



**Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo**  
**Instituto de Investigaciones  
Químico Biológicas**



**“El antagonismo de rizobacterias y su  
potencial para controlar los  
microorganismos causantes de la  
pudrición peduncular del fruto de  
aguacate (*Persea americana* Mill.)”**

Tesis que presenta:

**Q.F.B. Alistair Hernández Izquierdo**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

Asesor:

**D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco**

Co-asesor:

**D.C. José López Bucio**

**Morelia, Michoacán, junio 2021**

# Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. Aguacate: el fruto del árbol <i>Persea americana</i> Mill.....	5
2.1.1. Importancia del aguacate en México .....	6
2.1.2. El fruto de aguacate en post-cosecha.....	7
2.2. Enfermedades presentes en el aguacate en post-cosecha .....	8
2.2.1. Pudrición peduncular del aguacate.....	9
2.2.2. Agentes etiológicos de la pudrición peduncular del aguacate .....	11
2.3. Tratamientos de la pudrición peduncular de aguacate .....	12
2.3.1. Compuestos químicos en la agricultura .....	13
2.3.2. Efectos de los fungicidas en la salud humana y el medio ambiente..	13
2.3.3. Resistencia de los patógenos a los fungicidas.....	14
2.4. Interacción microbiológica célula-célula: antagonismo .....	15
2.4.1. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico.....	17
2.4.1.1. La Antibiosis .....	18
2.4.1.2. Compuestos orgánicos volátiles .....	19
2.4.1.3. Compuestos difusibles .....	20
2.5. Bacterias extremófilas .....	20
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivo general .....	22
5.1. Objetivos particulares.....	22
6. Materiales y métodos.....	23
6.1. Hongos de la pudrición peduncular de aguacate.....	23
6.2. Aislados bacterianos rizosféricos .....	25
6.3. Curvas de crecimiento de aislados bacterianos rizosféricos.....	28
6.4. Elección de las condiciones para la interacción bacteria-hongo.....	28
6.5. Caracterización morfológica de aislados bacterianos.....	29

6.6. Escrutinio antagónico de bacterias frente a hongos de la pudrición peduncular del aguacate .....	29
6.7. Interacción <i>in vitro</i> 1 a 1 de prospectos de agentes de control biológico bacterianos frente a hongos de la pudrición peduncular del aguacate.....	30
6.8. Evaluación del antagonismo <i>in vitro</i> por compuestos orgánicos volátiles de rizobacterias frente a hongos de la pudrición peduncular de aguacate.....	31
6.9. Análisis estadístico.....	32
7. Resultados.....	33
7.1. Curso temporal del crecimiento de aislados bacterianos rizosféricos .....	33
7.2. Condiciones óptimas en la interacción bacteria-hongo.....	34
7.3. La morfología colonial y microscópica de los posibles antagonistas bacterianos rizosféricos .....	36
7.4. La búsqueda de candidatos bacterianos que antagonicen a hongos de la pudrición peduncular de aguacate .....	38
7.5. Los prospectos de agentes de control biológico bacterianos antagonizan a hongos de la pudrición peduncular de aguacate.....	39
7.6. Los compuestos orgánicos volátiles de los agentes de control biológico bacterianos inhiben el crecimiento de hongos de la pudrición peduncular del aguacate .....	44
8. Discusión .....	48
9. Conclusión.....	53
10. Literatura citada .....	54
11. Apéndice .....	62

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Árbol de aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill.).....	5
<b>Figura 2.</b> Características, usos y propiedades farmacológicas del aguacate.....	6
<b>Figura 3.</b> Producción nacional de aguacate en porcentaje (%).....	7
<b>Figura 4.</b> Aguacates con pudrición peduncular (PPA).....	10
<b>Figura 5.</b> Imágenes de cultivos de diferentes agentes etiológicos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA).....	11
<b>Figura 6.</b> Interacción del metaboloma bacteriano antifúngico (MBA) de bacterias rizosféricas frente a microorganismos patógenos.....	16
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB) en la inhibición de patógenos.....	18
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de efectos directos (promoción del crecimiento vegetal) e indirectos (antagonismo) que exhiben bacterias rizosféricas frente a fitopatógenos.....	19
<b>Figura 9.</b> Esquema de las características principales de las bacterias extremófilas.....	21
<b>Figura 10.</b> Frutos de aguacate ( <i>Persea americana</i> Mill. var. Hass) con signos de pudrición peduncular (PPA).....	23
<b>Figura 11.</b> Crecimiento en placa de los hongos de la pudrición peduncular del aguacate (PPA) ensayados en este proyecto.....	25
<b>Figura 12.</b> Prospección microbiana en el desierto de Chihuahua.....	26
<b>Figura 13.</b> Crecimiento en placa de cultivos bacterianos rizosféricos (n=16) ensayados en este proyecto.....	27
<b>Figura 14.</b> Guía para la inoculación de la interacción bacteria-hongo.....	30
<b>Figura 15.</b> Curso de crecimiento temporal de rizobacterias en medios de crecimiento líquido.....	33
<b>Figura 16.</b> Imágenes representativas de la evaluación del crecimiento de crecimiento de hongos (Ol, Dp5185 y Cg) y bacterias (B-1 a B-14) en diferentes medios sólidos de crecimiento (MH, APD, ADS y APD:ADS).....	35
<b>Figura 17.</b> Morfología colonial y microscópica de bacterias rizosféricas.....	37
<b>Figura 18.</b> Determinación de los prospectos de ACB bacterianos por un ensayo <i>in vitro</i> de bacterias frente a los hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA).....	39

<b>Figura 19.</b> Inhibición del crecimiento de hongos de la PPA por acción del metaboloma extracelular de bacterias antagónicas.....	41
<b>Figura 20.</b> Efecto antagónico diferencial de los prospectos de agentes de control biológico (ACB) bacterianos.....	43
<b>Figura 21.</b> Control en el crecimiento fúngico por compuestos orgánicos volátiles (COVs) bacterianos. Las inhibiciones de los hongos se registraron a los 4 d post-inoculación.....	46

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Enfermedades fúngicas más frecuentes que se presentan en el fruto de aguacate y sus tratamientos.....	10
<b>Tabla 2.</b> Sensibilidad de los hongos pudrición peduncular de aguacate (PPA) a fungicidas convencionales representado como el índice de crecimiento (IC) fúngico.....	15
<b>Tabla 3.</b> Listado de los aislados de hongos de la PPA ensayados en este proyecto.....	24
<b>Tabla 4.</b> Listado de los aislados bacterianos rizosféricos ensayados en este proyecto.....	26
<b>Tabla 5.</b> Elección de las condiciones de interacción microbiana: sustrato y temperatura.....	35
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación del crecimiento de hongos de la pudrición peduncular del aguacate (PPA) en placa.....	36
<b>Tabla 7.</b> Características morfológicas en el crecimiento de cultivos bacterianos rizosféricos.....	37
<b>Tabla 8.</b> Sensibilidad del crecimiento fúngico en interacción bacteriana representada con el índice de crecimiento (IC) de hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA).....	43
<b>Tabla 9.</b> Sensibilidad del crecimiento fúngico en interacción por compuestos orgánicos volátiles (COVs) de bacterias antagónicas representada como el índice de crecimiento (IC) de hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA).....	45

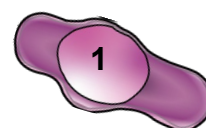
# “El antagonismo de rizobacterias y su potencial para controlar los microorganismos causantes de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill.)”

## Resumen

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un fruto socioeconómicamente importante para México, ya que ocupa el primer lugar a nivel internacional en su producción y exportación. En post-cosecha, puede ocurrir una merma del fruto de hasta un 40% debido a daños físicos, fisiológicos y biológicos, principalmente por microorganismos patógenos, dentro de las cuales destacan los hongos que provocan la pudrición peduncular del aguacate (PPA) y que son muy resistentes a tratamientos químicos. Por lo anteriormente expuesto, en este proyecto se propone una alternativa de origen biológico, que consiste en el uso de bacterias aisladas de la raíz de plantas del desierto de Chihuahua que son inocuas para el ser humano y el medio ambiente y podrían ser utilizadas como agentes de control biológico (ACB). Los resultados muestran que cuatro bacterias inhiben el crecimiento *in vitro* de 11 hongos relacionados con la PPA, destacándose el antagonismo frente a *Colletotrichum acutatum* 10, un patógeno de alta incidencia en la PPA de aguacate.

Los resultados en conjunto, permiten concluir que el microbioma de la raíz de plantas de un ambiente desértico incluye especies de bacterias con posibilidades de utilización en el control de hongos responsables de la pudrición peduncular del fruto de aguacate a través de la emisión de compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** aguacate, rizobacterias, antagonismo, control, volátiles.



# "The antagonism of rhizobacteria and its potential to control the microorganisms that cause stem-end rot of avocado fruit (*Persea americana* Mill.)"

## Abstract

The avocado (*Persea americana* Mill) is a socio-economically important fruit for Mexico, since it occupies the first place internationally in its production and export. In post-harvest, a reduction of the fruit of up to 40% can occur due to physical, physiological and biological damage, mainly by pathogenic microorganisms, among which the fungi that cause stem-end rot (SER) and that are very resistant to chemical treatments. Due to the above, in this project an alternative of biological origin is proposed, consisting of the use of bacteria isolated from the roots of plants in the Chihuahuan desert that are harmless for humans and the environment and could be used as biological control agents (BCA). The results show that four bacteria inhibit the *in vitro* growth of 11 fungi SER fungi, highlighting the antagonism against *Colletotrichum acutatum* 10, a high incidence pathogen in avocado SER.

The results as a together, allow us to conclude that the microbiome of the plant roots of a desert environment includes species of bacteria with possibilities of use in the control of fungi responsible for the stem-end rot of the avocado fruit through the emission of bioactive compounds.

**Key words:** avocado, rhizobacteria, antagonism, control, volatile.





## 1. Introducción

El estudio de los microorganismos extremófilos y su relación con su entorno ayuda en la comprensión de su sobrevivencia en ambientes hostiles, ya que pueden crecer en condiciones limitantes para otros seres vivos, un ejemplo es la escasa disponibilidad de agua, ya que optimizan su uso y controlan la pérdida de este recurso. Otro ejemplo es la adquisición eficiente de nutrientes como el hierro, azufre y potasio. Las estrategias adoptadas por estos microorganismos para su supervivencia son motivo de diversos estudios y podrían incluir cambios en el metaboloma extracelular, por lo que una meta de esta investigación es la utilización de recursos microbiológicos disponibles a partir de trabajos previos en que se aislaron bacterias rizosféricas de plantas del desierto de Chihuahua (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017). La identificación de la mayor parte de este grupo de microorganismos y su potencial en el control de patógenos son actividades pendientes de realizar.

