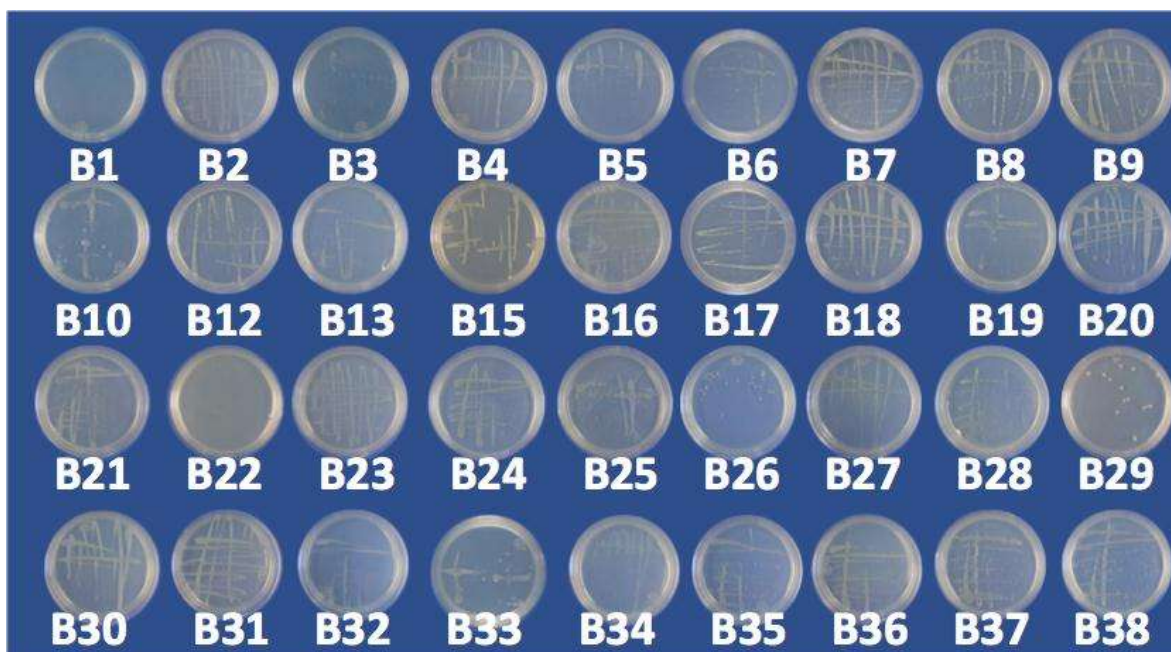


Figura 4. Crecimientos bacterianos de 24 h de edad aislados de la cubierta seminal de *Persea americana* Mill var. *hass*, en medio de cultivo PDA.

En lo que respecta a la característica color, el 42 % de las cepas bacterianas presentaron color blanco amarillento, seguidos en proporción los colores amarillo pálido (30 %), blanco (22 %) y amarillo pastel (6 %). El 78 % manifestaron translucidez ante la luz transmitida y en su mayoría (80 %) fueron brillantes; en lo que respecta a

la forma de la colonia 73 % fueron circular y el resto circular a uso (16 %) e irregular (11 %). El borde predominante fue el entero (89 %), así mismo, 53 % presentaron elevación en su crecimiento. En cuanto a consistencia, las colonias desarrolladas fueron húmedas (61 %), mucoides (28 %) y secas (11 %). Es importante resaltar, que las características morfológicas de las colonias no bastan para realizar una caracterización a nivel de género, mucho menos a nivel de especie, ya que son muy superficiales y existen errores de “ojo” o simplemente debido a la variabilidad del microorganismo, como lo señalan Bou *et al.* (2011).

Cuadro 3. Características morfológicas coloniales de los cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de *Persea americana* Mill var. *hass* con y sin síntomas de abscisión.

Cepa	Color	Luz transmitida	Luz reflejad	Forma	Borde	Elevación	Consistencia
B1	blanco	opaca	opaca	circular	entero	elevada	seca
B2	blanco amarillento	traslúcida	opaca	circular	entero	convexa	húmeda
B3	blanco	traslúcida	opaca	irregular	ondulado	elevada	húmeda
B4	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	húmeda
B5	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	mucoide
B6	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	elevada	mucoide
B7	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	elevada	húmeda
B8	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	húmeda
B9	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	convexa	húmeda
B10	blanco amarillento	opaca	brillante	circular	entero	elevada	húmeda
B12	blanco amarillento	opaca	brillante	circular pequeña	entero	elevada	húmeda
B13	blanco	traslúcida	opaca	circular	entero	elevada	humeda
B15	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	elevada	mucoide
B16	amarillo pastel	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	elevada	húmeda
B17	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular pequeña	entero	convexa	húmeda
B18	amarillo pastel	traslúcida	brillante	circular	entero	elevada	húmeda
B19	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa alta	húmeda
B20	blanco	opaca	brillante	circular	entero	convexa	húmeda
B21	blanco	opaca	opaca	irregular	ondulado	elevada	seca
B22	blanco	opaca	opaca	irregular	ondulado	elevada	seca
B23	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	elevada	mucoide
B24	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	elevada	húmeda

B25	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	elevada	húmeda
B26	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	elevada	mucoide
B27	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular a huso	entero	elevada	mucoide
B28	blanco amarillento	opaca	brillante	circular	entero	elevada	húmeda
B29	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular pequeña	entero	elevada a convexa	húmeda
B30	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular pequeña	entero	elevada a convexa	húmeda
B31	blanco	opaca	brillante	circular	entero	convexa	húmeda
B32	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular pequeña	entero	convexa	húmeda
B33	blanco	opaca	opaca	irregular	ondulado	elevada	seca
B34	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular pequeña	entero	elevada a convexa	húmeda
B35	blanco amarillento	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	mucoide
B36	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	mucoide
B37	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	mucoide
B38	amarillo palido	traslúcida	brillante	circular	entero	convexa	mucoide

Tal como lo describe Schaad *et al.* (2001), las pruebas bioquímicas que permitieron una mayor diferenciación a nivel de género para las bacterias fitopatógeas fueron: tinción de Gram, anaerobiosis, colonias amarillas sobre YDC, fluorescencia sobre B de King, ureasa, oxidasa, crecimiento a 40 °C y presencia de esporas. Se lograron identificar a nivel de género un total de 29 cultivos bacterianos, los restantes (7) no lograron identificarse mediante estas pruebas, lo cual sugiere que no son bacterias caracterizadas como fitopatógenas con base en la clasificación por Schaad *et al.* (2001). Mediante estas pruebas se identificaron dentro del grupo de las Gram negativas a los géneros *Pantoea* (50 %), *Erwinia* (3 %) y *Burkholderia* (3 %); para el caso de las Gram positivas (B1, B3, B10, B20, B21, B30, B31, B33) estas pruebas determinan que se relacionan con corineformes, en el Cuadro 4 se muestran los cultivos bacterianos y su identificación por coincidencia con las pruebas bioquímicas descritas. Se identificaron una mayor cantidad de bacterias Gram negativas; resultado que coincide con lo señalado por Hallman *et al.* (1997), cuando indican que las bacterias endófitas de los cultivos en mayor proporción pertenecen al grupo de las Gram negativas (78 %). De la misma manera, se concuerda con estos autores, cuando señalan que los taxos más comunes de bacterias endófitas son el grupo de las *Pseudomonas* (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) y

Enterobacteraceas (Enterobacter, Erwinia, Klebsiella).

Para el caso de bacterias asociadas a la abscisión temprana del fruto de aguacate, sólo se reportan a *Erwinia*, *Corynebacterium* (Gudiño, 1998) y *Pseudomonas* (Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005). Tanto el género *Pantoea* como *Burkholderia* son nuevos registros para esta enfermedad en aguacate, sin embargo, estos géneros son resultado de una nueva clasificación, ya que anteriormente *Pantoea* pertenecía al género *Erwinia* y *Burkholderia* al género *Pseudomonas*, lo cual puede asumirse que son los que reportaron Gudiño (1988), Ochoa *et al.* (2001), Cruz *et al.* (2005) y Tovar *et al.* (2005), asociados a esta patología.

Cuadro 4. Identificación de las cepas bacterianas obtenidas de la cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos de la patología abscisión del fruto de aguacate, mediante pruebas bioquímicas establecidas para bacterias fitopatógenas.

Cepas caracterizadas	Géneros resultantes
B5, B6, B8, B9, B12, B13, B15, B18, B19, B23, B25, , B29, B34, B35, B36, B37, B38	<i>Pantoea</i>
B17	<i>Erwinia</i>
B26, B27	<i>Pantoea o Erwinia</i>
B32	<i>Burkholderia</i>
B1, B3, B10, B20, B21, B30, B31, B33	<i>Corineformes</i>
B2, B4, B7, B16, B22, B24, B28	No identificado

Es importante mencionar, que cuatro de los cultivos bacterianos (B3, B10, B21, B31) caracterizados como corineformes, uno como *Burkholderia* (B32) y otro (B22) que no se identificó mediante estas pruebas, se obtuvieron de frutos asintomáticos, lo que coincide con Bacon y White (2000) al señalar que las bacterias endófitas pueden estar en tejidos de las plantas sin causar síntomas de enfermedad, ya que según

Pérez *et al.* (2009) evolutivamente son intermediarios entre bacterias saprófitas y patogénicas y pueden estar solo de manera latente en los tejidos de la planta local o sistemáticamente (Hallmann *et al.*, 1997).

En lo que respecta específicamente a la asociación endofítica de bacterias, los géneros identificados en el presente trabajo ya han sido reportados como endófitos, como es el caso de *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, reconocidos como principales bacterias endófitas de semillas (Mundt y Hinkle, 1976) y a los géneros *Erwinia*, *Bacillus*, *Clavibacter* y *Xanthomonas* encontrados en flores de algodón (Misaghi y Donndelinger, 1990).

Las pruebas adicionales de leche litmus y de patogenicidad en papa, zanahoria e hipersensibilidad en tabaco (Figura 5) mostraron diferencias en la capacidad patogénica de las cepas bacterianas; a diferencia de la producción de indol en la cual ninguno de los cultivos resultó positivo, por lo que podemos afirmar que no tienen la capacidad de sintetizar ácido indol acético (AIA). En la prueba de leche litmus, se observaron dos reacciones, una peptonización y una coagulación. La coagulación la produjeron un total de 22 cepas bacterianas (61 %), mientras que la peptonización sólo 8 (22 %) y los restantes no provocaron reacción alguna; los cultivos bacterianos que lograron una peptonización y coagulación (positivos) sintetizan enzimas proteolíticas (MacFaddin, 2000), lo que provee un antecedente de su capacidad patogénica ya que estas enzimas son capaces de lisar las proteínas. En lo que respecta a las pruebas de patogenicidad, un 25 % resultaron positivas para la pudrición de papa, 14 % para zanahoria, mientras que los cultivos B8 y B22 en ambas pruebas. Para la hipersensibilidad en tabaco dieron positivo sólo el 14 %; nuevamente el cultivo B22 fue positivo en esta prueba lo que ratifica su capacidad patogénica; sin embargo, en la clasificación actual de Schaad *et al.* (2001) este cultivo no corresponde a ninguno de los géneros establecidos en la suma de las pruebas bioquímicas efectuadas. Con los resultados obtenidos se afirma que existen bacterias en la cubierta seminal de la semilla del aguacate con antecedentes patogénicos (*Pantoea*, *Erwinia* y *Burkholderia*), los cuales se comprueban mediante la aplicación de todas estas pruebas específicas para bacterias fitopatógenas; sin

embargo, aún no se puede aseverar que estas sean las causantes de la patología estudiada, ya que es necesario realizar pruebas de patogenicidad sobre el hospedero de donde se aisló, establecido en los Postulados de Koch (Sigeo, 2005). Aunque cabe señalar que bacterias identificadas como corineformes (B3, B30 y B31) y una que no pudo identificarse (B22), también mostraron características de reacciones con capacidad patogénica mediante estas pruebas. En el Cuadro 1A se presentan los resultados obtenidos de las pruebas realizadas para cada uno de los cultivos bacterianos aislados.

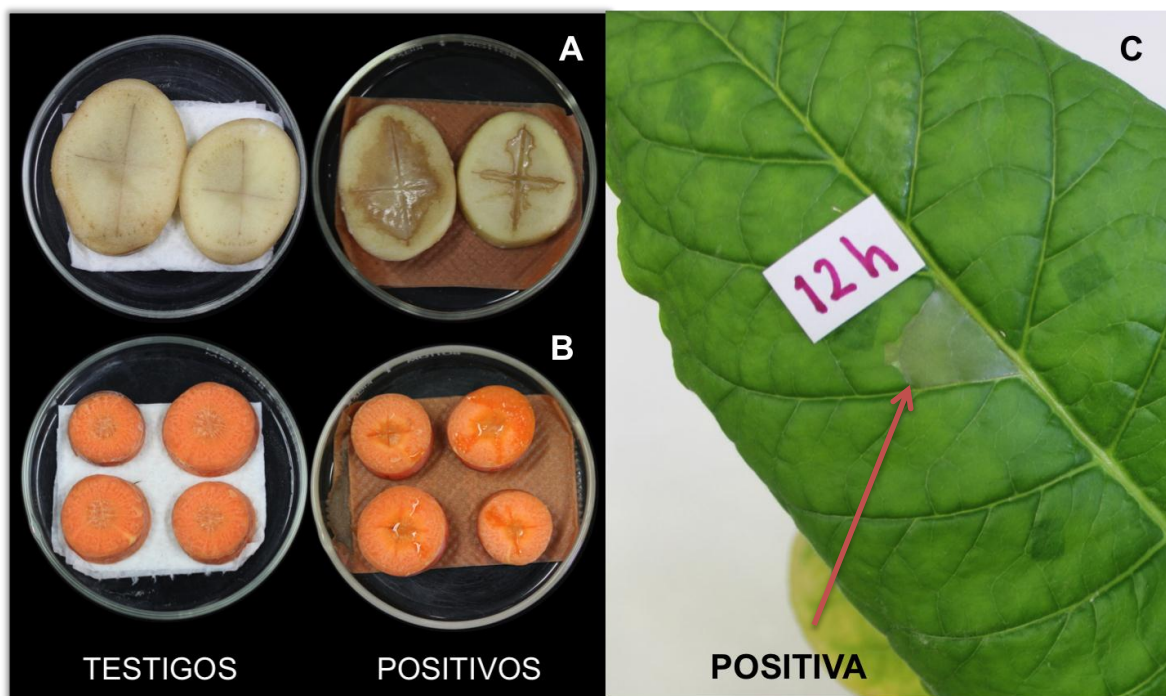


Figura 5. Pruebas de patogenicidad de bacterias aisladas de frutos de *Persea americana* var *hass* asintomáticos y sintomáticos de abscisión. A) pudrición en papa, izquierda testigo reacción negativa, derecha reacción positiva; B) pudrición en zanahoria, izquierda testigo reacción negativa, derecha reacción positiva; C) hipersensibilidad en tabaco, reacción positiva (↑).

Los géneros *Pantoea* y *Erwinia* pertenecen a la familia de las *Enterobacteraceas*, las cuales se caracterizan por ser bacilos no esporuladores, Gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, con requerimientos nutricionales relativamente simples y fermentan azúcares con diversos productos finales (Madigan *et al.*, 2004),

características coincidentes con las obtenidas en este estudio. El género *Pantoea* ha sido reportado como endófito en plantas de arroz (Verma *et al.*, 2004) y caña de azúcar (Loiret *et al.*, 2009), pero actualmente no se tienen reportes en fruto de aguacate.