En una investigación paralela se aislaron hongos relacionados con la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) (PPA). Los cuales exhibieron resistencia a los fungicidas convencionales (Espinoza Madrigal *et al.*, 2021). El aguacate es un fruto socioeconómicamente importante para Michoacán y un aspecto relacionado con la vida en anaquel de los frutos de aguacate que se cosechan es la PPA, por lo cual en este trabajo se explorará la posibilidad de encontrar una bacteria antagonica cuyo metaboloma sea capaz de suprimir a los patógenos relacionados con el decaimiento del fruto. Las alternativas de origen biológico resultan promisorias ante el uso de plaguicidas, ya que la evidencia disponible sugiere la factibilidad de controlar patógenos de cultivos mediante la secreción de sideróforos, antibióticos y diversas enzimas (Sengar y Singh, 2018).

Los microorganismos que inhiben el crecimiento de patógenos se conocen como agentes de control biológico (ACB). Dentro de los cuales, las bacterias de la raíz, (rizobacterias) destacan por su capacidad de sintetizar antibióticos, así como compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Tofazzal Islam *et al.*, 2019). Una mención relevante de los ACB es que deben ser inocuos para el ser humano, animales silvestres o de granja, y amigables con el medio ambiente (Montesinos, 2003).

Los hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Phomopsis* y *Oligoporus* ocasionan la pudrición peduncular del aguacate (PPA). La acción antagonica de bacterias rizosféricas frente a estos hongos ocurre por la producción de sustancias bioactivas, e.g. *Arthrobacter agilis* UMCV2 produce dimetilhexadecilamina, molécula que controla a *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Hypocrea* spp. y

*Fusarium* spp. (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013; Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015). El dimetil disulfuro es un producto de las cepas E25 de *Pseudomonas stutzeri* y CR71 de *Stenotrophomonas maltophilia* el cual reprime el crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea* (Rojas-Solís *et al.*, 2018).

En un ecosistema, los microorganismos que lo componen se comunican mediante metabolitos de origen y naturaleza química diversa que son liberados al entorno. Por su tamaño y estructura pueden clasificarse como volátiles inorgánicos u orgánicos. La comunicación célula-célula determina varias funciones intra y extracelulares mediante un esquema simple de comportamiento y respuesta; estimulación-reacción. Por lo que, la identificación y comprensión de estos sistemas microbianos de comunicación nos ayudarían no solamente a descifrar el proceso de comunicación, también nos da la posibilidad de utilizar estas moléculas para el control de patógenos, muy deseable en la biotecnología agrícola.

En el marco teórico de esta tesis, se describirá la importancia de la pudrición peduncular del aguacate, su relación con la comunicación célula-célula, el tipo de bacterias de interés con potencial para el biocontrol, el impacto de la metabolómica y sus herramientas de investigación y algunos ejemplos de metabolitos con capacidad antifúngica. Asimismo, en esta investigación se establece que una bacteria rizosférica es capaz de controlar el crecimiento fúngico y se plantea la posibilidad de encontrar un metabolito bacteriano capaz de controlar el crecimiento de patógenos fúngicos de la PPA, influyendo sobre la comunicación célula-célula.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Aguacate: el fruto del árbol *Persea americana* Mill.

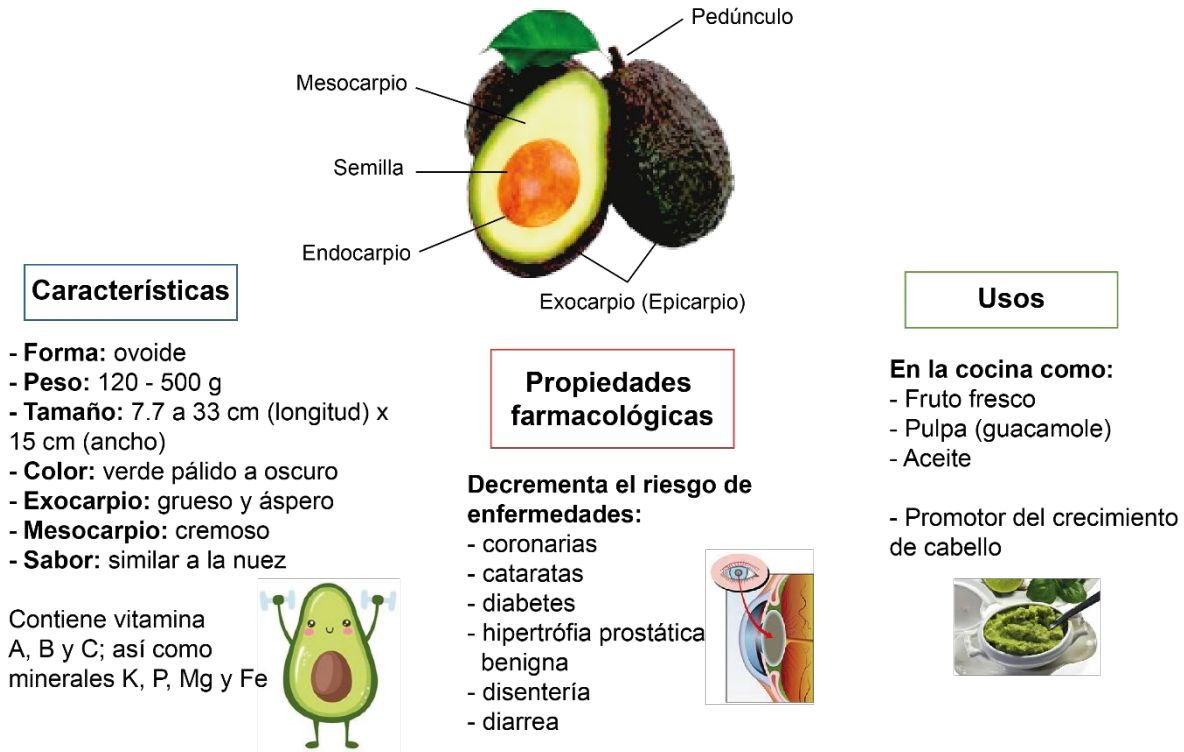
La familia Lauraceae pertenece al orden Laurales e incluye especies de importancia cultural y económica. Esta familia se constituye de 50 géneros y 3 000 especies. El árbol del aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a esta familia. Las civilizaciones americanas iniciaron el cultivo del aguacate hace al menos 9 000 años (Pérez-Jiménez, 2008). El nombre es de origen azteca (*ahuacatl*), y la denominación para árbol es *quahuitl*, por lo que el término para el árbol de aguacate es *ahuacaquahuitl* (Storey, Bergh y Zentmeyer, 1986).

*P. americana* es una especie cuyo origen se sitúa desde el centro y oriente de México, Guatemala y hasta la costa del pacífico en América Central (Pérez-Jiménez, 2008). De acuerdo al Códice Florentino, existen tres razas ecológicas diferentes: la Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y la Antillana (*P. americana* var. *americana*) (Hurtado-Fernández *et al.*, 2018). El árbol de aguacate (*Persea americana* Mill.) es frondoso y de hoja perenne, con recambio anual (SAGARPA, 2017), presenta una altura de hasta 15 m con una propagación y crecimiento acelerado de 1 m por año bajo condiciones favorables y disponibilidad de agua (**Fig. 1**; Schaffer y Bruce, 2012).

El fruto de la variedad Hass es de una importancia creciente en el mundo (**Fig. 2**), el cual reemplazó a la var. Fuerte en los 60s y se ha convertido en un estándar de excelencia en áreas subtropicales (Bill *et al.*, 2014; Secretaría de Economía, 2016).



**Figura 1.** Árbol de aguacate (*Persea americana* Mill.). El árbol adulto puede llegar a medir hasta 15 m de alto y su follaje llega a cubrir un área de más de 9 metros de diámetro. Modificado de Schaffer *et al.*, 2012.



**Figura 2.** Características, usos y propiedades farmacológicas del aguacate. Se destaca el uso del fruto en la elaboración de alimentos por sus propiedades nutritivas y nutraceúticas, cuya incorporación en la dieta disminuye el riesgo de enfermedades. Por otra parte, su aplicación en la industria cosmética se encuentra en auge. Modificado de NOM-128-SCFI-1998; Schaffer *et al.*, 2012; Bill *et al.*, 2014; SAGARPA, 2017.

La floración y los frutos de este cultivar son menos sensibles a bajas temperaturas, pero las hojas son sensibles a esta condición (por debajo de  $-1.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Schaffer y Bruce, 2012).

### 2.1.1. Importancia del aguacate en México

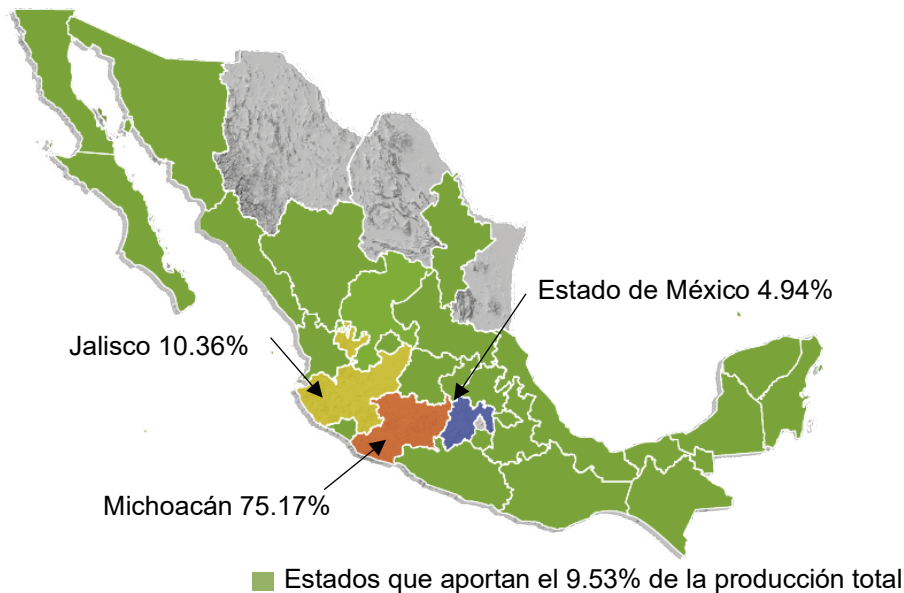
El aguacate es uno de los productos exitosos de la exportación agroalimentaria nacional. De las 400 variedades de este fruto existe una predilección por la variedad Hass debido a su tamaño, apariencia y sabor (Schaffer *et al.*, 2012). El aguacate se produce en Chile, Israel, España, Sudáfrica, Perú, Kenia, Estados Unidos, República Dominicana y México (Bill *et al.*, 2014). Nuestro país se posicionó como líder mundial en la producción con 2 394 042.44 toneladas en el 2020, lo que generó una derrama económica de alrededor de 50 mil millones de pesos (Secretaría de Economía, 2016; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2020). Además, se cuenta con un mercado de exportación creciente hacia Estados

Unidos, Francia, Japón, Canadá, China, Chile, y Australia, lo que significa una derrama económica de 2 744 millones de dólares (SAGARPA, 2018; SIAP, 2019). Para el año 2030 se estima que aumente la demanda mundial del fruto de 2.84 a 4.84 mil millones de toneladas, lo que representaría un aumento de 48.98% en la producción (SAGARPA, 2017). Los estados mexicanos con mayor volumen de producción son Michoacán (75.17%), Jalisco (10.36%), Estado de México (4.94%), que en conjunto suman 90.47% de la producción total del país (**Fig. 3**; SIAP, 2020).

De forma sobresaliente en Michoacán se producen unas dos mil toneladas que se cultivan en alrededor de 200 mil hectáreas (SIAP, 2019) lo que hace de esta entidad federativa la región productora de aguacate más importante del mundo.

### 2.1.2. El fruto de aguacate en post-cosecha

En esta etapa, los frutos deben cosecharse sin daño mecánico como cortaduras, golpes o rasguños. Después, de forma cuidadosa se tienen que transferir las bolsas de colecta a las cajas de distribución del producto para evitar daños mecánicos como las magulladuras. Estas lesiones inducen infecciones por microorganismos fitopatógenos en la etapa de almacenamiento y transporte (Bill *et al.*, 2014). De consideración se destaca que existe una restricción en la exportación del producto debido a aspectos fitosanitarios (SAGARPA, 2017), para ello existen disposiciones



**Figura 3.** Producción nacional de aguacate en porcentaje (%). Modificado de SAGARPA, 2018.

oficiales para la exportación del fruto. Dentro de las cuales destacan: los frutos deben de estar enteros, limpios, exentos de humedad externa, libres de cualquier olor y/o sabores extraños, tener un pedúnculo no superior a 10 mm, aunque su ausencia no se considera un defecto. El lugar de inserción en el fruto debe estar seco e intacto con un corte limpio. Los frutos que son colectados del árbol con pedúnculo corto o con ausencia del mismo, son susceptibles a enfermedades en post-cosecha (Galsurker *et al.*, 2018). En países productores de aguacate se estima que el intervalo de pérdidas es del 2 al 23%, en tanto que en países desarrollados llega hasta un 50% (Márquez *et al.*, 2014; Hurtado-Fernández *et al.*, 2018; Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Las pérdidas en post-cosecha por hongos fitopatógenos es del 40% (CODEX STAN 197-1995; Berini *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2018). Esto afecta la vida del fruto, el valor y destino comercial del mismo (Obianom y Sivakumar, 2018). Dentro de los hongos fitopatógenos que ocasionan estos problemas, se encuentran especies del género *Colletotrichum* los cuales son responsables de un gran porcentaje de pérdidas de los frutos en almacenamiento (Dean *et al.*, 2012).

## 2.2. Enfermedades presentes en el aguacate en post-cosecha

La vida del aguacate en post-cosecha se afecta principalmente por patógenos fúngicos dentro de los que destacan los que producen la antracnosis y la pudrición peduncular del aguacate (PPA) (Darvas y Kotze, 1987; Hartill, 1991; Bill *et al.*, 2014) (**Tabla 1**). Ambas enfermedades representan un serio problema en la exportación del fruto debido a las normas de inocuidad alimentaria de los diferentes países de destino.

El factor común de estas enfermedades es que se presentan cuando el fruto comienza su ablandamiento durante la maduración (Galsurker *et al.*, 2018).

En tanto el fruto esta verde, las infecciones se mantienen en quiescencia, pero pueden ser activadas cuando existe algún cambio bioquímico o fisiológico. Los frutos infectados pueden pasar inspecciones de calidad (Ochoa, 2009; Twizeyimana *et al.*, 2013). Por lo cual, el productor es obligado a producir frutos de excelente calidad que estén libres de infecciones latentes en post-cosecha.

### 2.2.1. Pudrición peduncular del aguacate

Esta enfermedad es de distribución amplia en zonas productoras y puede ser severa si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas (Ploetz, 2003). Esta inicia en el periodo de cosecha, al coleccionar el fruto y trozar su pedúnculo en lugar de cortarlo directamente con instrumento adecuado. También, la falta de medidas antisépticas en el momento de la cosecha da lugar a la infección del fruto (Hartill y Everett, 2002; Pérez-Jiménez, 2008).

La enfermedad se presenta en el extremo del pedúnculo, en la zona de inserción al fruto (ápice) a través del cual el hongo ingresa y se desarrolla a medida que el fruto madura (Darvas y Kotze, 1987). Los hongos que causan el chancro de las ramas en aguacate pueden ser una fuente de inóculo (Twizeyimana *et al.*, 2013). Sin embargo, los patógenos de la PPA pueden estar presentes en ramas vivas, muertas, en hojas y pedicelos vivos o a veces en el suelo (Demoz, 2005; Guarnaccia *et al.*, 2016).

Especies del género fúngico *Colletotrichum* viven como saprófitos y cambian a hemibiótrofos cuando las plantas o frutos enfrentan condiciones de estrés o se encuentran en periodo de maduración. El proceso de infección del huésped comienza con la germinación de esporas, la emisión del primordio y la formación del apresorio, una estructura que le permite fijarse al huésped (el aguacate en este caso) y penetrar la cutícula e inyectar la hifa secundaria (parecido al haustorio). También, la penetración del huésped se da por aberturas naturales o heridas en el fruto (Guarnaccia *et al.*, 2017).

La evolución del daño ocurre desde el interior del fruto, avanza con el tiempo y se presenta como áreas de putrefacción café oscuro y márgenes definidos con encogimiento alrededor del punto de inserción y el micelio se evidencia en la cicatriz que se forma al retirar el pedúnculo (**Fig. 4**; Ploetz, 2003; Lim *et al.*, 2019; Espinoza-Madrugal *et al.*, 2021). El tejido necrótico se encuentra bajo la cutícula y avanza gradualmente hacia el centro del fruto hasta invadirlo totalmente y causar una pudrición interna de la pulpa. Esta se torna café claro e incluso puede llegar a colonizar la semilla si las condiciones ambientales lo favorecen.

En la pulpa se observan rayas marrones que se extienden longitudinalmente, ya que la descomposición inicia en los haces vasculares. Las lesiones superficiales se agrandan gradualmente conforme el fruto envejece y se vuelven de color negro, ocurre marchitamiento y la superficie negra puede cubrirse con micelio y esporas color marrón grisáceo. La descomposición se extiende a lo largo del fruto, haciendo que la pulpa se ponga marrón y acuosa, con un olor desagradable.



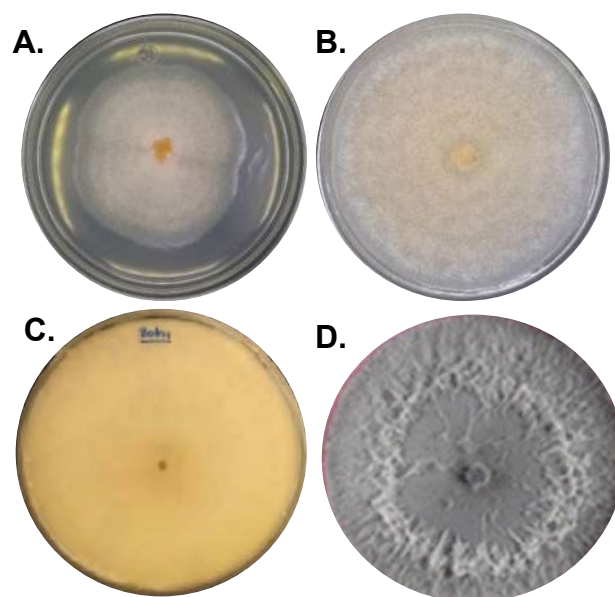
**Figura 4.** Aguacates con pudrición peduncular (PPA). En la parte interna del fruto la pudrición exhibe un color café claro a oscuro que se localiza alrededor de la unión al pedúnculo y se extiende a lo largo de él con márgenes ondulados. Modificado de Guarnaccia *et al.*, 2016.

**Tabla 1.** Enfermedades fúngicas más frecuentes que se presentan en el fruto de aguacate y sus tratamientos.

	Enfermedad	Patógenos	Tratamiento	Cita
Precosecha	Costra en el fruto	<i>Sphaceloma perseae</i>	Fungicidas a base de cobre Clorpirifós	Ploetz, 2003
	Fumagina	<i>Capnodium</i> spp.	Fungicidas a base de cobre Hipoclorito de calcio	Ploetz, 2003
	Mancha por cercospora	<i>Pseudocercospora purpurea</i>	Azoxystrobin Oxicloruro de cobre	Darvas y Kotze, 1987; Pérez-Jiménez, 2008
	La tristeza del aguacate	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Etazol Fenaminosulf Sulfato de cobre	Pérez-Jiménez, 2008
Poscosecha	Antracnosis	<i>Colletotrichum acutatum</i> <i>C. gloeosporioides</i>	Hidróxido de cobre Óxido de cobre	Ochoa Ascencio, 2009
	Pudrición del fruto por <i>Dothiorella</i>	<i>Dothiorella aromatica</i> <i>Botryosphaeria dotidea</i> <i>Neofusicoccum parvum</i> <i>N. ribis</i>	Benomilo + Captafol Fungicidas a base de cobre	Pérez-Jiménez, 2008
	Pudrición peduncular (PPA)	<i>C. acutatum</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>Oligoporus</i> sp. <i>Diaporthe</i> spp. <i>Phomopsis</i> spp.	Azoxystrobin Benomilo Captafol Oxicloruro de cobre Procloraz Tiabendazol	Hartill y Everett, 2002; Demoz, 2005; Guarnaccia <i>et al.</i> , 2016; Espinoza Madrigal <i>et al.</i> , 2018



## 2.2.2. Agentes etiológicos de la pudrición peduncular del aguacate



**Figura 5.** Imágenes de cultivos de diferentes agentes etiológicos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA). **A.** *Colletotrichum acutatum*. **B.** *C. gloeosporioides*. **C.** *Botryosphaeria parva*. **D.** *B. dothidea*. Las fotos evidencian el crecimiento y la morfología colonial en placa de algunos hongos de la PPA. *C. acutatum* al igual que *C. gloeosporioides* presentan un color naranja, sólo que este último tiene un crecimiento más acelerado. *B. parva* tiene un crecimiento uniforme de color blanco y *B. dothidea* tiene un aspecto aterciopelado blanco. Modificado de Lim *et al.*, 2019.

La virulencia de los hongos patógenos aislados de frutos de aguacate con asociación a la pudrición del pedúnculo se demostró al aplicar los postulados de Koch, al reproducir los síntomas en frutos sanos (Mendoza-Vázquez *et al.*, 2019; Espinoza Madrigal *et al.*, 2021).

Los agentes etiológicos de la enfermedad varían con respecto a la zona productora. En Michoacán, se identificó un consorcio de hongos fitopatógenos que provocan la PPA (**Fig. 5**): *Colletotrichum* spp., *Oligoporus* sp., *Diaporthe* spp. y *Phomopsis* spp. (Vidales-Fernández y Sánchez-Pérez, 1991; Ochoa, 2009; Mendoza-Vázquez *et al.*, 2019; Espinoza-Madrigal *et al.*, 2021). En Nueva Zelanda, África y Estados Unidos de América (California) se reportaron a: *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Botryosphaeria parva*, *B. dothidea* y *Phomopsis* sp. (Hartill, 1991; Hartill y Everett, 2002; Pérez-Jiménez, 2008; Twizeyimana *et al.*, 2013; Bill *et al.*, 2014). En Italia a los géneros fúngicos *Colletotrichum* spp., *Neofusicoccum* spp., y *Diaporthe* spp. (Guarnaccia *et al.*, 2016). De lo anterior, el patógeno *C. acutatum*

destaca del resto, ya que es la especie fúngica categorizada como principal causante de la antracnosis y la PPA (Damm *et al.*, 2012).