Otro género identificado en este trabajo fue *Burkholderia*, perteneciente al grupo de las Pseudomonas, caracterizadas por ser un grupo de bacilos rectos o ligeramente incurvados, Gram negativos, aerobios y quimioorganotrofos (Madigan *et al.*, 2004), frecuentemente oxidativos aunque a veces fermentativos (Garassini, 1967), totalmente similares con los resultados de las pruebas realizadas en este trabajo. Ecológicamente el grupo de las Pseudomonas son importantes en suelo y agua, al ser responsables de la degradación de muchos compuestos solubles (Madigan *et al.*, 2004). De la misma manera, el género *Burkholderia* se ha manifestado como endófito al crear una simbiosis benéfica con líquenes tal como lo describe Grube *et al.* (2009); sin embargo, no se tienen reportes en cultivos de importancia agrícola, incluido aguacate.

En lo que respecta a las corineformes, estas bacterias se caracterizan por ser fundamentalmente Gram positivas, aerobias, inmóviles, bacilares con tendencia a la irregularidad. Se encuentran típicamente habitando el suelo y el material vegetal, la mayoría son saprofitos. Los géneros más importantes *Corynebacterium* y *Arthrobacter*. Son primordiales en la producción de antibióticos, aminoácidos, vitaminas, saborizantes y derivados lácteos (Madigan *et al.*, 2004).

De todas las pruebas fenotípicas realizadas a las cepas bacterianas, las de reacción de patogenicidad (pudrición en papa, pudrición de zanahoria, hipersensibilidad en tabaco, coagulación de leche litmus y peptonización) son para este trabajo muy relevantes, no sólo para su identificación, sino debido a que demuestran la capacidad de estas cepas (92 %) para provocar una patología en su hospedero, como es el caso de la absición del fruto de aguacate (Shaad *et al.*, 2001; Sigee, 2005; Rodríguez, 2010).

CONCLUSIONES

De frutos de aguacate con y sin síntoma de abscisión se obtuvieron 36 cultivos bacterianos de la cubierta seminal.

Se identificaron mediante pruebas fenotípicas para bacterias fitopatógenas, a los géneros *Pantoea*, *Erwinia*, *Burkholderia* y corineformes.

Siete cepas bacterianas no pudieron caracterizarse mediante las pruebas efectuadas, por lo que se infiere que no son bacterias con reportes fitopatógenos.

Las cepas bacterianas obtenidas de frutos asintomáticos en su mayoría (cuatro) se agruparon en las corineformes por ser Gram positivas, una como *Burkholderia* y una sin identificar.

Los géneros *Pantoea* y *Burkholderia* son nuevos registros de su asociación con la patología abscisión del fruto de aguacate.

LITERATURA CITADA

Agrios G., N. (2005) Plant Pathology. 5a. ed. Academic Press. New York, U.S.A. 922 p.

Bacon C. W. and J. F. White (2000) Microbial Endhopytes. Marcel Dekker Inc. New York. 492 p.

Bou G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáenz-Nieto y S. Veldezate (2011) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29:601–608.

Campos A. J. (1984) Principales enfermedades del aguacatero. *In: IV Congreso Nacional. Asociación de Egresados de la Facultad de Agrobiología (ANEFA). Memoria Simposium sobre cultivo, producción y comercialización del aguacate. Uruapan, Michoacán, México. pp: 69-93.*

- Cervantes, C. E. A., A. H. Guillén, S. M. E. Pedraza y C. M. Gutiérrez (2012)** Sensibilidad a antibióticos *in vitro* de bacterias asociadas al anillamiento del pedúnculo del aguacate. *In: XIV Congreso Internacional y XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Nayarit, México. pp:91-92.
- Coit J. E. (1928)** Pests and diseases of the avocado. California Avocado Growers Association Yearbook. 18-21
- Cordero R. J. D. y M. I. E. Maldonado (2009)** Estrategias de control biológico de *Fusarium* en maíz. *AgroSíntesis*. <http://www.agrosintesis.com/component/content/article/49-front-page/317-estrategia-de-control-biologico-de-fusarium-en-maiz> (Accesada en Julio del 2014).
- Cossio-Vargas L. E., S. Salazar-García, I. J. González-Durán y R. Medina-Torres (2007)** Algunos aspectos reproductivos del aguacate 'Hass' en clima semicálido. *In: Actas del VI Congreso Mundial del Aguacate*. Villa del Mar, Chile. <http://www.avocadosource.com/WAC6/es/Extenso/3d-151.pdf>
- Cossio-Vargas L. E., S. Salazar-García, I. J. González-Durán y R. Medina-Torres (2008)** Fenología del aguacate 'Hass' en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 319-324.
- Cruz M. J., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, C. M. Gutiérrez, P. S. Aguirre, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005)** Control del anillamiento del aguacate con productos biodegradables. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate*. Notas Científicas. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán, México. pp: 77-84.
- Da Silva R. R. (1982)** Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Estado de México, México. 109 p.
- Fucikovsky L. (1970)** Enfermedades del aguacate en el Estado de México. S.A.G. Dirección General de Agricultura.
- Garassini L. A. (1967)** Microbiología Agraria. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía de Maracay. 216 p.
- Grube M., M. Cardinale, J. Vieira de Castro, H. Müller and G. Berg (2009)** Species specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*. 3:1105-1115.

- Gudiño J. J. L. (1998)** Efecto de 8 niveles de fertilización para reducir el anillamiento del pedúnculo del fruto; aislamiento de fitopatógenos y patogenicidad, para aguacate Persea americana Mill CV 'Hass' en Tingambato, Mich. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" U.M.S.N.H. Uruapan, Michoacán, México. 98 p.
- Guillen-Andrade H., B. N. Lara-Chávez, M. Gutiérrez-Contreras, C. M. Ortiz y P. E. Angel (2007).** Cartografía Agroecológica del Cultivo del Aguacate en Michoacán. Morevallado Editores de Morelia, Michoacán, México. 141 p.
- Gutiérrez-Contreras M., M. B. N. Lara-Chávez, H. Guillén-Andrade y A. T. Chávez-Bárcenas (2010)** Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia* 35:647-653.
- Haas A. R. C. (1936)** Chlorine in relation to ring-neck in avocado fruits. *California Avocado Association Yearbook* 21:60-62.
- Hallmann J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee and J. W. Kloepper (1997)** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:895-914.
- Jaimes S. F. (1994)** Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas. Escuela Nacional de Agricultura. Departamento de Parasitología Agrícola. México. 119 p.
- Kado C. I. (2010)** Plant Bacteriology. APS Press. E.U.A. 336 p.
- Kornerup, A. and J. H. Wanscher (1978)** Methuen Handbook of Colour. 3ª edición. Eyre Methuen. London. 252 p.
- Loiret F. G., B. Grimm, M. R. Hajirezaei, D. Kleiner and E. Ortega (2009)** Inoculation of sugarcane with *Pantoea* sp. Increases aminoacid contents un shoot tissues; serina, alanine, glutamine and asparagine permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of bacterium. *Journal of Plant Physiology*. 166:1152-1161.
- MacFaddin J. F. (2003)** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. 850 p.
- Madigan M. T., J. M. Martinko, y J. Parker (2004)** La diversidad procariótica: Bacteria. *In: Biología de los Microorganismos*. Madigan M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 10a ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. pp: 351-439.

- Martínez B. R. y C. J. M. Domínguez (1974)** Identificación del agente causal del anillamiento del pedúnculo del aguacate en la región de Uruapan, Mich. *In: Simposio Nacional de Fitopatología Agrícola*. Mazatlán, Sinaloa. Noviembre de 1974.pp:72.
- Misaghi I. J. and C. R. Donndelinger (1990)** Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80:808-811.
- Mundt J. O. and N. F. Hinkle (1976)** Bacteria within ovules and sedes. *Applied and Environmental Microbiology* 32:694-698.
- Narayanasamy P. (2011)** Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens Vol.2. Springer Science Business Media B. V. New York. 256 p.
- Ochoa A. S. (2000)** Anillamiento del pedúnculo, patógenos varios. *In: Enfermedades del aguacatero en el estado de Michoacán, México*. Memorias del III Seminario Taller sobre aguacate, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Uruapan Michoacán, México. pp: 26-35.
- Ochoa A. S., M. J. Campos y G. R. Mendoza (2001)** Identificación de bacterias asociadas en el anillamiento del Pedúnculo del Aguacatero. *In: Memorias del Primer Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate*. Uruapan, Michoacán, México. pp: 198-199.
- Pal C., B. Papp and M. J. Lercher (2005)** Adaptative evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature Genetics* 37:1372-1375
- Pérez C. A., S. J. Rojas y M. H. Vale (2009)** Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 1:286-301.
- Polizzi G., M. Dimartino, P. Bella and V. Catara (2008)** First Report of Leaf Spot and Blight Caused by *Ralstonia pckettii* on Bird of Paradise Tree in Italy. *Plant Disease* 92:835.
- Reinhold-Huek B. and T. Hurek (2011)** Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 14:435–443
- Rodríguez M. M. L. (2010)** Manual de identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de parasitología agrícola. Edo. de México. 146 p.

- Salazar-García S., L. E. Cossio-Vargas, I. J. L. González-Durán, R. Medina-Torres y C. J. Lovatt (2006)** Efecto de aspersiones con biorreguladores vegetales sobre la intensidad de la “caída de fruto de junio”, rendimiento y tamaño de fruto en aguacate ‘Hass’. Congreso de Ciencia y Tecnología Nayarit 2006. Tepic, Nayarit. 17-19 Mayo. pp: 1-10
- Salgado S. M. L. y G. C. Saavedra (1994)** Aislamiento de hongos asociados a la enfermedad conocida como anillamiento del pedúnculo del aguacate. *In: Memoria CICTAMEX. Fundación Salvador Sánchez Colin, Coatepec Harinas México.* pp: 183-187.
- Schaad N. W., J. B. Jones and W. Chun (2001)** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3ª ed. APS PRESS. Minnesota, E.U.A. 373 p.
- Sigee D. C. (2005)** Bacterial plant pathology, cell and molecular aspects. Cambridge University Press. 325 p.
- Suslow T. V., M. N. Schroth and M. Isaka (1981)** Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *The American Phytopathological Society* 72:917-918
- Toerien J. C. (1979)** Seasonal incidence of ring-neck on avocados and posible causes. *South Africa Avocado Grower’s Association Research Report* 3:49-51
- Tovar R. J. C., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005)** Efecto del fertirriego sobre la incidencia del anillamiento del pedúnculo del fruto del aguacate. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Notas Científicas. Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”. Uruapan, Michoacán, México.* pp: 85-92.
- Valencia A. M. y O. D. Téliz (2007)** Anillamiento del pedicelo. *In: El aguacate y su manejo integrado. O. D. Téliz y A. A. Mora. 2a ed. Mundi Prensa. Ixtapaluca, Edo. De México.* pp: 187-188.
- Verma S. C., A. Singh, S. P. Chowdhury and A. K. Tripathi (2004)** Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea sp.* and *Ochrobactrum sp.* using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters* 26:425-429.
- Vidales F. J. A. (2009)** Enfermedades. *In: Tecnología para la producción de aguacate en México. A. V. M. Coria. Libro Técnico Núm. 8 SAGARPA-*

INIFAP. 2a ed y 1a Reimpresión. Uruapan, Michoacán, México. pp: 117-154.

Vidaver A. K. and P. A. Lambrecht (2004) Las Bacterias como Patógenos Vegetales. Traducción A. M. Romero. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01
(<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/BacteriaEspañol.aspx>)

Wolstenholme B. N. (2007) Ecología: El Clima y el Ambiente Edáfico. *In:* El Palto Botánica, Producción y Usos. A. W. Wiley, B. Schaffer y N. N. Wolstenholme. Ediciones Universitarias de Valparaiso. Litogarín, Valparaiso, Chile. pp:75-102.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a cada uno de los cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos de abscisión del fruto de aguacate.

Cepa	Gram	Ryu	Ht	Pp	Pz	YDC	KB	Oxidasa	Ureasa	Anaerobiosis	Presencia de esporas	Crec 40	Indol	Pep	Coa
B1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
B3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
B4	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
B5	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B6	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
B7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
B8	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B9	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B13	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B15	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B16	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
B17	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B18	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B19	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B21	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
B22	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B23	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B24	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
B25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

B26	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B27	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B28	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
B29	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B30	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B31	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B32	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B34	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
B35	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B36	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B37	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
B38	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE LA SEMILLA DE FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana* MILLER var. *hass*)

RESUMEN

Las bacterias se encuentran relacionadas a las plantas mediante asociaciones benéficas o patogénicas. En el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*) los trabajos reportados sobre bacterias, están aunados a la patología conocida como abscisión temprana del fruto (anillamiento del pedúnculo). Esta enfermedad puede disminuir la producción hasta en un 45 % (México) y se encuentra distribuida ampliamente en países productores de aguacate (E.U.A., Israel, Sudáfrica, Australia), donde es conocida como anillo del cuello del fruto; sin embargo, pese a su constancia e importancia son pocos los estudios documentados sobre el mismo. Los trabajos realizados sobre la identificación de las bacterias asociadas a esta patología se han realizado mediante pruebas fenotípicas que incluyen esencialmente la morfología y los requerimientos de crecimiento (técnicas fenotípicas) de las bacterias; pero hay que recordar, que al contrario de lo que sucede en plantas, las bacterias, son un grupo de organismos con mayor grado de dificultad para su identificación y caracterización, ya que las técnicas fenotípicas no son muy confiables, debido a que pueden ocurrir errores en el proceso o por la variabilidad del microorganismo, por lo que se han desarrollado métodos más confiables como son los procedimientos moleculares. En el cultivo del aguacate, no existe investigaciones documentadas sobre la identificación bacteriana mediante técnicas moleculares, por lo que el objetivo de la presente investigación, es identificar mediante técnicas moleculares a bacterias asociadas al fruto del aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*). Se utilizaron un total de 36 cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal del fruto y con previa identificación fenotípica; se realizó una extracción de ADN seguido de una PCR y por último, secuenciar en el laboratorio MacroGen. Las secuencias resultantes se compararon con secuencias del GenBank y se realizaron análisis filogenéticos. Los cultivos bacterianos lograron agruparse en los géneros *Pantoea* (9), *Bacillus* (3), *Klebsiella* (2), *Empedobacter* (1), *Acinetobacter* (1), *Pseudomonas* (1) y *Enterobacter* (1).

Palabras clave: Gen 16S, filogenias, cepas, Enterobacterias y Pseudomonas.

ABSTRACT

The bacteria are related to plants by charities or pathogenic. In the cultivation of avocado (*Persea americana* Mill var. *hass*) reported work on bacteria, are coupled to the pathology known as early fruit abscission (peduncle banding). This disease can reduce production by up to 45% (Mexico) and is widely distributed in avocado producing countries (U.S.A., Israel, South Africa, Australia), where it is known as the fruit neck ring; however, despite its constancy and importance are few documented studies on it. The work on the identification of bacteria associated with this disease have been performed by phenotypic tests which essentially include the morphology and growth requirements (phenotypic techniques) of bacteria; but remember, that unlike what happens in plants, bacteria, are a group of organisms with higher degree of difficulty for identification and characterization, as the phenotypic techniques are not very reliable, because errors may occur in the process variability or microorganism, which have been developed as more reliable procedures are molecular methods. In the cultivation of avocado, there is no documented research on bacterial identification by molecular techniques, so that the objective of this research is using molecular techniques to identify bacteria associated with fruit Avocado (*Persea americana* Mill var. *hass*). A total of 36 isolated bacterial cultures of the seed coat the fruit with prior used phenotypic identification; DNA extraction followed by PCR was performed and finally, sequencing laboratory Macrogen. The resulting sequences were compared with GenBank sequences and phylogenetic analyzes were performed. Bacterial cultures achieved grouped into genera *Pantoea* (9), *Bacillus* (3), *Klebsiella* (2), *Empedobacter* (1), *Acinetobacter* (1), *Pseudomonas* (1) and *Enterobacter* (1).