En la lista de los diez patógenos fúngicos de mayor prevalencia y relevancia en cultivos de interés económico, *Colletotrichum* spp. se situó en el octavo lugar. Este género fúngico se conforma de aproximadamente 29 hasta más de 700 especies en dependencia a la interpretación taxonómica. Además, el hongo es hemibiótrofo con un corto estadio biotrófico en el que se ramifica por todos los tejidos vegetales para crecer y reproducirse, lo que da lugar a necrosis del tejido donde esté presente (Damm *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013; Guarnaccia *et al.*, 2017; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018).

### 2.3. Tratamientos de la pudrición peduncular de aguacate

Uno de los tratamientos habituales para el control de enfermedades fúngicas en post-cosecha del fruto de aguacate es el control físico, el cual consiste en la refrigeración del producto. No obstante, temperaturas inferiores de los 4 a 6 °C incrementan la ocurrencia de enfermedades como la PPA y a largo plazo, al daño del mesocarpo (Hopkirk *et al.*, 1994). Algunos de los productos usados para controlar a los hongos incluyen procloraz benomil, mancozeb, carbendazima, ortiabendazol azoxystrobin y compuestos a base de Cu (Sarkhosh *et al.*, 2017). Este último se aplica para combatir a *Colletotrichum gloeosporioides*, aunque, de forma frecuente no es efectivo frente a otros patógenos de la PPA (Schaffer *et al.*, 2012).

El azoxystrobin es usado de forma habitual y no es rotado con otros fungicidas, por lo cual los patógenos desarrollan resistencia. Por el uso extendido de este compuesto, se presentan impactos negativos en la salud y en ecosistemas terrestres y acuáticos; inclusive dañan a microorganismos benéficos para los cultivos (Sarkhosh *et al.*, 2018) y generan efectos adversos a la salud humana (Shimshoni *et al.*, 2020).

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de México (SENASICA) y la Asociación de Productores y Exportadores de México (APEAM) publicaron una lista de fungicidas recomendados para el cultivo del aguacate. Algunos de ellos son: azoxystrobin, azoxystrobin+fludioxonil, piraclostrobina, sulfato de cobre y tiabendazol (Herrera-González *et al.*, 2017).

Al respecto del uso de plaguicidas en cultivos, el consumidor prefiere frutos sin tratamiento con plaguicidas y que sean seguros para su consumo por el riesgo a la salud humana que representan (Campos-Martínez *et al.*, 2016). Por lo anterior, las

investigaciones se centran en buscar alternativas para reemplazar el uso de fungicidas en post-cosecha, a tal grado que en algunos países ya no se permite el uso de fungicidas (Bill *et al.*, 2014).

### 2.3.1. Compuestos químicos en la agricultura

Los plaguicidas son compuestos bioactivos diseñados para eliminar y/o controlar patógenos de cultivos. En la agricultura, horticultura y la salud pública se usan para el control de plagas como insectos, roedores y microorganismos causantes de enfermedades (OMS, 2010).

El término plaguicida se refiere a los compuestos desinfectantes del suelo, atrayentes, repelentes, defoliantes, reguladores fisiológicos, herbicidas, acaricidas, nematicidas, molusquicidas, rodenticidas, insecticidas y lo que le da sentido a este proyecto, los fungicidas (NOM-082-SAG-FITO/SSA1-2017). El empleo de estas sustancias se hace conforme a normas de inocuidad, las cuales establecen límites máximos permitidos de residuos, para que el riego a mediano y corto plazo sea menor para los consumidores, pero es frecuente que esto no se siga, por lo que se hace un abuso de estos productos (NOM-003-STPS-1999).

Los fungicidas son moléculas sintéticas, diseñadas para inhibir o controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos en cultivos de interés económico como lo es el aguacate. El uso de estos productos se extendió por su selectividad, propiedades biocidas y se intensificó en la segunda mitad del siglo XX (Pérez *et al.*, 2013). En la actualidad, se busca disminuir su uso debido a la acción directa que tienen en la flora y fauna.

Algunos fungicidas son degradados por la luz solar que llega y entra en el suelo, pero es frecuente que estos persistan y se filtren al subsuelo, por lo que la capacidad para degradarse disminuye y estos alcanzan los cuerpos de agua. A su vez, los fungicidas pueden ser tóxicos para los organismos acuáticos y presentan potenciales efectos carcinogénicos (Stoate *et al.*, 2001).

### 2.3.2. Efectos de los fungicidas en la salud humana y el medio ambiente

Una gama amplia de sustancias se aplica para el control de plagas y patógenos que comprometen el rendimiento de los cultivos. Algunos se catalogan como peligrosos por la FAO/OMS y para reconocerlos existen algunas características y/o efectos que pueden producir en el ser humano: toxicidad aguda, mutagenicidad y toxicidad reproductiva (Viñas *et al.*, 2013; González *et al.*, 2018). También, otros daños se

consideran, riesgos para el ganado, el propio cultivo y para la fauna terrestre y acuícola. Debido a que esta clase de moléculas afectan a microorganismos rizosféricos benéficos encargados de fijar nutrientes y a mantener alejados a algunos patógenos potenciales, por tanto, se pierde el balance ecológico (Pérez *et al.*, 2013).

Las vías principales de entrada de los plaguicidas al organismo son por vía dérmica o por inhalación y esto es contraproducente, porque su forma de aplicación es por aspersión. Después de la cosecha, si los alimentos (hojas, semillas y frutos) no son descontaminados, a largo plazo pueden existir efectos deletéreos por ingestión de pequeñas cantidades (Curl *et al.*, 2020; Sapbamrer y Thammachai, 2020).

### 2.3.3. Resistencia de los patógenos a los fungicidas

La efectividad de un plaguicida se compromete con el uso recurrente y prolongado. La resistencia del patógeno a un producto ocurre por cambios en el material genético que son heredables y estables, ya que confieren una ventaja adaptativa y a que permite la sobrevivencia del individuo y su reproducción. Algunos de los factores que favorecen el desarrollo de resistencia son:

- I. **Biológicos:** tamaño de la población resistente, dispersión, potencial reproductivo, número de sitios de acción del fungicida.
- II. **Genéticos:** presencia y frecuencia de genes de resistencia, número de mecanismos de resistencia.
- III. **Operacionales:** espectro de actividad del compuesto, dosis, cobertura de aplicación y número de plagas secundarias (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2012).

En nuestro grupo de trabajo Espinoza Madrigal *et al.*, (2021) evaluó el efecto de cuatro fungicidas usados para el control de la PPA (**Tabla 2**). Los hongos de los géneros *Diaporthe*, *Phomopsis* y *Oligoporus* presentaron sensibilidad frente a los compuestos evaluados (sobre todo el último hongo ya que se inhibió su crecimiento con tres de los cuatro compuestos). En cambio, el grupo de cepas pertenecientes a *Colletotrichum acutatum* mostraron una tendencia a la resistencia. La cepa 10 fue la más resistente frente a tres de cuatro tratamientos, por lo que se hace necesario la búsqueda de alternativas eco-amigables e inocuas para el ser humano en el control de la PPA. En este proyecto se propone el uso de rizobacterias como agentes de control biológico (ACB).

**Tabla 2.** Sensibilidad de los hongos pudrición peduncular de aguacate (PPA) a fungicidas convencionales representado como el índice de crecimiento (IC) fúngico. Los datos son promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE con  $n=9$ . Tukey  $\alpha$  (0.05). El índice de crecimiento se reportó al cuarto día. Modificado de Madrigal-Espinoza, 2019.

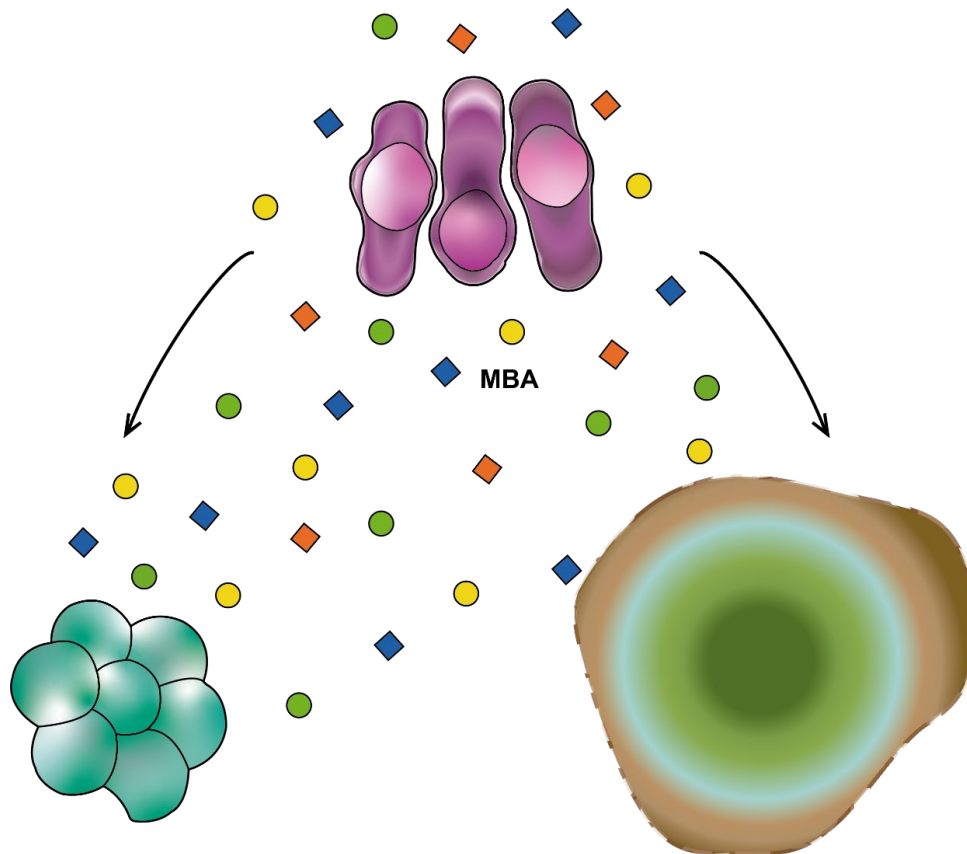
Aislado fúngico	IC			
	Bankit® (250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Benlate® (200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	CuSO <sub>4</sub> ® (200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Tecto 60® (500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
<i>C. acutatum</i> 5446	0.65 $\pm$ 0.01a	0.83 $\pm$ 0.02b	0.57 $\pm$ 0.09a	0.81 $\pm$ 0.02b
<i>C. acutatum</i> 10	0.74 $\pm$ 0.02a	0.90 $\pm$ 0.03b	0.85 $\pm$ 0.04b	0.85 $\pm$ 0.02b
<i>C. acutatum</i> 21	0.61 $\pm$ 0.08a	0.87 $\pm$ 0.03b	0.91 $\pm$ 0.03b	0.73 $\pm$ 0.03a
<i>C. acutatum</i> 25	0.73 $\pm$ 0.03a	0.94 $\pm$ 0.02b	0.83 $\pm$ 0.04a	0.83 $\pm$ 0.04a
<i>D. phaseolorum</i> 5185	0.44 $\pm$ 0.09b	0.0 $\pm$ 0.0a	1.15 $\pm$ 0.08c	0.0 $\pm$ 0.0a
<i>D. phaseolorum</i> 4461	0.93 $\pm$ 0.01b	0.0 $\pm$ 0.0a	0.12 $\pm$ 0.08a	0.0 $\pm$ 0.0a
<i>Oligoporus</i> sp.	0.61 $\pm$ 0.04b	0.29 $\pm$ 0.07a	0.96 $\pm$ 0.05c	0.36 $\pm$ 0.05a
<i>P. viticola</i> 5120	0.81 $\pm$ 0.04b	0.0 $\pm$ 0.0a	0.80 $\pm$ 0.06b	0.0 $\pm$ 0.0a
<i>P. viticola</i> 5480	0.63 $\pm$ 0.09b	0.0 $\pm$ 0.0a	0.79 $\pm$ 0.03b	0.00 $\pm$ 0.0a

## 2.4. Interacción microbiológica célula-célula: antagonismo

El control biológico con un enfoque microbiológico; es decir, microorganismos antagonistas de otros se remonta a 1928. Año en el cual Alexander Fleming identificó que un “exudado de hongo” identificado como *Penicillium digitatum* tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas. El descubrimiento de la Penicilina dio origen a la era de los antibióticos (Tan y Tatsumura, 2015). El primer concepto registrado de control biológico hace referencia a la reducción de la enfermedad ocasionada por patógenos por acción de uno o más microorganismos provenientes del mismo huésped o inoculados por un agente externo (Stern *et al.*, 1959).

Actualmente, existen alternativas de naturaleza biológica al uso de compuestos sintéticos con el objetivo de inhibir el crecimiento de fitopatógenos al secretar sustancias antagónicas (Sengar y Singh, 2018). Las enfermedades vegetales se necesitan controlar para mantener la calidad y abundancia de alimentos producidos por agricultores en todo el mundo. Los microorganismos que antagonizan el crecimiento de patógenos se conocen como agentes de control biológico (ACB) (Pal y Gardener, 2006; Abdallah *et al.*, 2018).





**Figura 6.** Interacción del metaboloma bacteriano antifúngico (MBA) de bacterias rizosféricas frente a microorganismos patógenos. Aquí se ilustra la interacción existente entre compuestos procedentes de microorganismos patógenos y sus ACB bacteriano. Modificado de Lastochkina *et al.*, 2019; Tilocca *et al.*, 2020.

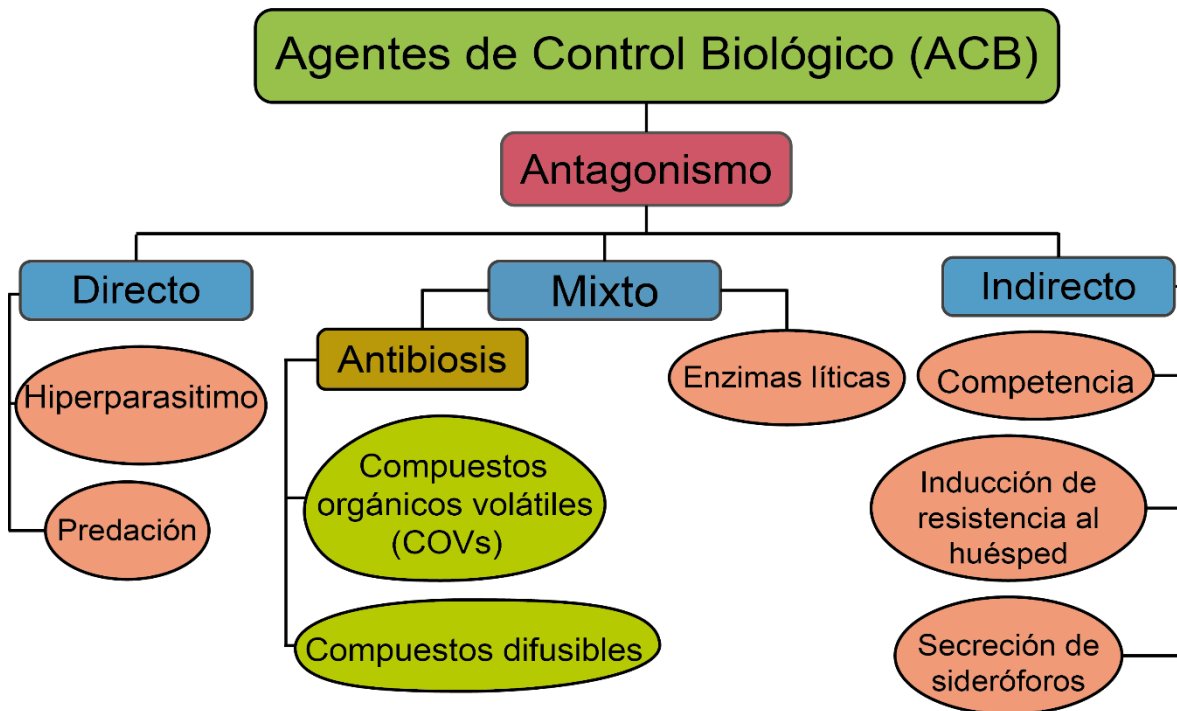
ACB de origen fúngico y bacteriano existen, los cuales presentan efectos antagonicos, en el caso de las bacterias, por su por su metaboloma bacteriano antifúngico (MBA) (**Fig. 6**) frente a fitopatógenos. Esto porque en el mundo biológico existe una interacción química continua entre patógenos potenciales y sus antagonistas, los cuales contribuyen a que no se desarrollen enfermedades y lo hacen por diferentes mecanismos (Orrieta-Fernández y Larrea-Vega, 2001; Yang y Hong, 2018). Los ACB de forma popular han sido los hongos. En este proyecto se plantea la alternativa del uso de rizobacterias, ya que tienen capacidad de sintetizar diferentes componentes que potencialmente inhiben el crecimiento de patógenos (Tofazzal-Islam *et al.*, 2019). Para esto, es muy deseable que los ACB sean inocuos, confieran protección aún después de la cosecha bajo un rango muy amplio de condiciones como pH, temperatura y diferentes concentraciones de iones disueltos en el medio ((Montesinos, 2003; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Una alternativa viable en la búsqueda de ACB bacterianos es la rizósfera, ya que se considera un microambiente extremo y microbiológicamente supresivo y una primera línea de defensa de la planta a través del sistema radicular en simbiosis con microorganismos. El primero en definir lo que es la rizósfera fue Hiltner (1904) para referirse a la zona influenciada por las raíces en que los microorganismos proliferan gracias a las sustancias que son secretadas por las plantas, principalmente carbohidratos. Por estas características, la cantidad de bacterias está en el intervalo de  $1 \times 10^6$  hasta  $1 \times 10^8$  células/centímetro cuadrado. Mientras que, el número de especies desde un par de millones hasta inclusive billones de células/gramo de suelo (Brahmaprakash *et al.*, 2017). Los ACB bacterianos se aplican en concentraciones que van desde  $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^8$  UFC/ml cuando se busca prevenir la pudrición por hongos en frutos y vegetales (Sharma *et al.*, 2009; Wisniewski *et al.*, 2016).

#### 2.4.1. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico

Un ACB ideal no produce metabolitos tóxicos para los humanos, los animales y al medio ambiente. Los efectos directos de control se evidencian como una interacción directa única, específica y de alta afinidad con el patógeno, ya que la interacción de ACB-patógeno es un contacto físico. Los mecanismos directos se clasifican como hiperparasitismo y la predación (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006). Algo importante que destacar es que un prerrequisito para que un ACB bacteriano tenga buena actividad en el control de enfermedades fúngicas es su capacidad de colonizar los tejidos vegetales (Salvatierra-Martinez *et al.*, 2018).

Otros efectos son los indirectos, en donde el ACB no interactúa con el fitopatógeno y la interacción se lleva a cabo por medio de la competencia por espacio o nutrientes, la inducción de resistencia al huésped, secreción de sideróforos o por un mecanismo mixto. Los ACB tienen la capacidad de secretar enzimas líticas que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos. También, la antibiosis se encuentra dentro de esta clasificación (**Fig. 7 y 8**).

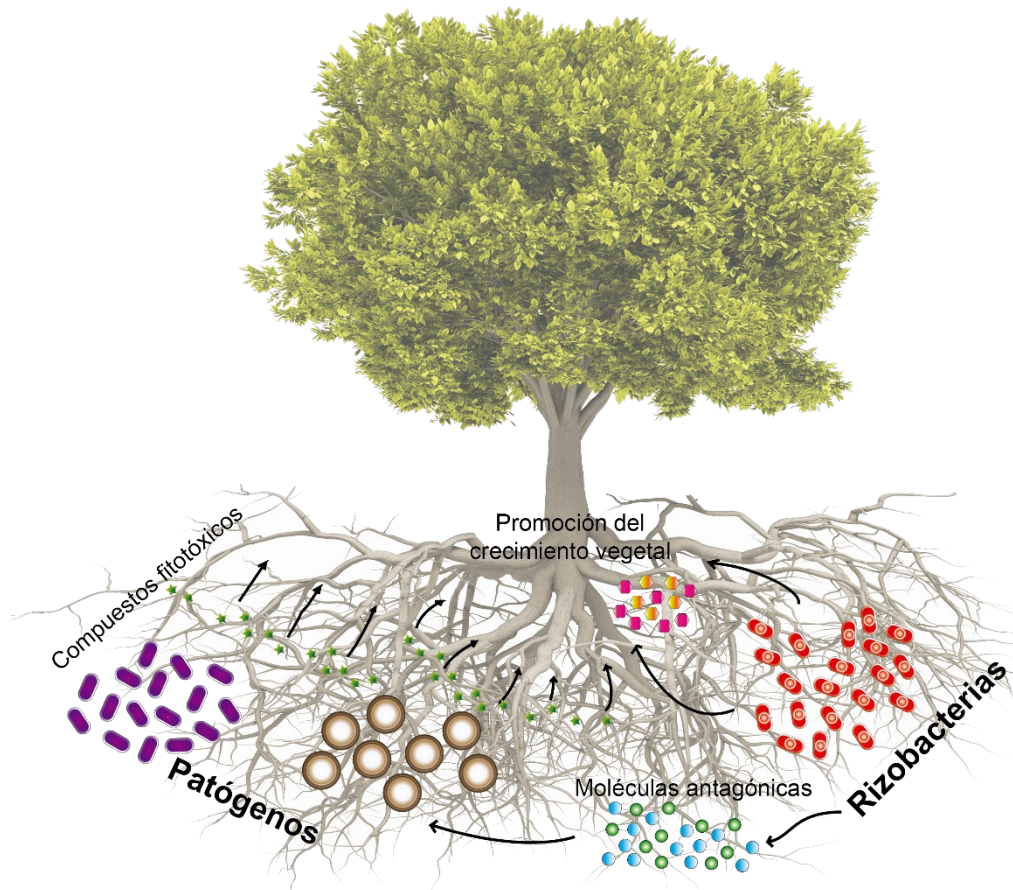


**Figura 7.** Mecanismos de acción de los agentes de control biológico (ACB) en la inhibición de patógenos. El tipo de mecanismo adoptado por los ACB para inhibir a un patógeno es diverso y puede involucrar más de uno. Modificado de Gupta *et al.*, 2015; Mohanram y Kumar, 2019; Moreno Reséndez *et al.*, 2018.