Key words: 16S gen, phylogenies, strains, Enterobacterias and Pseudomonas.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos primitivos clasificados como procariontes, de las cuales, se tienen datos de su existencia desde hace 3.5 billones de años (Narayanasamy, 2011). Por lo que se puede afirmar que éstas, indudablemente se encuentran asociadas a las plantas, ya que el origen y desarrollo de las plantas se llevó a cabo en ambientes colonizados por este tipo de organismos (Sigeo, 2005). Las asociaciones que se establecen entre la planta y la bacteria pueden ser desde saprófitas hasta patogénicas (Kado, 2010). Muy pocas especies de bacterias han evolucionado para obtener la habilidad de invadir y crecer en tejidos vegetales sanos (Kado, 2010), inclusive se estima que sólo 100 de las 1600 especies bacterianas que se conocen son patógenas de plantas (Agrios, 2005). Estas bacterias están presentes en solo cinco grandes grupos taxonómicos que comprenden los géneros *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y las bacterias corineformes (*Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Rhodococcus*) (Kado, 2010).

En el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*), no se tiene registro de estudios que indiquen la presencia de bacterias endófitas en cualquier órgano de la planta, inclusive son pocos los estudios reportados sobre bacterias. Las investigaciones documentadas sobre bacterias en el cultivo, están relacionadas a la patología abscisión del fruto regionalmente conocida como anillamiento del pedúnculo (Ochoa *et al.*, 2001; Cervantes *et al.*, 2012); se asume la participación bacteriana cuando se observa una pudrición en la cubierta seminal así como del tejido mesocarpico circundante a esta (Ochoa *et al.*, 2001). La abscisión del fruto de aguacate, se encuentra mundialmente reportada en países productores como son: E.U.A., Israel, Australia, Sudáfrica y Perú (Snowdon, 1990); es una enfermedad que se presenta en los primeros estados de desarrollo del fruto (Coit, 1928) y puede provocar la pérdida de hasta un 45 % de la producción (Cossio-Vargas *et al.*, 2008).

Como en todas las enfermedades bacterianas, un requisito indispensable para el adecuado control es la identificación del agente etiológico responsable del proceso

infeccioso (Rodríguez, 2010; Bou *et al.*, 2011). En el caso de la abscisión del fruto del aguacate, la identificación bacteriana ha sido mediante técnicas comunes de morfología y pruebas bioquímicas (requerimientos de crecimiento); sin embargo, es importante destacar que las bacterias, tienen un mayor grado de dificultad para su identificación y caracterización (Da Silva, 1982) y normalmente no es suficiente con estas pruebas. Las técnicas fenotípicas permiten darnos una idea del agente etiológico (Kado, 2010; Bou *et al.*, 2011), mediante el uso de medios específicos de crecimiento y características metabólicas (Sigeo, 2005), pero estos, no son muy confiables debido a la variabilidad del microorganismo, la inexactitud del método y los errores en el proceso. Por lo que se han desarrollado métodos para aumentar la confiabilidad de la identificación como son, los basados en proteómica pruebas de fagos, serología y procedimientos analíticos moleculares (Sigeo, 2005; Kado, 2010; Bou *et al.*, 2011). Con base en el sistema molecular, se hace la mejor estimación de las actuales relaciones filogenéticas; sin embargo, a la fecha, las filogenias aceptadas no se han logrado usando estos enfoques moleculares (Kado, 2010).

El análisis molecular, incluye la comparación de secuencias de genes ribosomales principalmente de la subunidad pequeña 16S de ADNr (Kado, 2010). El ADNr 16S es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano; este es de distribución universal y es un componente crítico en la función celular. El ADNr 16S actúa como un cronómetro molecular porque presenta un alto grado de conservación; aunque el ADNr 16S constituye el blanco de acción para algunos antimicrobianos, se producen mutaciones que conducen a la resistencia fenotípica, no se invalida la utilización de éste para la identificación bacteriana o la asignación de género y especie. La secuencia del gen ADNr 16S presenta aproximadamente 1.500 pb, este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas (Bou *et al.*, 2011). La universalidad del gen lo hacen un blanco ideal para estudios filogenéticos y de clasificación taxonómica (Wang y Qian, 2009).

La nueva generación de tecnologías de secuenciación de ADN está suplantando las tecnologías de ensayos básicos comunes (Shendure y Ji, 2008). La secuenciación de ácidos nucleicos es una de las técnicas moleculares más utilizadas para la detección e identificación bacteriana, inclusive se pueden inferir filogenias a partir de las secuencias obtenidas del gen ADN 16S (Barghouthi, 2011). Sin embargo, la utilización de adecuados primers para la reacción de PCR son un punto crítico para la correcta amplificación, los primers diseñados para el gen ADNr 16S, están localizados en las regiones conservativas que se ubican en la región objetivo utilizada para el análisis filogenético (Wang y Qian, 2009). Al utilizar la PCR para amplificar ADNr 16S, se deben de tomar medidas de precaución para evitar la formación de efectos que pueda dirigir a conclusiones erróneas, especialmente con primers universales (Osborne *et al.*, 2005). Investigadores se han dado a la tarea de crear primers universales que nos puedan proveer amplificaciones correctas, sin embargo, es de valiosa importancia saber seleccionar los primers adecuados, ya que desafortunadamente, este tipo de primers no cubren todos los géneros de bacterias mucho menos a nivel de especie (Barghouthi, 2011).

Cervantes *et al.* (2012) indican la presencia de tres especies bacterianas *Ralstonia pickettii*, *Enterobacter ludwigii* y *Klebsiella oxytoca*, aisladas de la semilla y la cubierta seminal del fruto de aguacate asociadas a la abscisión del fruto del aguacate, éstas identificadas mediante técnicas moleculares; sin embargo, es muy poco lo que se conoce de la identificación molecular bacteriana en el cultivo, por lo que el objetivo de esta investigación, es identificar mediante técnicas moleculares a bacterias asociadas a la semilla del fruto del aguacate (*Persea americana* Mill var. *hass*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Material biológico. Se emplearon 36 cepas bacterianas, obtenidos de la cubierta seminal de frutos de aguacate asintomáticos y sintomáticos de abscisión o anillo del cuello del fruto (Capítulo I), con previa identificación morfológica (Cuadro 1A).

Aislamiento de ADN. Los 36 cultivos bacterianos se crecieron en medio de cultivo PDA por 72 h. La extracción de ácidos nucleicos (ADN) se realizó de acuerdo el protocolo descrito por Cenis (1992) con la siguiente modificación: en un microtubo cónico estéril (1.5 μ L), se agregó el Buffer de extracción (200mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5 % SDS) y posteriormente con la ayuda de una espátula estéril, se tomó una cantidad de 1×10^6 ufc/mL por cultivo bacteriano y se colocaron en el microtubo; los pasos siguientes se llevaron a cabo tal como lo describe el protocolo. El pellet obtenido se resuspendió en Buffer TE (de almacenamiento) y se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso. La visualización del ADN se hizo en un fotodocumentador ultravioleta MiniBis Pro®, a través de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio a 120 volts por 20 minutos. La concentración y calidad del ADN se evaluó mediante las lecturas a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro ultravioleta SmartSpec de BioRad® al cual se añadió como aditamento una celda TrayCell de Hellma-Analytics®.

Condiciones de amplificación. El ADN obtenido se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); se utilizaron los primer generales 909F (5'-AAACTCAAAGGAATTGAC-3') y 909R (5'-GACGGGCGGTGTGTACCAA-3') para la región 16S. Se utilizó una mezcla de reacción de PCR para el kit Taq Polymerase Recombinant, Invitrogen, compuesta por 2.5 μ L de Tris 1M con pH 9.0, 2 μ L dNTPs, 0.5 μ L primer forward, 0.5 μ L primer reverse, 11.3 μ L dH₂O, 3 μ L de MgCl₂ a 50mM, 0.2 μ L Taq polimerasa y 1 μ L del ADN extraído de las cepas bacterianas. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti, Applied Biosystems® de Life Technologies®; el protocolo de PCR fue el empleado por Barghouthi (2011) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 90 segundos; seguido

de 33 ciclos de 48°C por 35 segundos, 50°C por 35 segundos, 72°C por 105 segundos y una extensión final a 72 °C por 3 minutos.

Visualización de fragmentos de amplificación. Los productos de amplificación obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v). La electroforesis se hizo durante 60 minutos a 80 volts y se visualizó en un fotodocumentador ultravioleta MiniBis Pro®.

Secuenciación. Los productos de PCR obtenidos se enviaron al laboratorio Macrogen Inc. en Seúl, Corea para su purificación y secuenciación.

Contenido de GC. Las secuencias resultantes se sometieron al software DNA/GC Content Calculator para determinar el contenido en porcentaje de GC, característica de utilidad para la identificación de géneros bacterianos.

Análisis filogenético. Las secuencias resultantes se compararon en homología con las incluidas en la base de datos del NCBI GenBank mediante el software BLAST, donde se obtuvieron las secuencias que presentaron mayor similitud para alinearse en el software MEGA 6.0. Posteriormente, se analizó el mejor modelo evolutivo para la construcción del cladograma con base al análisis de máxima verosimilitud; los cladogramas de neighbor joining y máxima parsimonia también se realizaron en este mismo programa. Los cladogramas obtenidos fueron editados mediante la aplicación FigTree 1.4.2 para Mac OSX.

Cálculo de las distancias genéticas. Las secuencias resultantes junto con las obtenidas del GenBank, se sometieron a un análisis de distancia genética en el programa MEGA 6.0. El modelo evolutivo utilizado fue determinado por el software, el cual estimó la divergencia evolutiva entre los aislados, para lo que se tomó en cuenta el tamaño de la secuencia alineada así como el número de sustituciones de bases por sitio entre las secuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad y concentración del ADN. La calidad del ADN de las 36 cepas bacterianas se verificó por electroforesis (Figura 1). Las concentraciones resultantes oscilaron entre 108 hasta 1800 ng/ μ L, mientras que para el parámetro de calidad la relación de absorbancia 260/280 nm fue superior a 1.8 para todas las cepas; valor aceptado en la determinación de muestras puras (Wilfinger *et al.*, 1997),

Por lo anterior, se afirma que el ADN extraído de los cultivos bacterianos presentó una calidad y concentración idónea para la posterior PCR.

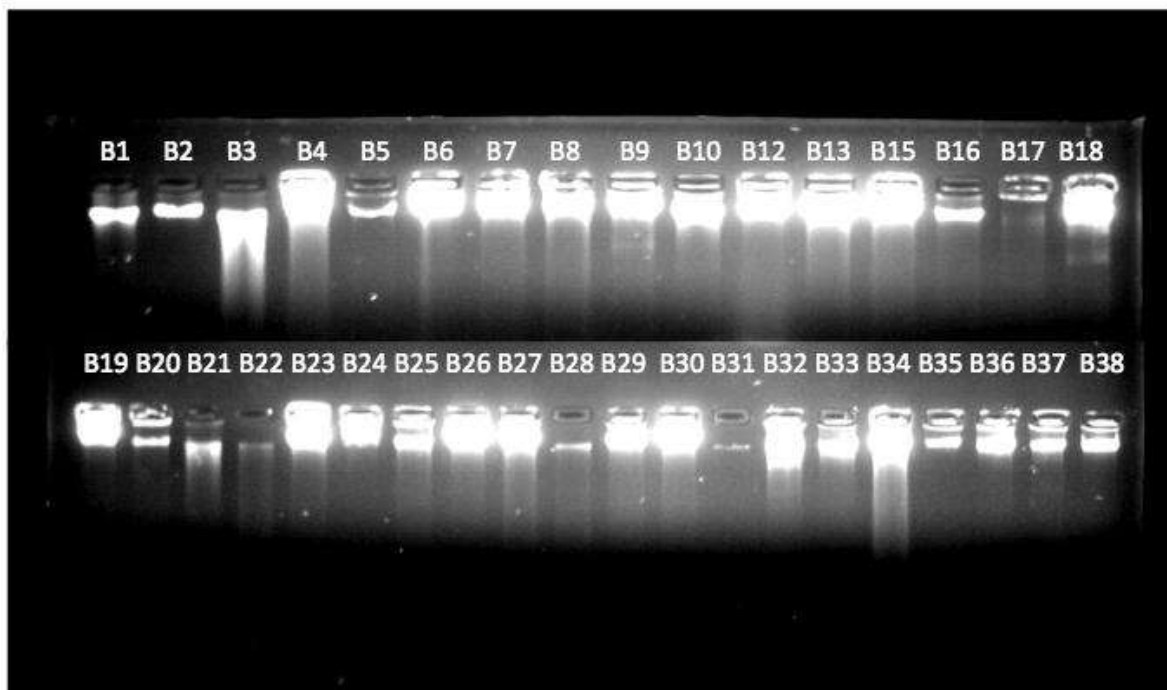


Figura 1. Visualización del ADN de los 36 cultivos bacterianos, obtenidos de la cubierta seminal del fruto de aguacate. Identificados con la letra B de bacteria y un número que representa el consecutivo del orden de aislamiento. Las cepas B11 y B14 fueron excluidas de este estudio.

PCR. La reacción en cadena de la polimerasa sólo se obtuvo en 20 de las 36 cepas bacterianas, esto podría deberse a la incapacidad de los primers usados en este estudio para amplificar todas las especies bacterianas; Barghouthi (2011) señala que

la desventaja de utilizar primers generales es la imposibilidad de amplificar todas las especies bacterianas, de igual manera Osborne *et al.* (2005) indican que los primers generales pueden proveer falsos resultados por lo que su uso no es el más recomendable. Por lo anterior es necesario el utilizar primers más específicos por lo menos para nivel de género, tal como lo describe Barghouthi (2011).

Los fragmentos de ADN amplificado, obtenidos fueron de 450 y 500 pares de bases, tal como lo muestra la Figura 2, cabe destacar que el tamaño de los fragmentos está dentro de los esperados para los primers 909 F y 909 R de acuerdo a Barghouthi (2011), que fueron los utilizados en este estudio.

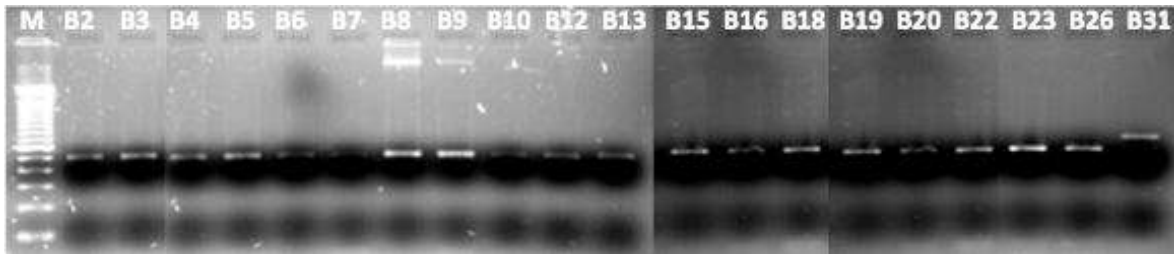


Figura 2. Visualización del producto de PCR de 20 cultivos bacterianos, obtenidos de la cubierta seminal del fruto de aguacate.

Análisis filogenético. De las 20 cepas bacterianas secuenciadas, la B17 y B31 no mostraron similitud alguna con las secuencias encontradas de la base de datos del GenBank, posiblemente por ser secuencias no registradas anteriormente. En el Cuadro 1 se muestran los datos de las secuencias del GenBank seleccionadas para los análisis filogenéticos, ya que presentaron una similitud mayor al 95 %. El modelo evolutivo resultante para la construcción del cladograma en base a máxima verosimilitud fue K2+G (kimura dos parámetros más distribución gamma), ya que este presentó el menor coeficiente de información bayesiana. Los cladogramas obtenidos de los tres análisis utilizados (neighbor joining, máxima parsimonia y máxima verosimilitud) se muestran en la Figura 3 a 5.

Cuadro 1. Secuencias homologas del GenBank utilizadas en los análisis filogenéticos de las cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate con síntomas de abscisión.

ACCESIÓN	ESPECIE	SIMILITUD	ORIGEN	AUTOR	FUENTE DE AISLAMIENTO
KT070310	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	99 %	India	Majumder <i>et al.</i> (2015)	Suelo
KU308266	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	99 %	India	Sawhney y Saini (2015)	<i>Fragaria vesca</i> (endófito)
KU234679	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99 %	Turquía	Guvensen <i>et al.</i> (2015)	Agua residuales
KC236753	<i>Bacillus sp.</i>	99 %	China	Huang (2013)	Suelo
HE970643	<i>Bacillus subtilis</i>	99 %	India	Mittal y Shrivastava (2012)	<i>Azadirachta indica</i> (endófito)
KT719986	<i>Bacillus subtilis</i> subsp.	99 %	E.U.A.	Parag <i>et al.</i> (2015)	Superficie de astronave
LC109973	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99 %	Arabia Saudita	Abo-Amer <i>et al.</i> (2016)	Alimentos
EU102275	<i>Enterobacter bacterium</i>	99 %	Corea	Kim <i>et al.</i> (2011)	Suelo
AM232807	<i>Empedobacter sp.</i>	99 %	Alemania	Lipski y Herzog (2006)	Planta cervecera
KT005536	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97 %	India	Kuleshwar y Kumar (2015)	<i>Oryza sativa</i>
GQ372999	<i>Klebsiella sp.</i>	95 %	Corea	Lee y Park (2009)	-
KR265433	<i>Pantoea agglomerans</i>	99 %	Omán	Al-Kharousi <i>et al.</i> (2015)	Frutos frescos
KR265399	<i>Pantoea agglomerans</i>	99 %	Omán	Al-Kharousi <i>et al.</i> (2015)	Frutos frescos
KJ654341	<i>Pantoea pleuroti</i>	99 %	China	Ma <i>et al.</i> (2016)	<i>Pleurotus eryngii</i>
JX909082	<i>Pantoea sp.</i>	96 %	Kenya	Mulugeta <i>et al.</i> (2012)	Ensete (endófito)
KU219844	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	93 %	Corea	Sharma <i>et al.</i> (2015)	Suelo
JF318175	<i>Rhizobium leucaenae</i>	-	México	Ribeiro <i>et al.</i> (2011)	Leguminosa (simbionte)

En el cladograma resultante del análisis de neighbor joining (Figura 3), se observan varios clados monofiléticos (seis), el más grande de ellos compuesto por las especies pertenecientes a *Pantoea*, donde se agruparon las cepas B18, B23, B7, B13, B15, B5 y B26, lo cual con excepción de la cepa B7 de la que sus características morfológicas no permitieron tener su identificación fenotípica, en todas las demás se corrobora su caracterización en este género. Seguido en similitud, se encuentra el clado monofilético formado por las especies de *Klebsiella* y las cepas B12 y B16, en

el caso de la cepa B12 se había identificado fenotípicamente en el Capítulo I como *Pantoea*, sin embargo, es necesario destacar que son especies emparentadas (Madigan *et al.*, 2004), mientras que la cepa B16 no se identificó mediante las técnicas fenotípicas utilizadas para bacterias fitopatógenas, ya que no es un género determinado como tal. Las cepas B8 y B9 se agruparon de manera intermedia entre los géneros *Pantoea* y *Klebsiella*, identificadas con las pruebas fenotípicas como *Pantoea* lo cual como se señaló anteriormente son géneros emparentados. La cepa B20 junto con *Enterobacteriaceae bacterium* forman un tercer grupo monofilético cercano a *Klebsiella*. Estos tres clados se agrupan con un valor de Bootstrap ideal (100), los géneros anteriormente indicados se encuentran clasificados dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Madigan *et al.*, 2004).

Otro clado monofilético, lo componen las especies del género *Acinetobacter* junto con la cepa B2 sin identificación mediante las técnicas fenotípicas (Cuadro 1A); seguido en similitud, se encuentran la cepa B6 con *Pseudomonas hibiscola* y la cepa B4 con *Empedobacter* sp.; la cepa B6 difiere con la identificación obtenida mediante pruebas fenotípicas que la determinaban como *Pantoea*, mientras que la cepa B4 no se pudo identificar mediante las pruebas fenotípicas anteriormente realizadas en el Capítulo I.

El último clado monofilético, presenta un valor de Bootstrap perfecto (100) y está conformado por especies del género *Bacillus* junto con las cepas B10, B22 y B3, las que forman el clado monofilético más distante, es substancial indicar que en los resultados de la identificación fenotípica, estas tres cepas pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas (Madigan *et al.*, 2004), característica que pudo confundir dichas pruebas en su identificación fenotípica como corineformes en el caso de B3 y B10, que es el grupo de bacterias fitopatógenas Gram positiva; por el contrario B22 no tuvo confusión en estas pruebas al no lograrse su identificación.

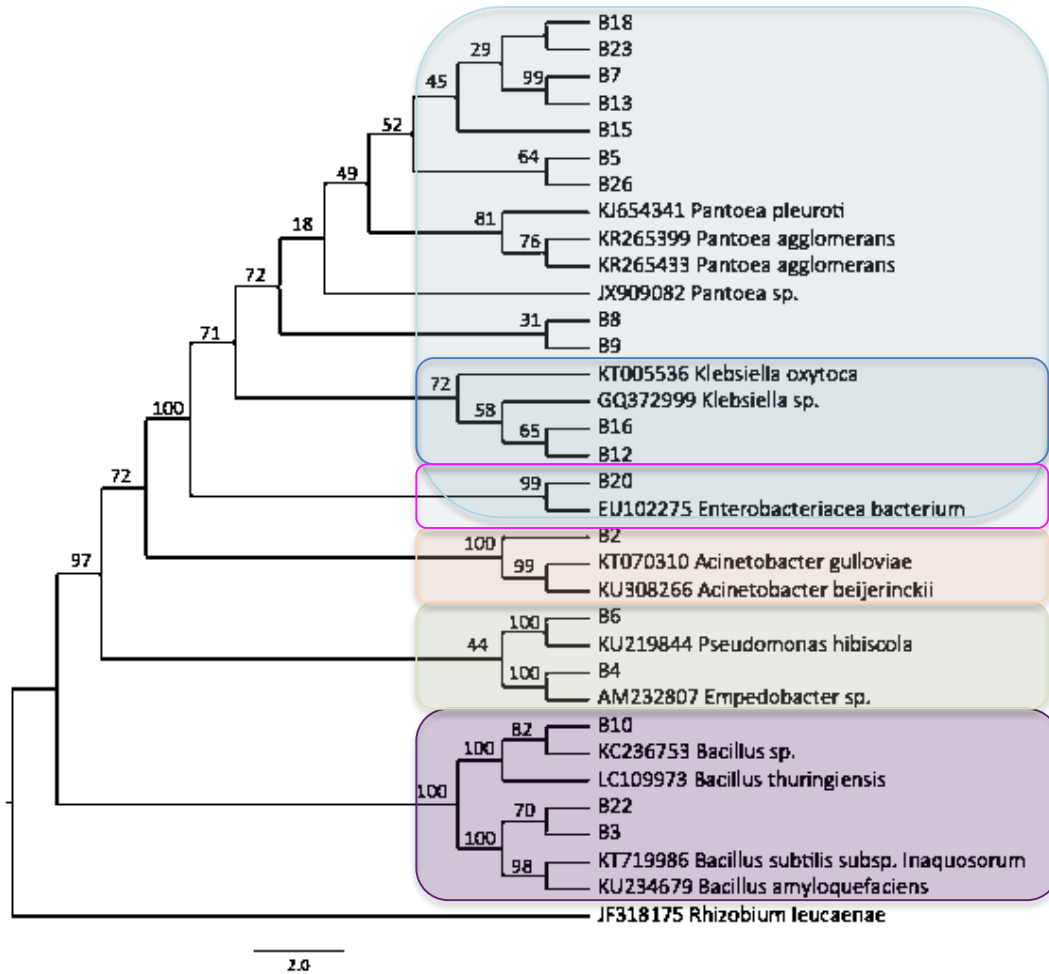


Figura 3. Cladograma obtenido con base a Neighbor Joining con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.

El árbol resultante del análisis de máxima parsimonia (Figura 4) exhibe la misma topología que el anterior, a excepción del clado formado por las especies de *Pantoea*, ya que en este análisis se incluyen las cepas B8 y B9 dentro de este grupo, las cuales anteriormente no se agruparon de manera contundente en este género. Nuevamente las especies pertenecientes a los géneros *Pantoea*, *Klebsiella* y *Enterobacter* se agrupan en un clado grande con un valor elevado de Bootstrap (100).

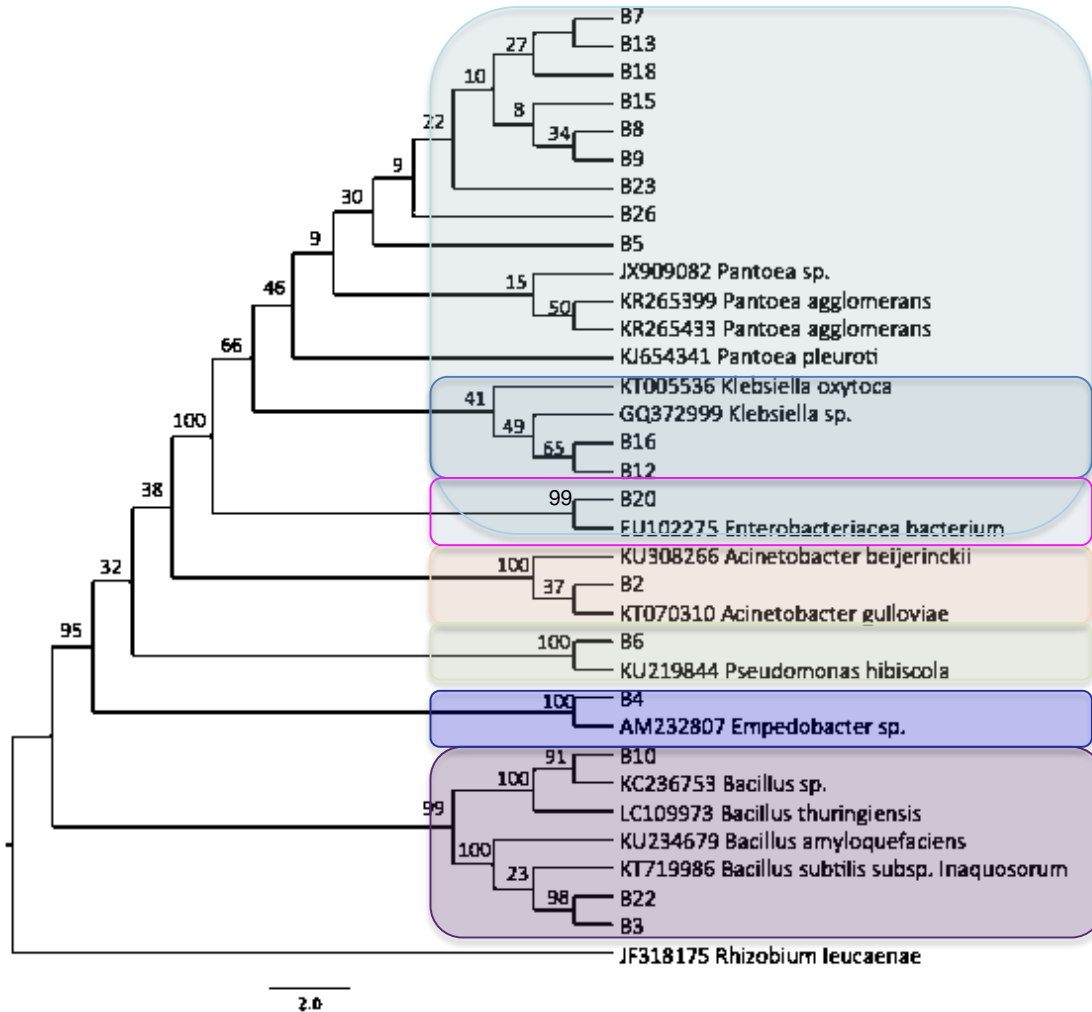


Figura 4. Cladograma obtenido con base en la máxima parsmonia con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.

En lo que respecta al árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud, de la misma manera la topología es similar a los cladogramas anteriormente presentados; aunque en este caso, las cepas B8 y B9 se agrupan ahora con las especies del género *Klebsiella*, es importante recordar el parentesco de este género con *Pantoea*. La razón de este acomodo se debe a que las distancias evolutivas existentes entre el género *Pantoea* y *Klebsiella* son muy bajas (4 %), de acuerdo al análisis genético de distancias realizado en la presente investigación.

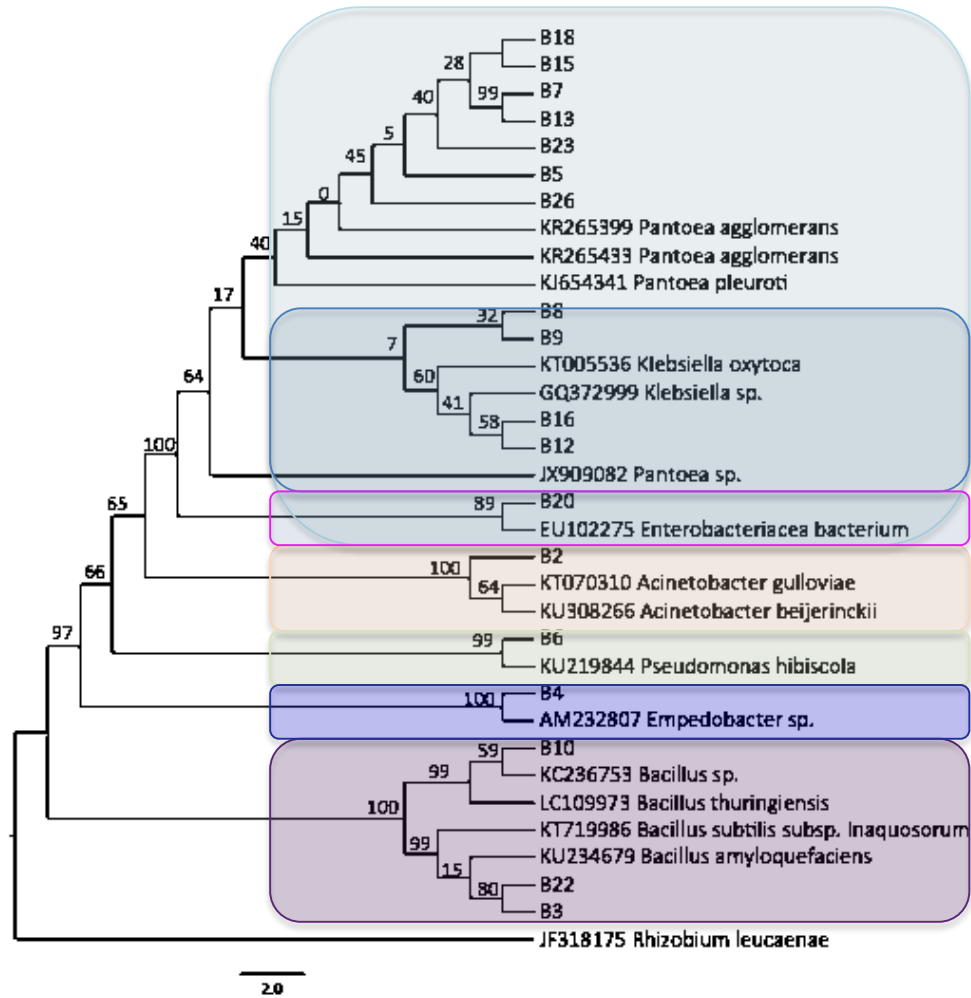


Figura 5. Cladograma obtenido con base a la máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap de cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.