#### 2.4.1.1. La Antibiosis

Es el antagonismo mediado por diferentes clases de sustancias que incluyen antifúngicos de naturaleza volátil (denominados compuestos orgánicos volátiles o difusible, como en el caso de los antibióticos, que son efectivos en bajas concentraciones (Sharma *et al.*, 2013; Brahmprakash *et al.*, 2017). La mayor parte de estos compuestos son biodegradables, a diferencia de los fungicidas que estos son difíciles de ser degradados y de los que se requiere aplicar grandes cantidades para tener el efecto biológico deseado (Moreno Reséndez *et al.*, 2018). La antibiosis es la principal alternativa para el control de enfermedades fúngicas (Devi *et al.*, 2018). Por lo que es de nuestro interés en este proyecto enfocarnos en la búsqueda de sustancias producidas por rizobacterias que afecten el crecimiento de hongos fitopatógenos de la PPA en post-cosecha.





**Figura 8.** Representación esquemática de efectos directos (promoción del crecimiento vegetal) e indirectos (antagonismo) que exhiben bacterias rizosféricas frente a fitopatógenos. Las moléculas antagonicas secretadas por agentes de control biológico (ACB) pueden ser de naturaleza volátil o difusible. Modificado de BrahmaPrakash *et al.*, 2017; Gouda *et al.*, 2018; Rahman *et al.*, 2018.

#### 2.4.1.2. Compuestos orgánicos volátiles

Los COVs son compuestos a base de carbono con un peso molecular pequeño que a temperatura ambiente (20 °C) y a una presión superior a 0.01 Kpa pasan a fase gaseosa. Estos compuestos son producto del metabolismo primario y secundario de microorganismos y plantas (Morath *et al.*, 2012). La producción bacteriana de este tipo de compuestos está influenciada por las dinámicas del ecosistema completo en el que se encuentra. Los compuestos de esta naturaleza regulan interacciones inter-específicas en la biósfera: entre el mundo animal, microbiano y vegetal. Por lo anterior, a los COVs se les denomina infoquímicos (Wheatley, 2002), ya que se propagan a largas distancias por su naturaleza volátil y esto crea un ambiente de quiescencia en comunidades antagonicas (Moreno Reséndez *et al.*, 2018).

Los COVs reportados en la literatura pertenecen a: carbohidratos simples, heterociclos, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, tioalcoholes, tioésteres y ácidos orgánicos (Morath *et al.*, 2012). Además, del uso de los COVs como metabolitos de control biológico de patógenos fúngicos, en la literatura se encuentran descritas las capacidades de promover el crecimiento de plantas e inclusive el control biológico de nemátodos fitopatógenos (Tilocca *et al.*, 2020).

#### 2.4.1.3. Compuestos difusibles

Los antibióticos secretados por bacterias rizósfericas son un grupo de moléculas heterogéneas de bajo peso molecular que afectan el crecimiento de patógenos al ocasionar una disrupción en la pared celular del microorganismo patógeno, alteran la estructura de su membrana, o inhiben la replicación del ADN o la síntesis de proteínas (Lastochkina *et al.*, 2019).

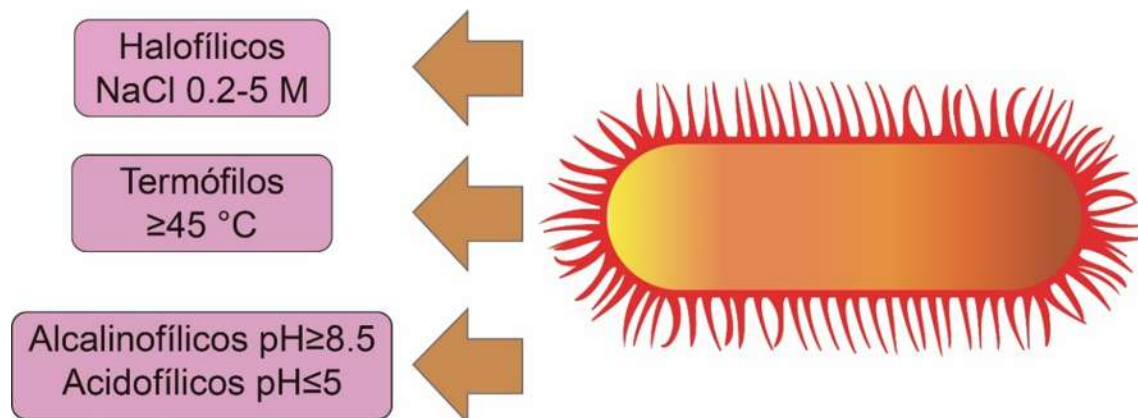
Algunas de éstas moléculas son péptidos lineales o cíclicos que contienen una cadena lipofílica hidrocarbonada en el sitio N-terminal e incluyen a las polimixinas, octapeptinas, polipeptinas, lipopéptidos catiónicos lineales y los más conocidos, los lipopéptidos catiónicos cíclicos (ciclolipopéptidos) pertenecientes a las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas (Cochrane y Vederas, 2014; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018; Tofazzal Islam *et al.*, 2019; Mohanram y Kumar, 2019). Ejemplos de este tipo de compuestos son: butirolactonas, 2-4-diacetilfloroglucinol, oligomicina A, oomicina A, ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), pioluterina (Plt), pirrolnitrina (Pln), xantobacina, zwittermicina A, kanosamina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona y ciclo lipopéptidos como la fengicina, iturina y surfactina (Whipps, 2001; Gupta *et al.*, 2015). En conjunto, a la capacidad de producir compuestos difusibles y/o COVs representa el metaboloma bacteriano antifúngico (MBA).

### 2.5. Bacterias extremófilas

La distribución de los microorganismos no se limita a ambientes específicos, y éstos pueden encontrarse en condiciones diversas de temperatura, presión, salinidad y pH. En su conjunto, a este tipo de microbios se les denomina extremófilos. La mayoría pertenecen al dominio Archaea. Sin embargo, otros dominios son relevantes en el estudio de extremófilos, tales como, Eukarya y Bacteria (Van den Burg, 2003). Algunas de las categorías representativas en las cuales se clasifican los extremófilos son (**Fig. 9**):

- **Halófilos:** Manifiestan crecimiento en altas concentraciones de sal, ya que poseen la capacidad de mantener un balance osmótico ( $\text{NaCl} \geq 0.2 \text{ M}$ ) (Waditee-Sirisattha *et al.*, 2016).
- **Termófilos:** crecimiento en temperaturas  $\geq 50 \text{ }^\circ\text{C}$  (Bowers *et al.*, 2009).
- **Alcalófilos:**  $\text{pH} > 9$ . **Acidófilos:**  $\text{pH} < 2-3$ . Microorganismos que tienen la habilidad de mantener neutro su  $\text{pH}$  interno, por lo que sus proteínas intracelulares no necesitan adaptarse a estas condiciones. Los rizósfera contienen la mayor biodiversidad microbiana del planeta. Sin embargo, investigaciones continúan sobre el estudio del potencial biotecnológico de los microorganismos (Flores-Fernández *et al.*, 2010). Los extremófilos tienen potencial biotecnológico, ya que son capaces de producir biomoléculas orgánicas protectoras (extremolitos) y enzimas (extremozimas).

Estas son capaces de resistir la proteólisis y subsistir en presencia de agentes desnaturalizantes, así como, el gran contenido de sales, son termoestables y se adaptan fácilmente al frío (Chen y Jiang, 2018). Los beneficios del uso de estas biomoléculas es que disminuyen el riesgo de contaminación, disminuyen la viscosidad e incrementan la solubilidad de sustratos. Las bacterias extremófilas usualmente se desarrollan en condiciones de escasez de agua y mejoran la captación de este recurso en plantas que se encuentran bajo estrés hídrico, por sequía (Raddadi *et al.*, 2015).



**Figura 9.** Esquema de las características principales de las bacterias extremófilas. Algunas de las cualidades de microorganismos que habitan zonas límite es la capacidad de crecer en suelos con concentraciones elevadas de sal,  $\text{pH}$  variable y temperaturas altas. Modificado de Bowers *et al.*, 2009; Chen y Jiang, 2018; Waditee-Sirisattha *et al.*, 2016.

### 3. Justificación

La comercialización del aguacate sin residuos de plaguicidas, la resistencia a fungicidas convencionales y la considerable pérdida económica por fruto con pudrición están entre los factores por los que la pudrición peduncular del fruto de aguacate (PPA) en anaquel es un problema no resuelto. El reto es encontrar moléculas inocuas que sean efectivas en su control. Para tal fin, el antagonismo entre bacterias extremófilas y los hongos de la PPA es el ámbito molecular de estudio.

### 4. Hipótesis

Los metabolitos secundarios de bacterias aisladas de la rizósfera de plantas del desierto controlan hongos que causan la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass).

### 5. Objetivo general

Determinar el potencial antagónico de rizobacterias frente a hongos causantes de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass).

#### 5.1. Objetivos particulares

1. Determinar las condiciones de crecimiento para la interacción de las bacterias frente a los hongos de la pudrición peduncular del aguacate.
2. Evaluar el antagonismo *in vitro* de rizobacterias frente a hongos de pudrición peduncular de aguacate.
3. Identificar los compuestos antifúngicos que secretan las cepas bacterianas.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Hongos de la pudrición peduncular de aguacate



**Figura 10.** Frutos de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) con signos de pudrición peduncular (PPA). Los síntomas de la enfermedad se pueden extender en todo el fruto (mesocarpio), aunque, inicialmente se presenta en el pedúnculo del mismo. Modificado de Espinoza Madrigal *et al.*, 2018.

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se colectaron frutos de aguacate variedad Hass de diferentes regiones de Michoacán. Estos frutos presentaban síntomas de la enfermedad de pudrición peduncular: manchas oscuras de color negro-café en el área de inserción del pedúnculo en el fruto. Al realizar un corte transversal del mismo, por todo el fruto se extendían franjas de color café, lo cual fue indicativo de la enfermedad en el mesocarpio del mismo (**Fig. 10**).

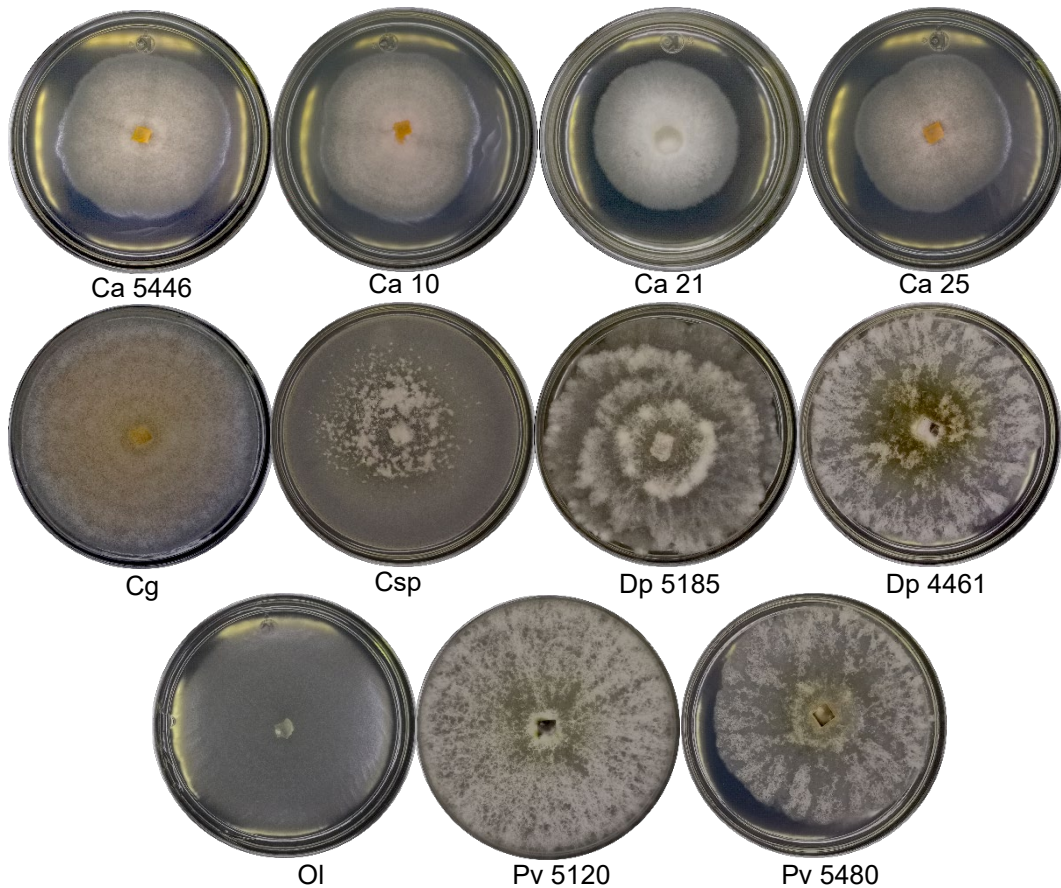
A partir de frutos con PPA, se cultivaron hongos presentes en la zona de infección del pedúnculo. Después, los hongos aislados se identificaron y se enlistaron (**Tabla 3**), con el propósito de asignar a cada uno un número de aislado y una abreviación de su nombre respectivo para hacer más fácil su nomenclatura en los experimentos subsecuentes y también, para conservarlos dentro de la colección del Laboratorio de Fisiología Celular. Los aislados se resembraron inicialmente en el mismo medio de crecimiento en que se aislaron; es decir, agar papa dextrosa (APD; 39 g/l).

El total de hongos de la PPA aislados fueron 11. Cuatro cepas diferentes de *Colletotrichum acutatum*, una cepa de *C. gloeosporioides*, una especie desconocida del mismo género (*Colletotrichum* sp.), dos cepas de *Diaporthe phaseolorum*, una especie desconocida del género *Oligoporus* y por último dos cepas de *Phomopsis viticola*.

En las primeras cuatro cepas, aunque corresponden a la misma especie, su morfología es diferente. De estas destacó la cepa 10 ya que es multirresistente a fungicidas; este hongo tiene una morfología colonial algodonosa color naranja, con crecimiento circular. El hongo *C. gloeosporioides* tiene un patrón similar de crecimiento, diferenciándose en que la tonalidad del naranja es más intensa. El crecimiento en placa de *Colletotrichum* sp. es de forma algodonosa de color blanco. Las dos cepas de *Diaporthe phaseolorum* tienen un crecimiento laminar, diferenciándose en el color de sus colonias, la cepa 5185 es de color naranja-café y la de 4461 es blanca en cultivos jóvenes llegando a ser verde en un estadio de desarrollo más longevo. El hongo *Oligoporus* sp. tiene un crecimiento circular, color blanco-transparente, por lo cual, su crecimiento en placa es difícil de observar; además, el crecimiento de este hongo es de forma fibrosa. Por último, las dos cepas de *Phomopsis viticola* crecen de forma irregular, con bordes redondeados, la cepa 5120 presenta un color verde intenso y la 5480 es blanca (**Fig. 11**).

**Tabla 3.** Listado de los aislados de hongos de la PPA ensayados en este proyecto.

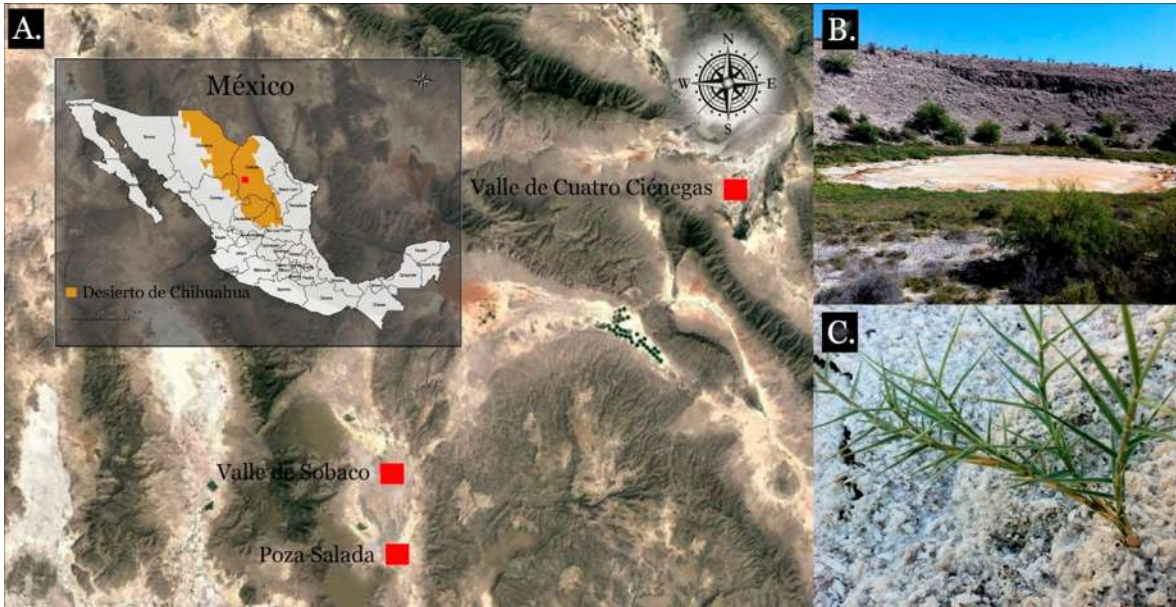
No	Hongos de la PPA	Abreviación
1	<i>Colletotrichum acutatum</i> 5446	Ca 5446
2	<i>C. acutatum</i> 10	Ca 10
3	<i>C. acutatum</i> 21	Ca 21
4	<i>C. acutatum</i> 25	Ca 25
5	<i>C. gloeosporioides</i>	Cg
6	<i>Colletotrichum</i> sp.	Csp
7	<i>Diaporthe phaseolorum</i> 5185	Dp 5185
8	<i>D. phaseolorum</i> 4461	Dp 4461
9	<i>Oligoporus</i> sp.	OI
10	<i>Phomopsis viticola</i> 5120	Pv 5120
11	<i>P. viticola</i> 5480	Pv 5480



**Figura 11.** Crecimiento en placa de los hongos de la pudrición peduncular del aguacate (PPA) ensayados en este proyecto. En orden descendente se encuentran fotografías de cada uno de los hongos de la PPA iniciando con las 4 cepas de *C. acutatum*, después la especie *C. gloesporioides*, una especie no identificada del género (*Colletotrichum* sp.), dos cepas de *D. phaseolorum*, una especie desconocida de *Oligoporus* y finalmente, dos cepas distintas de *P. viticola*.

## 6.2. Aislados bacterianos rizosféricos

En una investigación previa de Palacio-Rodríguez *et al.*, (2017) se aislaron bacterias de la rizósfera de la planta *Distichlis spicata* (L.) E. Greene (Poaceae), cuyo nombre común es Pasto salado, microorganismos asociados a sus raíces que se desarrollan en estas condiciones extremas de vida (extremófilos) y, en específico de esta especie vegetal resultan promisorias para la búsqueda de agentes de control biológico (ACB). Esto por la simbiosis que tienen con las plantas para permitir su supervivencia a cambio de brindar nutrientes a las bacterias. La colecta se realizó en el borde de una charca de agua salada, denominada “Poza Salada”, en el Valle del Sobaco, localizado al sudeste del desierto de Chihuahua en Coahuila, México (26°10′54″ N y 102°42′24″ O) (Fig. 12).



**Figura 12.** Prospección microbiana en el desierto de Chihuahua. **A.** Localización geográfica del sitio de muestreo en la Poza Salada en el Valle de Sobaco en Coahuila, México. **B y C.** Fotografías de Poza Salada y del pasto salado (*Distichlis spicata*) que prolifera alrededor de la charca. Modificado de (Palacio-Rodriguez *et al.*, 2017).