Las distancias que existen entre las cepas B8 y B9 respecto al género *Pantoea* (3 y 5 % respectivamente) son menores que las existentes con el género *Klebsiella* (7.5 y 7 %), lo que indica que éstas cepas están mas cercanas a pertenecer a alguna especie del género *Pantoea*. Las cepas que se encuentran en el clado de las especies de *Bacillus* son distantes hasta en 29 % respecto a las pertenecientes al género *Pantoea*, esto se puede observar claramente en las Figuras 3, 4 y 5 donde se manifiesta lo separado de los clados. Con base en el análisis de distancias genéticas, se puede determinar que el análisis filogenético de máxima parsimonia para este estudio, es el que dio los mejores agrupamientos de las cepas.

Es importante señalar que en los tres análisis realizados los géneros *Pantoea*, *Klebsiella* y *Enterobacter* se agrupan en un gran clado, estos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* de ahí que compartan distancias tan pequeñas entre ellos (4 al 5 %). Las enterobacteriaceas se caracterizan por ser Gram negativas, bacilos no esporuladores, no móviles, anaerobios facultativos, oxidasa negativa, con requerimientos nutricionales simples y fermentadores de azúcares con diversos productos finales (Madigan *et al.*, 2004), características que fueron determinadas en las pruebas fenotípicas. A los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* se les encuentra comúnmente en el suelo, en particular como parte de la rizosfera; su importancia actual radica en que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, por lo que han adoptado el nombre de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR en sus siglas en inglés), éstas llevan a cabo varios mecanismos en los que destacan la solubilización de nutrientes minerales, la estimulación del crecimiento de las raíces y la supresión de las enfermedades en las raíces (Martínez-Viveros *et al.*, 2010), aunque, también tienen la capacidad de desarrollarse endofíticamente tal como lo señalan Palus *et al.* (1996) y Dong *et al.* (2003) para el género *Klebsiella* y Tsuda *et al.* (2001) para el género *Enterobacter*. Estas afirmaciones coinciden con lo obtenido en la presente investigación, al corroborar su asociación endofítica en aguacate, ya que las cepas bacterianas secuenciadas se obtuvieron de la cubierta seminal de este fruto. Las enterobacterias se caracterizan por tener un contenido GC en su ADN superior al 50 % (Madigan *et al.*, 2004), lo que coincide con las cepas B5, B7, B8, B9, B13, B15, B18, B23 y B26, las cuales se agrupan en el género *Pantoea* con valores superiores al 50 % (51.2 a 54.1 %), con excepción de las cepas B16 (*Klebsiella*) y B20 (*Enterobacter*) que exhibieron una valor menor (49.5 %). Lo anterior se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Contenido de GC (porcentaje) en las secuencias resultantes de las 18 cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate.

Cepa	GC	Cepa	GC	Cepa	GC	Cepa	GC	Cepa	GC
B2	51 %	B6	56.5 %	B10	53.5 %	B16	49.4 %	B23	53.1 %
B3	51.8 %	B7	53.5 %	B12	51.4 %	B18	52.1 %	B26	50.7 %
B4	46.1 %	B8	54.1 %	B13	51.2 %	B20	49.5 %		
B5	52.6 %	B9	53.3 %	B15	53.7 %	B22	51.6 %		

La cepa B2 presenta una distancia genética sólo el 2 % con las especies de *Acinetobacter*. Las especies pertenecientes a *Acinetobacter* se encuentran comúnmente en agua y suelo; ocasionalmente, han sido descritas como nocosomiales en animales. Se caracterizan por ser oxidasa negativas, resistentes a la penicilina. Algunas cepas pueden utilizar un restringido rango de azúcares y tienen movilidad por contracción (Madigan *et al.*, 2004). Aunque también, se tiene un registro de su asociación endofítica en fresa (Sawhney y Saini, 2015), condición que concuerda, con nuestra investigación al ser aislada de la cubierta seminal del fruto de aguacate.

Otro género asociado con los aislados de este estudio en los cladogramas es *Pseudomonas*, éstas se caracterizan por ser un grupo de bacilos rectos o ligeramente incurvados, Gram negativos, aerobios y quimioorganotrofos (Madigan *et al.*, 2004). Son organismos frecuentemente oxidativos aunque a veces son fisiológicamente fermentativos (Garassini, 1967), tiene requerimientos nutritivos muy simples y crecen a pH neutros en un rango mesofílico de temperaturas (Madigan *et al.*, 2004), estas características fenotípicas coinciden con el registro de la cepa B6.

En el último clado monofilético mostrado por los tres análisis realizados se agrupan las cepas B3, B10 y B22 junto con las especies de *Bacillus* con distancias del 1.5 y 2 % respecto a las especies homologadas. Éste género se caracteriza por ser Gram positivas esporuladas, con bajo contenido de GC, sin embargo, las cepas anteriormente señaladas, presentaron un contenido de GC superior al 50 %, como ocurre en otros casos de especies de *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus macerans*) con altos contenidos de GC. Aunque existe heterogeneidad entre las especies, el hábitat primario de todas es el suelo, incluso en especies patógenas que también son saprofitas del suelo (Madigan *et al.*, 2004). Aunque su hábitat primario es el suelo, al género *Bacillus* también se le ha encontrado como endófito en algunos cultivos, tal es el caso de la castaña (Wilhelm *et al.*, 1998), el sorgo (Luo *et al.*, 2012) y el maíz (Gond *et al.*, 2015).

Como ya se señaló, los seis géneros identificados en este estudio han sido reportados con asociación endofítica en diferentes especies, aunque no todos como

fitopatógenos. Sin embargo, a los géneros no reportados como fitopatógenos (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Empedobacter*) se les ha reconocido como productores de ácido indolacético (Madigan *et al.*, 2004; Hugo *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2011), lo cual puede estar relacionado con lo que indican Salazar-García *et al.* (2006) respecto a que la abscisión de los frutos de aguacate se da por un desequilibrio hormonal; en alusión a lo señalado por Bower y Cutting (1988) en su recomendación de que la concentración de auxinas, giberelinas y citoquininas deben ser mayores durante el inicio del crecimiento del fruto y posterior disminución, ya que como lo indican Cowan *et al.* (2001), las auxinas afectan el cuajado y crecimiento del fruto, lo que posiblemente esté provocándose por la presencia de estas bacterias en la semilla del fruto; aunque, estos mismos autores (Cowan *et al.* 2001), señalan que el conocimiento de las hormonas en el desarrollo del fruto en aguacate es rudimentario.

CONCLUSIONES

Con los análisis filogenéticos para el gen 16S se identificó a las cepas aisladas de la cubierta seminal del fruto de aguacate, en los géneros *Pantoea* (B5, B7, B8, B9, B13, B15, B18, B23 y B26), *Klebsiella* (B12 y B16), *Acinetobacter* (B2), *Empedobacter* (B4), *Enterobacter* (B20) y *Bacillus* (B3, B10, B22).

Pantoea, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus* son nuevos reportes asociados a la abscisión del fruto de aguacate.

La coincidencia en la identificación fenotípica y molecular fue sólo para el género *Pantoea*.

Cepas identificadas fenotípicamente; *Erwinia* (B17), *Burkholderia* (B32), *Pantoea* (B25, B27, B29, B34, B35, B36, B37, B38) y corineformes (B1, B21, B30 y B31) no se identificaron molecularmente.

LITERATURA CITADA

- Abo-Amer A., S. Gadel-Rab and A. Asiri (2016)** Multidrug resistant bacteria from human and bacteria from fermented food (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LC109973>).
- Agrios G., N. (2005)** Plant Pathology. 5a. ed. Academic Press. New York, U.S.A. 922 p.
- Al-Kharousi Z., N. Guizani, A. Al-Saadi, I. Al-Bulushi and B. Shaharoon (2015)** Microbial analysis of some fresh fruits and vegetables imported into or grown in Oman (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KR265433>).
- Barghouthi S. A. (2011)** A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian Journal Microbiology* 51:430-444.
- Bou G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáenz-Nieto y S. Veldezate (2011)** Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29:601–608.
- Bower J. and J. Cutting (1988)** Avocado fruit development and ripening physiology. *In: J. Janick. Horticultural Reviews* 10:229-271.
- Cenis J. L. (1992)** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20:2380.
- Cervantes, C. E. A., A. H. Guillén, S. M. E. Pedraza y C. M. Gutiérrez (2012)** Sensibilidad a antibióticos in vitro de bacterias asociadas al anillamiento del pedúnculo del aguacate. *In: XIV Congreso Internacional y XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología. Nayarit, México. pp:91-92.*
- Coit J. E. (1928)** Pests and diseases of the avocado. California Avocado Growers Association Yearbook. 18-21
- Cowan A., R. Cripps, E. Richings and N. Taylor (2001)** Fruit size: Towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum* 111:127–136.
- Cossio-Vargas L. E., S. Salazar-García, I. J. González-Durán y R. Medina-Torres (2008)** Fenología del aguacate 'Hass' en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14:319-324.

- Da Silva R. R. (1982)** Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Estado de México, México. 109 p.
- Dong Y., A. L. Iniguez and E. W. Triplett (2003)** Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant and Soil* 257:49-59.
- Garassini L. A. (1967)** Microbiología Agraria. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía de Maracay. 216 p.
- Gond S. K., M. S. Bergen, M. S. Torres, J. F. White Jr. and R. N. Kharwar (2015)** Effect of bacterial endophyte on expression of defense genes in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme*. *Symbiosis* 66:133-140.
- Guvensen N. C., Z. Zorlu and B. Col (2015)** Diversity of culturable detrimental biofilm-forming bacteria in wastewater treatment system of an industrial system (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU234679>)
- Huang J. (2013)** Vertical changes of the structure of mineral-weathering bacterial communities during the typical Taihu paddy soil profile. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC236753>).
- Hugo C. J., B. Bruun and J. J. Piet (2006)** The Genera *Empedobacter* and *Myroides*. *Prokaryotes* 7:630–637.
- Kado C. I. (2010)** Plant Bacteriology. APS Press. E.U.A. 336 p.
- Kim W. I., W. K. Cho, S. N. Kim, H. Chu, K. Y. Ryu, J. C. Yun and C. S. Park (2011)** Genetic diversity of cultivable plant growth-promoting rhizobacteria in Korea. *Microbiology and Biotechnology* 21:777-790.
- Kuleshwar S. P. and A. Kumar (2015)** Structural and functional analysis of phyllospheric microbiome of rice. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT005536>).
- Lee W. and D. Park (2009)** Characterization of bacteria that can lyse TMAH. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ372999>).
- Lipski A. and P. Herzog (2006)** Characterization of primary colonizers of a beer bottling plant. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM232807>).
- Long X., X. Chen, Y. Chen, J. W. C. Wong, Z. Wei and Q. Wu (2011)** Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii*

Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World Journal Microbiology Biotechnology* 27:1197–1207.

- Lou S., T. Xu, L. Chen, J. Chen, C. Rao, X. Xiao, Y. Wan, G. Zeng, F. Long, C. Liu, and Y. Liu (2012)** Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:1745-1753.
- Ma Y., Y. Yin, C. Rong, S. Chen, Y. Liu, S. Wang and F. Xu (2015)** *Pantoea pleuroti* sp. nov., Isolated from the Fruiting Bodies of *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology* 72:207-212.
- Madigan M. T., J. M. Martinko, y J. Parker (2004)** La diversidad procariótica: Bacteria. *In: Biología de los Microorganismos*. Madigan M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 10a ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. pp. 351-439.
- Majumder S., S. Gupta and S. Raghuvanshi (2015)** A comprehensive study on the removal of multiple metals Cr(VI), Cu(II) and Zn(II) using bacterial. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT070310>).
- Martínez-Viveros O., M. A. Jorquera, D. E. Crowley, G. Gajardo and M. L. Mora (2010)** Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Soil Science and Plant Nutrition* 10:293-319.
- Mittal S. and D. Shrivastava (2012)** Endophytic bacterial strains from *Azadirachta indica* from Rajasthan. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HE970643>).
- Mulugeta Y., S. Kelemu, F. Stomeo and A. Gessesse (2012)** Isolation and molecular characterization of putative endophytes associated with enset. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX909082>).
- Narayanasamy P. (2011)** Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens Vol.2. Springer Science Business Media B. V. New York. 256 p.
- Ochoa A. S., M. J. Campos y G. R. Mendoza (2001)** Identificación de bacterias asociadas en el anillamiento del Pedúnculo del Aguacatero. *In: Memorias del Primer Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate*. Uruapan, Michoacán, México. pp:198-199.

- Osborne C. A., M. Galic, P. Sangwan and P. H. Janseen (2005)** PCR-generated artifact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 248:183-187.
- Palus J. A., J. Borneman, P. W. Ludden and E. W. Triplett (1996)** A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. *Plant and Soil* 186:135-142.
- Parag V. A., J. N. Benardini, W. Schubert, J. Y. Tan, A. Carigo, N. Schwalb, G. Smith, N. Sánchez, A. Morgenstern, L. B. Hecht, D. L. Engler, A. Blachowicz, H. Aronson, J. Jacobs, A. Jefferson and A. Checinska (2015)** Microbes Associated with the Phoenix Fairing Spacecraft Surfaces. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT719986>).
- Ribeiro R. A., M. A. Roge, A. López-López, E. Ormeño-Orrillo, F. A. Barcellos, J. Martínez, F. L. Thompson, E. Martínez-Romero and M. Hungria (2012)** Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1179-1184.
- Rodríguez M. M. L. (2010)** Manual de identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de parasitología agrícola. Edo. de México. 146 p.
- Salazar-García S., L. E. Cossio-Vargas, I. J. L. González-Durán, R. Medina-Torres y C. J. Lovatt (2006)** Efecto de aspersiones con biorreguladores vegetales sobre la intensidad de la “caída de fruto de junio”, rendimiento y tamaño de fruto en aguacate ‘Hass’. Congreso de Ciencia y Tecnología Nayarit 2006. Tepic, Nayarit. 17-19 Mayo. pp:1-10.
- Sawhney P. K. and A. K. Saini (2015)** Isolation of chlorpyrifos degrading endophytes from the roots of the strawberry plants. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU308266>).
- Sharma T., N. Rai and N. Kumar (2015)** PGPR from paddy rhizosphere. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU219844>).
- Shendure J. and H. Ji (2008)** Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26:1135-1145.
- Sigee D. C. (2005)** Bacterial plant pathology, cell and molecular aspects. Cambridge University Press. 325 p.

- Snowdon L. A. (1990)** A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. 1:103
- Tsuda K., Y. Kosaka, S. Tsuge, S. Y. Kubo and O. Horino (2001)** Evaluation of the Endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 Isolated from Spinach Roots for Biological Control against Fusarium Wilt of Spinach. *Journal of general Plant Pathology* 67:78-84.
- Wang Y. and P. Qian (2009)** Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* 4:1-9.
- Wilfinger W. W., K. Mackey and P. Chomczynski (1997)** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22:474-476.
- Wilhelm E., W. Arthofer, R. Schafleitner and B. Krebs (1998)** *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52:105-108.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Cepas de cultivos bacterianos aislados de la cubierta seminal de frutos de aguacate identificados mediante pruebas fenotípicas.

Clave de cepa bacteriana	Caracterización morfológica	Clave de cepa bacteriana	Caracterización morfológica	Clave de cepa bacteriana	Caracterización morfológica	Clave de cepa bacteriana	Caracterización morfológica
B1	<i>Coryneformes</i>	B10	<i>Coryneformes</i>	B21	<i>Coryneformes</i>	B30	<i>Coryneformes</i>
B2	*	B12	<i>Pantoea</i>	B22	<i>Coryneformes</i>	B31	<i>Coryneformes</i>
B3	<i>Coryneformes</i>	B13	<i>Pantoea</i>	B23	<i>Pantoea</i>	B32	<i>Burkholderia</i>
B4	*	B15	<i>Pantoea</i>	B24	*	B33	<i>Coryneformes</i>
B5	<i>Pantoea</i>	B16	*	B25	<i>Pantoea</i>	B34	<i>Pantoea</i>
B6	<i>Pantoea</i>	B17	<i>Erwinia</i>	B26	<i>Pantoea/Erwinia</i>	B35	<i>Pantoea</i>
B7	<i>Pantoea</i>	B18	<i>Pantoea</i>	B27	<i>Pantoea/Erwinia</i>	B36	<i>Pantoea</i>
B8	<i>Pantoea</i>	B19	*	B28	*	B37	<i>Pantoea</i>
B9	<i>Pantoea</i>	B20	<i>Coryneformes</i>	B29	<i>Pantoea</i>	B38	<i>Pantoea</i>

CAPÍTULO III

RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL FRUTO DE AGUACATE (*Persea americana* MILLER var. *hass*) A LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS

RESUMEN

México es el país con mayor producción de aguacate en el mundo, sin embargo, su rendimiento lo posiciona en cuarto lugar. Este rendimiento, puede atribuirse a enfermedades causadas por agentes bióticos. Entre las enfermedades más importantes destaca la abscisión del fruto, la cual ocasiona pérdidas en la producción. Se le encuentra asociado un conjunto de factores donde destacan las bacterias; se asume su participación cuando se presenta una lesión en la cubierta seminal de la semilla; la entrada de las bacterias a su hospedero es vía aberturas naturales o heridas, se supone de una asociación endófitas. Las bacterias patógenas pueden residir de manera endófitas siempre y cuando exista un equilibrio entre la bacteria y su hospedero, sin embargo, algún factor que modifique este equilibrio puede activar la patogenicidad y virulencia de la bacteria. Debido a la importancia de la enfermedad en el cultivo del aguacate y a la presencia de bacterias en la cubierta seminal, en el presente estudio de investigación se planteó como objetivo determinar la patogenicidad de bacterias endófitas sobre los frutos de aguacate. Como fuente de inóculo se utilizaron un total de 28 cepas bacterianas, previamente aisladas de frutos de aguacates asintomáticos y sintomáticos de abscisión e identificadas mediante pruebas fenotípicas y moleculares dentro de los géneros *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus*; las variables evaluadas fueron virulencia y severidad. El 100 % de las cepas bacterianas fueron capaces de producir la sintomatología típica de la abscisión del fruto de aguacate, las más virulentas fueron las cepas bacterianas pertenecientes al género *Pantoea*; aunque las cepas bacterianas identificadas como *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Enterobacter* también presentaron virulencia en menor incidencia. Por lo anterior, se concluye que las bacterias endófitas aisladas de la cubierta seminal del aguacate son las causantes de la abscisión del fruto.

Palabras clave: cubierta seminal, cepas, inoculación, virulencia y severidad.

ABSTRACT

Mexico is the country with the largest avocado production in the world, yet its yield positions it in fourth place. This performance can be attributed to diseases caused by biotic agents. Among the most important diseases highlights the fruit abscission, which causes production losses. It is found associated set of factors which include bacteria; participation is assumed when an injury occurs in the seed coat of the seed; the entry of bacteria to the host is through natural openings or wounds, presumably an endophyte association. Pathogenic bacteria may reside in endophytic manner as there is always a balance between bacteria and their host, however, a factor that modifies this balance can activate the pathogenicity and virulence of the bacterium. Because of the importance of the disease in the cultivation of avocado and the presence of bacteria in the seed coat, in this research study it raised aims to determine the pathogenicity of endophytic bacteria on the fruits of avocado. As a source of inoculum a total of 28 bacterial strains were used, previously isolated from asymptomatic and symptomatic fruit abscission and avocados identified by phenotypic and molecular tests within the genera *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* and *Bacillus*; the variables were virulence and severity. 100% of the bacterial strains were able to produce the typical symptoms of fruit abscission avocado, were the most virulent bacterial strains belonging to the genus *Pantoea*; although bacterial strains identified as *Bacillus*, *Acinetobacter* and *Enterobacter* also had lower incidence virulence. Therefore, it is concluded that the endophytic bacteria isolated from the seed coat avocado are the cause of fruit abscission.

Key words: seminal coat, strains, inoculation, virulence and severity.

INTRODUCCIÓN

Actualmente México es el país con mayor producción de aguacate (*Persea americana* Mill) en el mundo, sin embargo, su rendimiento por unidad de superficie (10.17 t ha^{-1}) no es el mejor, ya que este lo posiciona en el cuarto lugar (FAOSTAT, 2015). Este rendimiento bajo puede atribuirse a factores climáticos los cuales están determinados por la zona de establecimiento de los huertos (Gazit y Degani, 2007) o a enfermedades causadas por agentes bióticos, las cuales llegan a afectar hasta el 40 % de la producción (Morales y Vidales, 1994).

Es difícil establecer qué enfermedades del cultivo son las más importantes; sin duda, el anillamiento del pedúnculo como regionalmente se conoce se encuentra en este grupo ya que ocasiona pérdidas de hasta un 45 % en la producción (Cosío-Vargas *et al.*, 2008). Es una abscisión temprana del fruto, que se presenta en mayor porcentaje en los primeros estados de desarrollo del mismo (Coit, 1928). El síntoma característico es la formación de un anillo café rojizo alrededor del pedúnculo y cerca del lugar de la unión con el fruto, con una zona seca y descortezada (en ocasiones); algunas veces el anillo es superficial y el fruto se retiene hasta la madurez (Campos, 1984; Fucikovsky, 1970). A pesar de la pérdida económica que implica este problema, no se conoce con certeza el agente causal, ya que se le ha asociado a un conjunto de factores abióticos (Haas, 1936; Toerien, 1979; Morales y Vidales, 1994; Ochoa, 2000; Salazar-García *et al.*, 2006) y bióticos (Coit, 1928; Martínez y Domínguez, 1974; Ochoa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005). De los factores bióticos destacan las bacterias, las cuales, se asume su participación cuando existe una pudrición de la testa de la semilla de donde han sido aisladas (Ochoa *et al.*, 2001).

Lo anterior, sugiere que estas bacterias tienen una asociación endófitas ya que la infección se presenta sólo en esa región (Morales y Vidales, 1994). La entrada de las bacterias al tejido de la planta es a través de heridas o aberturas naturales (hidátodos, lenticelas, nectarinos), esto va a depender de las particularidades del

patógeno y la naturaleza de la enfermedad (Sigeo, 2005). La colonización exitosa sobre el hospedero, depende de su capacidad para desarrollar mecanismos de supervivencia, mediante la adquisición y desarrollo de nuevos genes los cuales promueven la rápida invasión del tejido (Sigeo, 2005; Kado, 2009). La habilidad de la bacteria de causar una enfermedad sobre el hospedero depende de aspectos ambientales, fisiología de la planta (estado nutricional, fotoperiodo, estado de madurez y desarrollo) y de la expresión de la patogenicidad y virulencia por parte de la célula bacteriana (Sigeo, 2005). La virulencia se lleva a cabo mediante la producción de toxinas, enzimas extracelulares y polisacáridos extracelulares. Las toxinas son productos de su metabolismo secundario y tienen un amplio rango de efectos fisiológicos sobre la planta hospedera, causan síntomas como clorosis, necrosis, crecimientos anormales y manchas. Las enzimas extracelulares pueden ser consideradas en tres grupos mayores: enzimas pectolíticas, celulíticas y proteasas; debido a que las células vegetales constan de celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas, éstas son susceptibles a la digestión por parte de las enzimas. Mientras que los polisacáridos extracelulares, se encargan de inducir y mantener las heridas húmedas, prevenir el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, cambiar la utilización de carbohidratos y la restricción del movimiento del agua (Sigeo, 2005).

Cuando una bacteria patógena reside en equilibrio con el tejido del hospedero, y ocasiona poco o nada de daño a las células circundantes a ella. La interacción patogénica se modifica hacia una interrelación benéfica endofítica y la planta acoge al patógeno y permanece asintomática; dado que la dirección de la patogénesis es para el bien del mismo patógeno, una muerte rápida del hospedero no es lo más deseable para su larga supervivencia. Sin embargo, dichas plantas pueden mostrar síntomas cuando exista un cambio en el equilibrio, ya sea un cambio significativo de temperatura, humedad o cuando la planta es modificada genéticamente para propósitos hortícolas; cuando esto sucede, se desencadena la expresión de los síntomas o puede provocar efectos inusuales que no sean precisamente perjudiciales para la planta pero económicamente indeseables (Kado, 2010).

Como requerimiento básico, la patogenicidad de una bacteria aislada de una enfermedad vegetal, tiene que ser probada en todos los pasos de los postulados de Koch y éstos deben cumplirse, para ello, los aislamientos bacterianos puros deben ser inoculados sobre sus hospederos naturales para verificar su capacidad patogénica (Narayanasmay, 2011). Los postulados de Koch se plantearon para tener una evidencia experimental antes de asignar como agente responsable a algún patógeno en particular (Sigee, 2005) y consisten en:

- El organismo debe de estar constantemente asociado con el tejido enfermo.
- El organismo debe de ser aislado y crecido en un cultivo puro, sin otro organismo presente.
- El organismo cultivado debe de ser inoculado dentro de una planta sana de la misma especie de donde fue aislado originalmente y debe de producir la misma enfermedad como originalmente se observó.
- El organismo debe ser reaislado.

Estudios preliminares (Martínez y Domínguez, 1974; Ochoa *et al.*, 2001; Cervantes *et al.*, 2012) realizados para determinar la capacidad patogénica de los aislados bacterianos asociados a la abscisión del fruto del aguacate muestran variación en la forma de inoculación, mediante aspersion e inyección de solución bacteriana, con los mejores resultados en la replicación de síntomas con la segunda técnica. Por todo lo anterior, el objetivo planteado en la presente investigación es determinar la patogenicidad de bacterias endófitas aisladas de la testa de la semilla del fruto de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento. El presente estudio se desarrolló en un huerto localizado en la localidad de Caltzontzin perteneciente al municipio de Uruapan, en el estado de Michoacán; ubicado en las coordenadas 19° 43' Latitud Norte y 102° 00' Longitud Oeste.

La preparación de las soluciones bacterianas se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez".

Material biológico. Para la realización del presente estudio se utilizaron un total de 28 cepas bacterianas puras, aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate *hass* colectados en huertos ubicados en la parte central de la franja aguacatera del estado de Michoacán, México. Estas cepas se caracterizaron (Cuadro 1A) en estudios previos con base a criterios morfológicos, bioquímicos y técnicas moleculares. Las cepas bacterianas se reactivaron en medio nutritivo PDA, bajo condiciones estériles; éstas se incubaron 36 h a temperatura ambiente (24 ± 1 °C) para posteriormente utilizarlas como fuentes de inóculo.

Establecimiento del experimento. Se seleccionaron árboles de aguacate *hass* con características homogéneas en edad, tamaño y etapa fenológica; de los cuales, se seleccionaron al azar frutos tiernos de aproximadamente siete meses de edad provenientes de la floración "normal" (noviembre-diciembre). Para la inoculación de cada una de las cepas bacterianas evaluadas se eligieron ocho frutos, éstos se desinfestaron *in situ* previo a la inoculación con una solución de hipoclorito de sodio (2 %) seguido de un enjuague con agua destilada y secado con sanitas, ambos materiales esterilizados.

Técnica de inoculación en frutos. Como fuente de inóculo se utilizó una solución bacteriana en concentración de 1.5×10^8 con base en la escala de McFarland (Ortíz, 2005), preparada bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Para la inoculación de los frutos se empleó la técnica usada por Martínez

y Domínguez (1974) y Cervantes *et al.* (2012) con adecuaciones. La cual consistió en una perforación al fruto de manera longitudinal hasta la zona de la semilla con ayuda de un palillo de madera (previamente esterilizado); posteriormente se realizó la inoculación con una jeringa hipodérmica de 10 cc, inyectándose a cada fruto 0.25 mL de la solución bacteriana, en la zona de la semilla; tras la inoculación, la perforación fue sellada con vaselina estéril, ya sellados los frutos, fueron marcados con el número de cepa inoculada y repetición correspondiente; se realizaron ocho repeticiones por cepa bacteriana, cuatro repeticiones en condiciones ambientales y cuatro bajo condiciones de cámara húmeda, en estas últimas se utilizaron bolsas de polietileno previamente humedecidas. Además, ocho frutos se consideraron como testigo, los cuales se inocularon con agua destilada estéril en la misma cantidad antes señalada. Lo anterior se puede observar en la Figura 1.

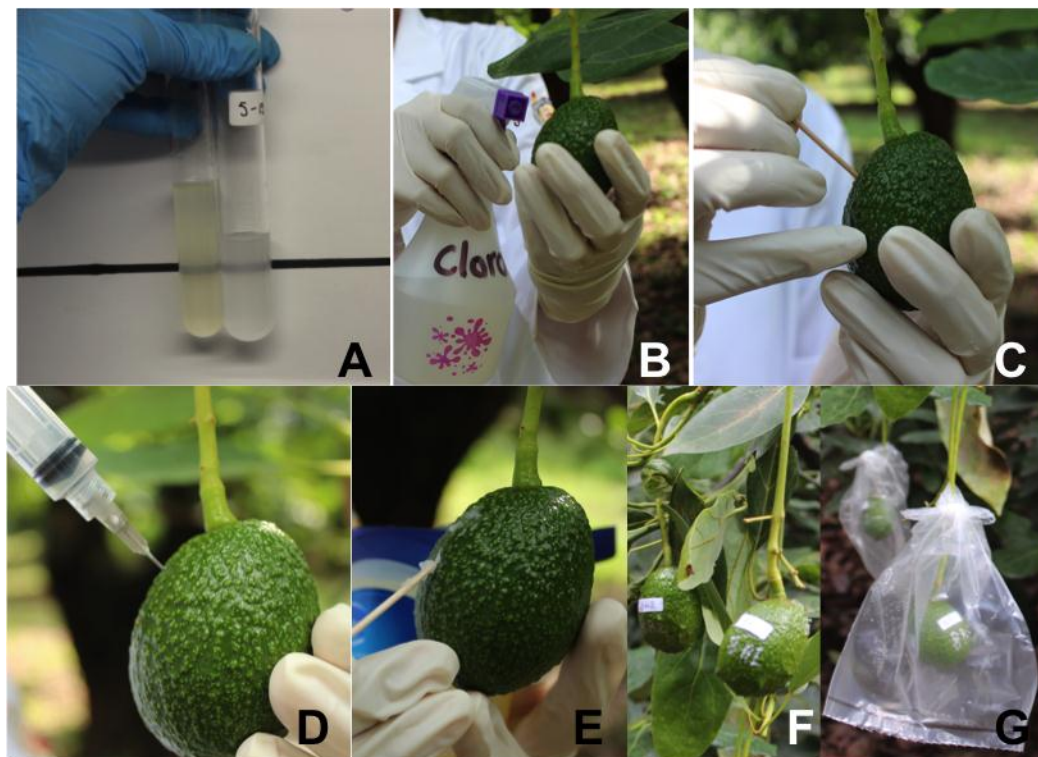


Figura 1. Inoculación *in situ* de bacterias aisladas de la cubierta seminal de frutos de aguacate. A) solución bacteriana, B) desinfección, C) perforación, D) inoculación, E) sellado, F y G) condición de incubación.

Evaluación de la patogenicidad. Los frutos inoculados se observaron cada 24 horas con la finalidad de tener un registro de la sintomatología expresada. Las variables evaluadas fueron: virulencia medida con base al número de días de la aparición de síntomas (T_{as}) y severidad determinada mediante cambios en las características internas (S_i) y externas (S_e) del fruto. Para la severidad se establecieron escalas arbitrarias, las cuales se presentan en las Figuras 2 y 3.

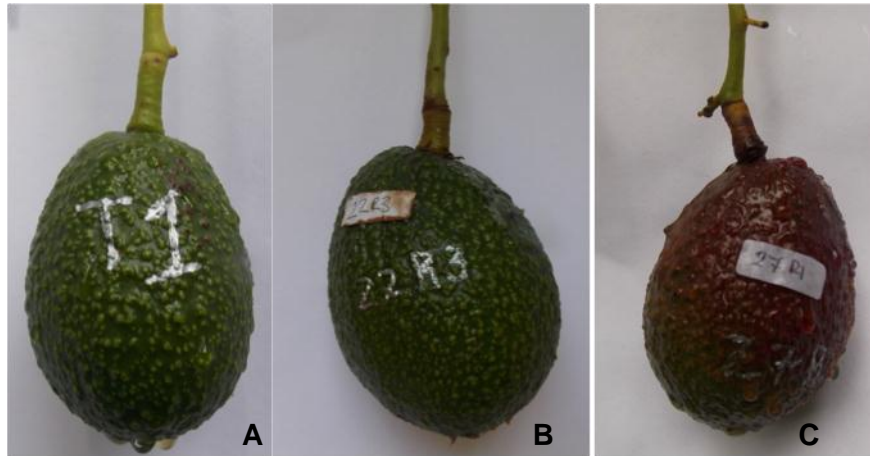


Figura 2. Escala para la sintomatología externa (S_e) de abscisión del fruto de aguacate. A) sin lesión, B) anillamiento en el pedúnculo sin cambio en la epidermis y C) anillamiento en el pedúnculo con cambio de coloración en la epidermis.

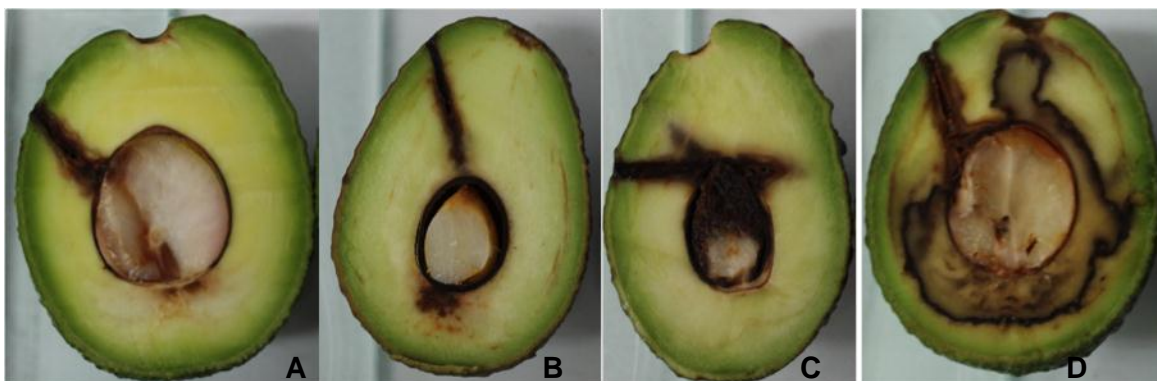


Figura 3. Escala de la sintomatología interna de abscisión del fruto de aguacate. A) sin lesión, B) lesión de la testa, C) lesión en semilla y testa y D) lesión en más del 50 % del fruto.

Reaislamiento del patógeno. Con el fin de cumplir con los postulados de Koch (Sigeo, 2005), de los frutos inoculados, se realizaron cortes de tejido dañado de la semilla, testa y mesocarpio circundante a ésta y se sembraron en medio de cultivo PDA bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar para hacer los aislamientos de bacterias y comparar morfológicamente con las cepas bacterianas inoculadas.

Análisis de la información. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza, considerando como tratamientos las diferentes cepas bacterianas (28) y un tratamiento control (agua destilada), con ocho repeticiones para cada tratamiento. La comparación de medias se hizo empleando la prueba de Tukey ($p=f \leq 0.05$), ambos análisis se hicieron con la ayuda del paquete computacional de estadísticas SAS v9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Patogenicidad de las cepas. El 100 % de las cepas bacterianas inoculadas indujeron la sintomatología típica de la abscisión del fruto de aguacate, los cuales son una coloración roja-violácea del pericarpio del fruto y la formación de un anillo en el pedúnculo a una altura de 1-2 cm de la base del fruto; esta sintomatología obtenida coincide con la descrita por Fucikovsky (1970) y Campos (1984). Tres de los frutos inoculados con agua destilada estéril (testigo) presentaron esta sintomatología; sin embargo, es importante destacar que algunas de las cepas bacterianas inoculadas (B3, B22, B31) fueron aisladas de frutos asintomáticos, por lo cual, se infiere que con la inoculación de agua y el estrés producido por la perforación provocó el desarrollo de bacterias endófitas ya presentes en estos frutos como lo señala Misaghi y Donndelinger (1990).

Virulencia de las cepas. El T_{as} (tiempo de aparición de los síntomas) que presentaron los frutos por efecto de las cepas inoculadas presentó diferencia

estadística ($p > f = 0.0001$) entre estas, Tukey $\alpha = 0.05$. El T_{as} varió de 9.6 a 36.3 días, estos resultados indican diferencias con los presentados por Martínez y Domínguez (1974) los que señalan que no presentaron T_{as} menores de 21 días; así mismo Cervantes *et al.* (2012) obtuvieron T_{as} menores (6 días) de los valores obtenidos en este estudio. Estos resultados pueden observarse en la Figura 4, donde se notan grupos estadísticos similares, ya que, al menos una de las cepas ($T4=B4$) comparte los grupos extremos. El tratamiento T13 (B19) se comportó igual que el testigo, lo que ratifica su incapacidad patogénica, coincidiendo con las pruebas *in vitro* (hipersensibilidad en tabaco, pudrición de papa y pudrición de zanahoria) realizadas en el Capitolol. Las cepas bacterianas identificadas dentro del género *Pantoea* fueron las que presentaron mayor virulencia al provocar la abscisión de los frutos en menor tiempo (9.6 días), lo que corrobora su patogenicidad.

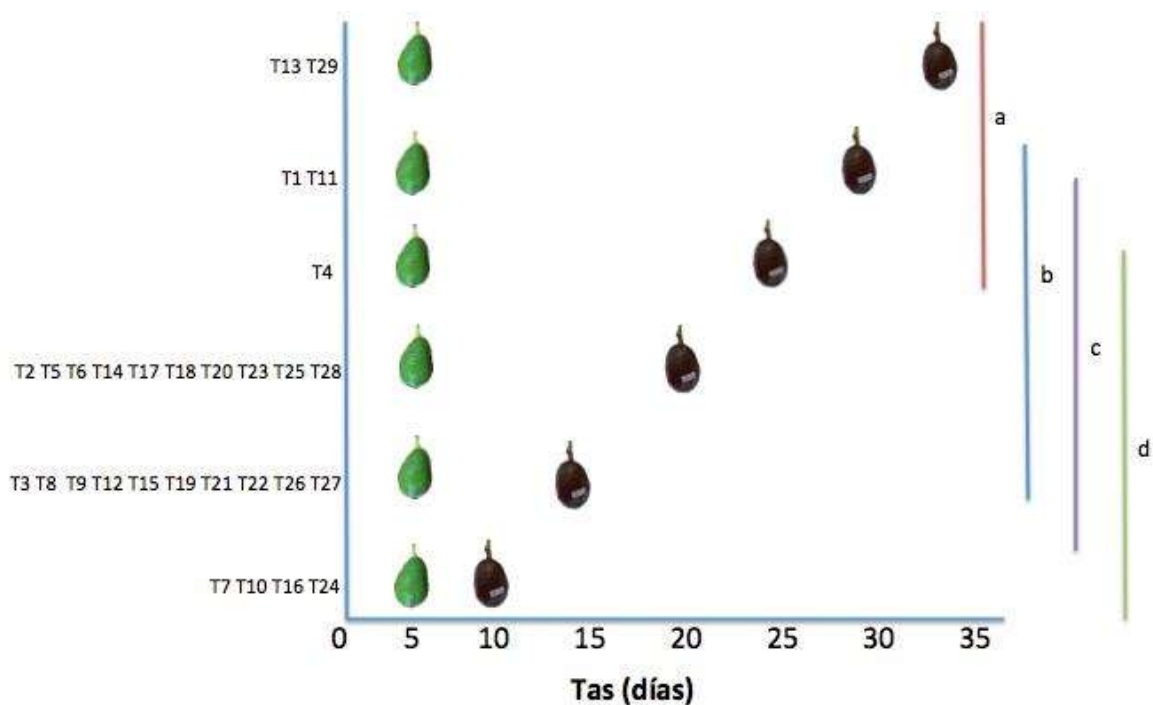


Figura 4. Tiempo de aparición de la lesión (T_{as}) post inoculación (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).

Severidad. La inoculación de los tratamientos (cepas bacterianas) exhibieron variación sintomatológica tanto en el exterior (S_e) como en el interior (S_i) del fruto (Figura 7), lo cual se manifestó también estadísticamente ($p > f = 0.0001$). Con base en la comparación de medias, se formaron cinco grupos, donde el grupo con la menor severidad promedio (0.125 a 1) lo presentaron los tratamientos 11 (B17), 1 (B2), 13 (B19) y 29 (testigo); es importante destacar, que las cepas B17 y B19 no fueron identificadas con las pruebas bioquímicas para bacterias fitopatógenas (Schaad *et al.*, 2001), y la cepa B2 fue previamente identificada molecularmente en el género *Acinetobacter*, sin reporte hasta ahora como fitopatógena en aguacate.

El 86 % de los tratamientos tuvieron valores promedio desde 1.1 a 2, en la escala utilizada para esta variable. El mayor valor de la escala (2) lo presentaron en un porcentaje de 28 % (10 cepas) bacterias con previa identificación como *Pantoea*, aunque de este género en específico no se tienen reportes de su asociación con la sintomatología estudiada en aguacate, aunque anteriormente se clasificó dentro del género *Erwinia*, puede coincidir con los resultados presentados al reportarse este último género por Gudiño (1998) como causante de esta patología. Los resultados descritos se muestran en la Figura 5.

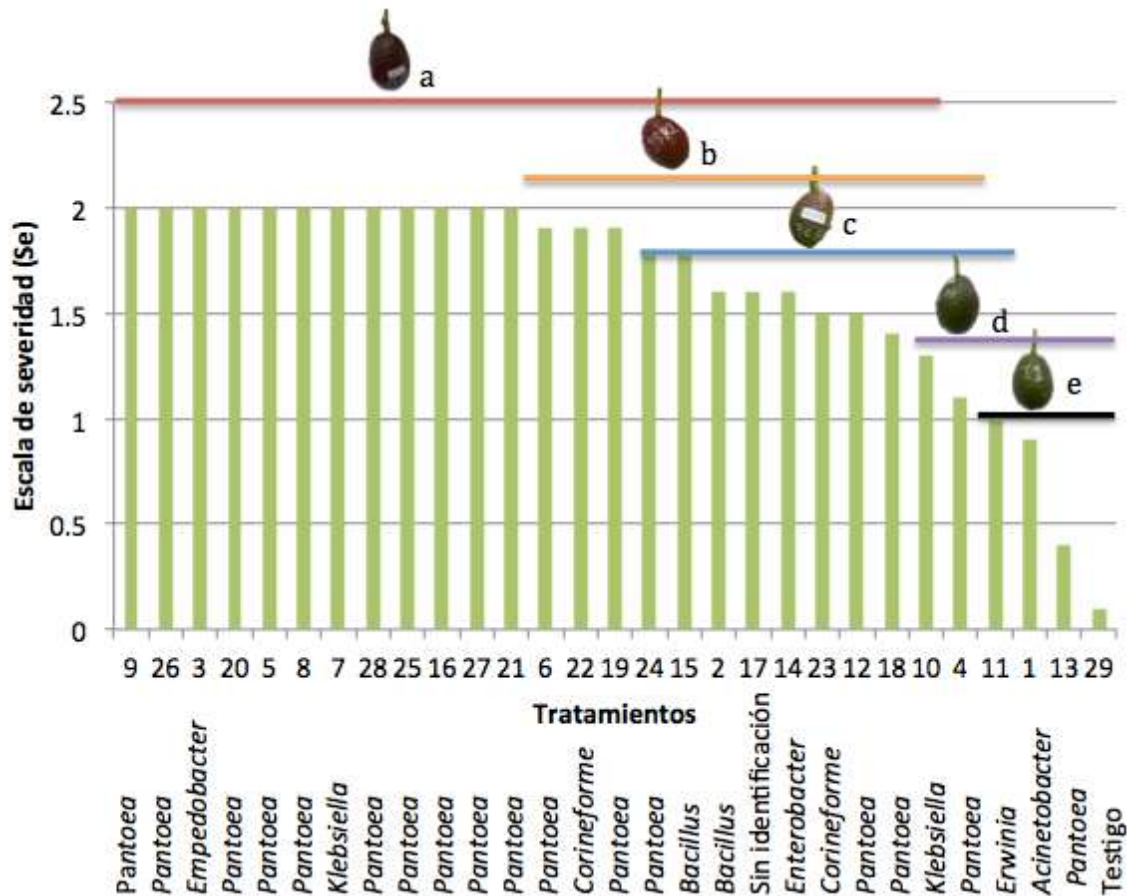


Figura 5. Severidad de la lesión en sintomatología externa del fruto (S_e) (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).

Para el caso de la S_i (síntoma interno) los resultados fueron igualmente variables, lo que muestra nuevamente diferencia significativa ($p > f = 0.0001$) entre los tratamientos utilizados. Esta diferencia fue desde cero en los tratamientos 13 (B19) y 14 (B20), hasta 2 y 3 (mayores valores de la escala), estos valores los presentaron la mayoría (59 %) de los tratamientos, considerados como grupos extremos; al igual que para la S_e (síntoma externo) nuevamente destacan las bacterias identificadas en el género *Pantoea* como las que causaron el mayor valor de lesiones, con base en la escala utilizada. Lo anterior puede observarse en la Figura 6.

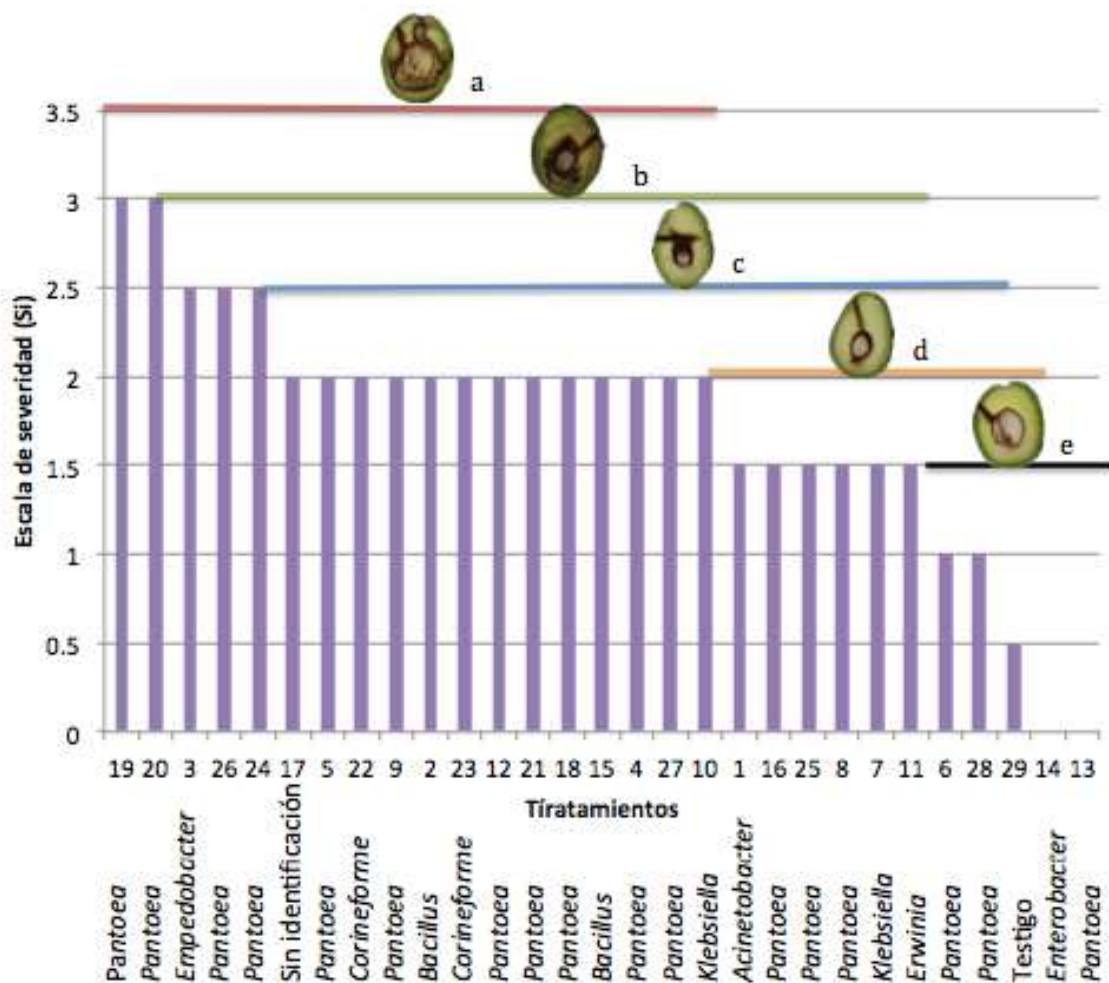


Figura 6. Severidad de la lesión en sintomatología interna del fruto (S_i) (valores con la misma letra no son significativamente diferentes) ($p > f = 0.0001$).

En la Figura 7 se presenta la sintomatología interna y externa observada en el fruto post inoculación, en donde es evidente la variación señalada de la capacidad de las cepas bacterianas para manifestar la abscisión del fruto de aguacate. Estos datos de severidad de la lesión (S_e y S_i), no pueden ser discutidos debido a que en la literatura revisada, no existen reportes de esta variable.

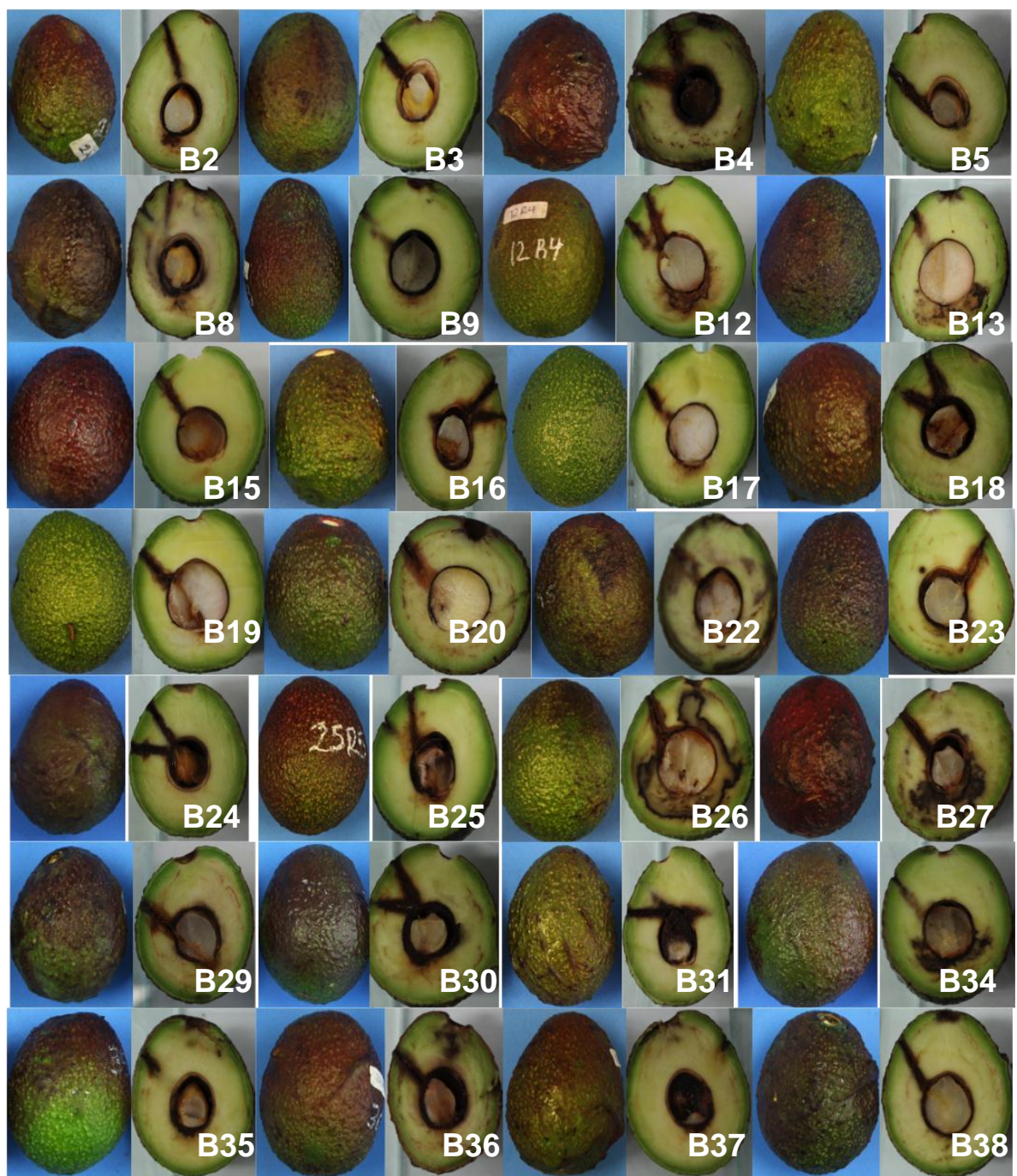


Figura 7. Severidad mostrada en la parte externa e interna del fruto, post inoculación de las cepas bacterias aisladas de la patología abscción del fruto de aguacate.

CONCLUSIONES

Bacterias endófitas aisladas de la cubierta seminal del fruto de aguacate, identificadas molecularmente en los géneros *Pantoea*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, indujeron la abscisión en el fruto.

Cepas bacterianas identificadas dentro del género *Pantoea* (B8, B9, B13, B15, B18, B23, B26, B27, B29, B34, B35, B36, B37, B38) fueron las más virulentas.

LITERATURA CITADA

Campos A. J. (1984) Principales enfermedades del aguacatero. *In: IV Congreso Nacional. Asociación de Egresados de la Facultad de Agrobiología (ANEFA). Memoria Simposium sobre cultivo, producción y comercialización del aguacate. Uruapan, Michoacán, México. pp:69-93.*

Cervantes, C. E. A., A. H. Guillén, S. M. E. Pedraza y C. M. Gutiérrez (2012) Sensibilidad a antibióticos in vitro de bacterias asociadas al anillamiento del pedúnculo del aguacate. *In: XIV Congreso Internacional y XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología. Nayarit, México. pp:91-92.*

Coit J. E. (1928) Pests and diseases of the avocado. California Avocado Growers Association Yearbook. 18-21

Cossio-Vargas L. E., S. Salazar-García, I. J. González-Durán y R. Medina-Torres (2008) Fenología del aguacate 'Hass' en el clima semicálido de Nayarit, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura. 14: 319-324.*

Cruz M. J., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, C. M. Gutiérrez, P. S. Aguirre, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005) Control del anillamiento del aguacate con productos biodegradables. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Notas Científicas. Facultad*

de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán, México. pp: 77-84.

FAOSTAT (2015) <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> (Accesada en Agosto 2015).

Fucikovsky L. (1970) Enfermedades del aguacate en el Estado de México. S.A.G. Dirección General de Agricultura.

Gazit S. y C. Degani (2007) Biología reproductiva. *In: El palto. Botánica, producción y usos.* A. W. Wiley, B. Schaffer y B. N. Wolstenholme. Ediciones Universitarias de Valparaiso. pp:131-144.

Gudiño J. J. L. (1998) Efecto de 8 niveles de fertilización para reducir el anillamiento del pedúnculo del fruto; aislamiento de fitopatógenos y patogenicidad, para aguacate Persea americana Mill CV 'Hass' en Tingambato, Mich. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" U.M.S.N.H. Uruapan, Michoacán, México.98 p.

Haas A. R. C. (1936) Chlorine in relation to ring-neck in avocado fruits. *California Avocado Association Yearbook* 21:60-62.

Kado C. I. (2009) Horizontal gene transfer: Sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology* 10:143-150.

Kado C. I. (2010) Plant Bacteriology. APS Press. E.U.A. 336 p.

Martínez B. R. y C. J. M. Domínguez (1974) Identificación del agente causal del anillamiento del pedúnculo del aguacate en la región de Uruapan, Mich. *In: Simposio Nacional de Fitopatología Agrícola.* Mazatlán, Sinaloa. Noviembre de 1974. pp:72.

Morales G. J. L. y F. J. A. Vidales (1994) Enfermedades del aguacate en Michoacán. Folleto para productores N° 24. SARH-INIFAP-CIPAC. Uruapan, Michoacán, México. 19 p.

Misaghi I. J. and C. R. Donndelinger (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80:808-811.

- Narayanasamy P. (2011)** Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens Vol.2. Springer Science Business Media B. V. New York. 256 p.
- Ochoa A. S. (2000)** Anillamiento del pedúnculo, patógenos varios. *In: Enfermedades del aguacatero en el estado de Michoacán, México. Memorias del III Seminario Taller sobre aguacate, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Uruapan Michoacán, México. pp:26-35.*
- Ochoa A. S., M. J. Campos y G. R. Mendoza (2001)** Identificación de bacterias asociadas en el anillamiento del Pedúnculo del Aguacatero. *In: Memorias del Primer Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Uruapan, Michoacán, México. pp:198-199.*
- Ortíz J. H. (2005)** Prueba de difusión por disco. *In: Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. M. B. Coyle. American Society for Microbiology. pp: 39-52*
- Salazar-García S., L. E. Cossio-Vargas, I. J. L. González-Durán, R. Medina-Torres y C. J. Lovatt (2006)** Efecto de aspersiones con biorreguladores vegetales sobre la intensidad de la "caída de fruto de junio", rendimiento y tamaño de fruto en aguacate 'Hass'. Congreso de Ciencia y Tecnología Nayarit 2006. Tepic, Nayarit. 17-19 Mayo. pp:1-10.
- Schaad N. W., J. B. Jones and W. Chun (2001)** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3^a ed. APS PRESS. Minnesota, E.U.A. 373 p.
- Sigee D. C. (2005)** Bacterial plant pathology, cell and molecular aspects. Cambridge University Press. 325 p.
- Toerien J. C. (1979)** Seasonal incidence of ring-neck on avocados and posible causes. *South Africa Avocado Grower's Association Research Report* 3:49-51
- Tovar R. J. C., C. B. N. Lara, H. Guillén-Andrade, P. E. Ángel, F. A. Vidales y G. L. Morales (2005)** Efecto del fertirriego sobre la incidencia del anillamiento del pedúnculo del fruto del aguacate. *In: Memoria del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Notas Científicas. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán, México. pp:85-92.*

APÉNDICE

Cuadro 1A. Caracterización de las cepas bacterianas aisladas de la cubierta seminal del fruto de aguacate y su respuesta a pruebas fenotípicas de patogenicidad.

Tratamiento	Clave de la cepa bacteriana	Identificación Morfológica	Identificación Molecular	Tabaco	Pudrición en papa	Pudrición en zanahoria
T1	B2	-	<i>Acinetobacter</i>	-	+	-
T2	B3	<i>Corineforme</i>	<i>Bacillus</i>	-	+	-
T3	B4	-	<i>Empedobacter</i>	-	-	-
T4	B5	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	-	+	-
T5	B8	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	-	+	+
T6	B9	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	-	-	-
T7	B12	<i>Pantoea</i>	<i>Klebsiella</i>	-	-	-
T8	B13	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	-	-	+
T9	B15	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	-	-	-
T10	B16	-	<i>Klebsiella</i>	-	+	-
T11	B17	<i>Erwinia</i>	-	-	+	-
T12	B18	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	+	-	-
T13	B19	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T14	B20	-	<i>Enterobacter</i>	-	-	-
T15	B22	<i>Corineforme</i>	<i>Bacillus</i>	+	+	+
T16	B23	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i>	+	-	-
T17	B24	-	-	-	-	-
T18	B25	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T19	B26	<i>Pantoea</i> o <i>erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	+	-	-

T20	B27	<i>Pantoea o erwinia</i>	-	-	-	+
T21	B29	<i>Pantoea</i>	-	-	+	-
T22	B30	<i>Corineforme</i>	-	-	+	-
T23	B31	<i>Corineforme</i>	-	-	-	+
T24	B34	<i>Pantoea</i>	-	+	-	-
T25	B35	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T26	B36	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T27	B37	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T28	B38	<i>Pantoea</i>	-	-	-	-
T29	Testigo	Agua	-	-	-	-

CONCLUSIONES GENERALES

- I. En la cubierta seminal de frutos de aguacate hass con y sin síntomas de abscisión, existe la presencia de bacterias con asociación endofítica.
- II. Se logró identificar mediante pruebas fenotípicas y moleculares a bacterias de los géneros *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus* asociadas a la patología abscisión del fruto de aguacate, así como en frutos sanos.
- III. Las bacterias endófitas *Pantoea*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Empedobacter*, *Enterobacter* y *Bacillus* encontradas en la cubierta seminal del fruto de aguacate, sin previos reportes de patogenicidad en los mismos, lograron producir la abscisión temprana de frutos.