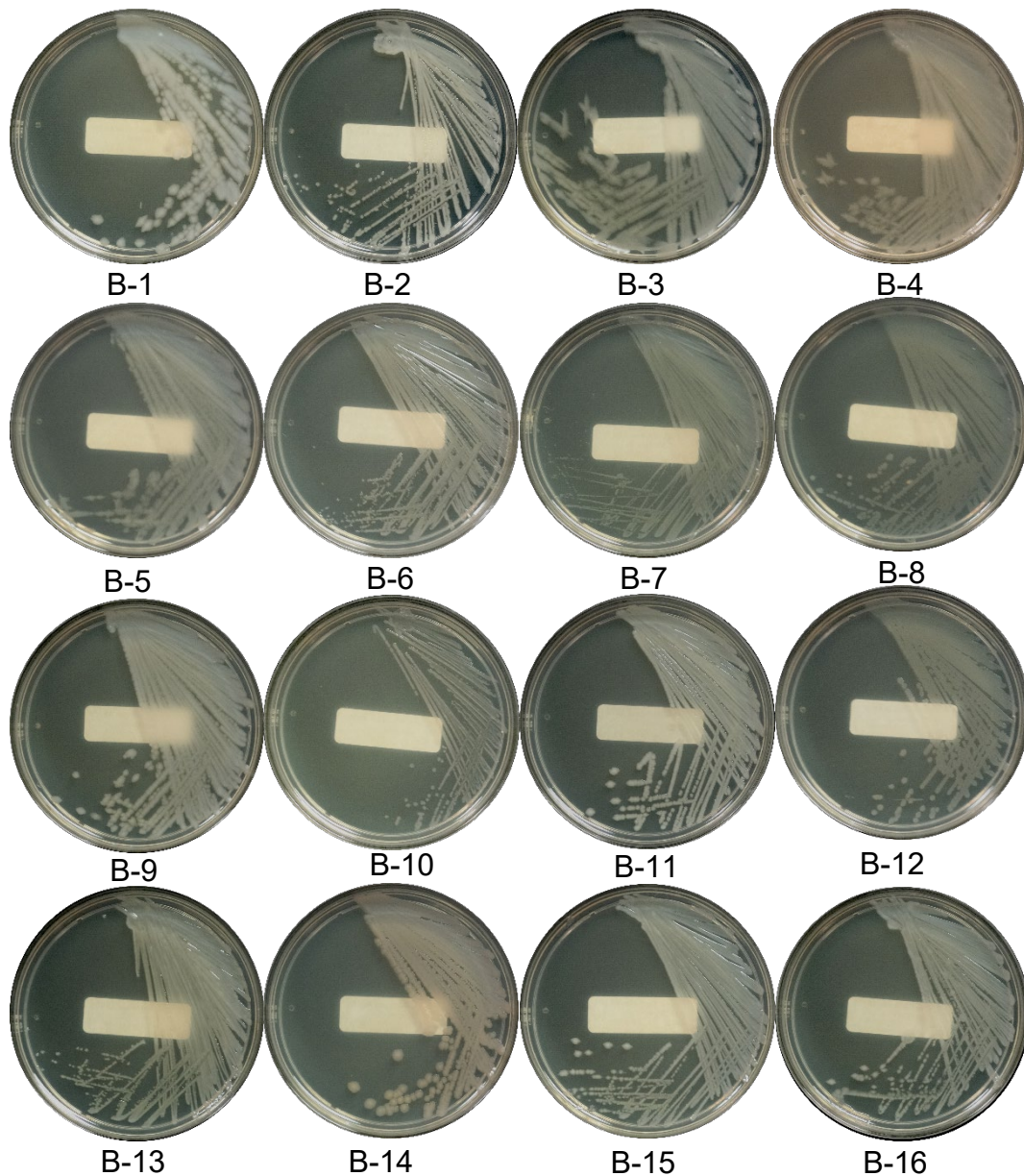
En nuestro grupo de trabajo se recibieron 16 aislados bacterianos y se le asignó a cada uno un número diferente (**Tabla 4**), iniciando con B-1 hasta B-16.

**Tabla 4.** Listado de los aislados bacterianos rizosféricos ensayados en este proyecto.

Bacterias	Abreviación
16	B-1
	B-2
	B-3
	B-4
	B-5
	B-6
	B-7
	B-8
	B-9
	B-10
	B-11
	B-12
	B-13
	B-14
	B-15
	B-16



Las bacterias fueron inoculadas inicialmente en placas de Petri de 90 x 15 mm con agar Müeller-Hinton (MH; 38 g/l) con dos finalidades: la primera para conservarlas en la colección del Laboratorio de Fisiología Celular a 4 °C en refrigerador con glicerol al 20% (v/v) y como segunda finalidad para caracterizar la morfología bacteriana (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Crecimiento en placa de cultivos bacterianos rizosféricos (n=16) ensayados en este proyecto. Cada uno de estos aislados tienen diferente morfología colonial variando de forma, borde y consistencia, ya que, algunas de ellas son cremosas, otras secas y bacterias como B-2 o B-6 son mucoides.

### **6.3. Curvas de crecimiento de aislados bacterianos rizosféricos**

En placas de 96 pocillos se evaluó el crecimiento de los 16 aislados bacterianos rizosféricos en cinco medios de crecimiento líquido distintos: Müller-Hinton (MH), papa dextrosa (PD), dextrosa Sabouraud (DS) y las mezclas de MH:PD (1:1; v/v) y MH:DS (1:1; v/v), esto con la finalidad de conocer la fisiología de crecimiento y para saber qué medio de interacción hongo de la PPA-rizobacteria resultaba ser el más adecuado para no beneficiar a alguno de los dos tipos de microorganismos en la interacción 1 a 1. En cada pocillo se pipeteó 100 µl de cada uno de los medios líquidos propuestos, posteriormente, 50 µl de cada una de las suspensiones bacterianas se inoculó de forma independiente en los pocillos con previo ajuste de concentración. Para lo anterior, un ajuste de concentración inicial se realizó con una asada de las bacterias en tubos roscados con 10 ml de caldo MH con posterior agitación en un Vórtex, después, la densidad óptica (absorbencia) se midió a 0.5 con una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm. Esta D.O corresponde a 0.5 en la escala de McFarland, que se traduce como una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mililitro. Finalmente, el experimento se incubó a 37 °C con lecturas de D.O en espectrofotómetro en las mismas condiciones antes descritas. Lo anterior se llevó a cabo cada 2h hasta llegar a las 12 h. El experimento completo se realizó por triplicado para cada aislado bacteriano.

### **6.4. Elección de las condiciones para la interacción bacteria-hongo**

Una vez teniendo en cuenta que las bacterias crecieron de forma satisfactoria en los cinco medios líquidos se procedió a evaluar si este comportamiento se mantenía en medios sólidos. Esto se realizó de igual forma para los hongos de la PPA. El objetivo del experimento fue dilucidar el comportamiento del crecimiento individual de cada tipo de microorganismo de forma individual en diferentes medios de crecimiento, pero ahora en fase sólida (agar). Dos temperaturas de crecimiento diferentes se evaluaron: la primera a 25 °C (ambiente) que es donde, generalmente se desarrollan los hongos y la segunda a 37 °C que es donde generalmente se desarrollan las bacterias (mesofílicas) en condiciones de laboratorio, para finalmente seleccionar un medio y una temperatura óptima para las interacciones microbianas.

En placas Petri de 90 x 15 mm con medios: MH, PD, DS y las mezclas de MH:PD (1:1; v/v) y MH:DS (1:1; v/v) se inoculó de forma independiente cada una de las 16

bacterias. Las placas se incubaron con las dos temperaturas de forma independiente (25 y 37 °C) por 48 h, después, el crecimiento satisfactorio o no se reportó en cada uno de los medios de crecimiento. El experimento se realizó por duplicado para cada condición de temperatura en cada medio sólido.

En el caso de los hongos se hizo de igual forma, solo que, a la vez se realizó una evaluación del crecimiento temporal de forma independiente. Para esto, se registró fotográficamente el crecimiento radial y se midió el área de crecimiento cada día por un periodo total de 7 d. Con estos datos se construyó una curva de crecimiento representada por las pendientes al trazar una línea recta desde el punto inicial al punto final de la evaluación del crecimiento fúngico. Lo anterior, para clasificar a los hongos con base en la velocidad de crecimiento.

### **6.5. Caracterización morfológica de aislados bacterianos**

La morfología bacteriana se desconocía, por lo que se decidió realizar un experimento para conocerla. Para esto, a partir del experimento anterior se seleccionó el medio inicial de crecimiento de estas bacterias; es decir MH, después, la morfología colonial de estas bacterias se reportó directamente; las características a considerar fueron: forma, borde, elevación, consistencia, color, pigmento y propiedad óptica. A su vez, una tinción Gram se realizó para conocer con qué tipo de bacterias estábamos trabajando; es decir, bacilos o cocos y en qué tipo de asociación se encuentran, pero principalmente para conocer si se trataban de bacterias Gram positivas o negativas para de esta forma poder diferenciarlas.

### **6.6. Escrutinio antagónico de bacterias frente a hongos de la pudrición peduncular del aguacate**

Una vez determinadas las condiciones de interacción: medio APD y temperatura de 25 °C se llevó a cabo un escrutinio de bacterias frente a hongos de la PPA. La finalidad fue reducir el universo de estudio en cuanto a las bacterias y quedarnos con aquellos prospectos a ser ACB bacterianos. El experimento se llevó a cabo en placas Petri de 90 x 115 mm con medio APD, en el centro de las mismas se inoculó un propágulo de 5 mm de  $\Phi$  (diámetro) de cada uno de los hongos de la PPA de forma independiente. Los hongos se dejaron crecer en condiciones ambientales (25 °C) hasta que alcanzó cada uno un diámetro de 2 cm, después, a 1 cm de distancia con respecto al diámetro de crecimiento externo del hongo se inocularon 8 bacterias diferentes por placa con un asa bacteriológica no calibrada. Lo anterior se repitió

dos veces ya que el total de bacterias fueron 16; el experimento se incubó a 25 °C. Posteriormente, el crecimiento fúngico en presencia de las bacterias se evaluó por un periodo máximo de 7 d. Las bacterias que lograron inhibir el crecimiento del hongo al formar un halo de inhibición alrededor del mismo se seleccionaron como los mejores prospectos.

### 6.7. Interacción *in vitro* 1 a 1 de prospectos de agentes de control biológico bacterianos frente a hongos de la pudrición peduncular del aguacate

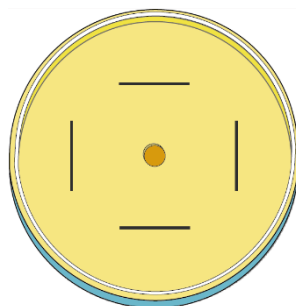
Con los 4 prospectos de ACB bacteriano seleccionados se determinó el grado de sensibilidad sobre el crecimiento de los hongos de la PPA, para esto, en placas Petri de 60 x 15 mm de APD se inoculó un propágulo de 5 mm de diámetro ( $\Phi$ ) de cada uno de los hongos de forma independiente en el centro de las placas y, a 1.5 cm de distancia se inoculó 4  $\mu$ l de una bacteria ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/mililitro) en forma recta con un asa bacteriológica calibrada de 1  $\mu$ l (**Fig. 14**). El experimento se incubó a 25 °C por 4 d (periodo en el cual la colonia del hongo control llegó casi a los bordes de la placa), después del tiempo transcurrido, el índice de crecimiento del hongo (IC) se evaluó de la siguiente forma:

$$IC = \frac{Ct}{Cc}$$

Donde:

Ct es el área de crecimiento del hongo tratado.

Cc es el área de crecimiento del control (hongo sin tratamiento); teniendo en cuenta que un  $IC < 1$  indica la inhibición del crecimiento del hongo, un  $IC=1$  indica que no existe algún efecto por parte de la bacteria y, finalmente, un  $IC > 1$  indica una promoción del crecimiento fúngico.



**Figura 14.** Guía para la inoculación de la interacción bacteria-hongo. En la parte central de la placa se inocula un propágulo del hongo de 5 mm  $\Phi$ , alrededor del mismo se inoculan cuatro microlitros

de la bacteria ajustada a 15 mm de distancia, para así establecer la interacción directa 1 a 1 de bacteria frente a hongos.

El área Ct y Cc se evaluó a partir de fotos capturadas a los 4 d de incubación, el proceso de las mismas se hizo en el software Photoshop (21.0.3). Lo anterior se repitió para cada uno de los 11 hongos de la PPA frente a las 4 bacterias seleccionadas con una n=3 para cada tratamiento. El experimento global se repitió tres veces de forma independiente.

Finalmente, para determinar si alguno de los prospectos de ACB bacteriano seleccionados en el escrutinio fue mejor uno que otro, se establecieron los siguientes criterios de selección:

1. Cada bacteria prospecto a ACB debe inhibir al menos el 70% de los patógenos ensayados.
2. El IC de los hongos inhibidos debe ser  $< 1$ , evidenciando de esta forma su inhibición.

### **6.8. Evaluación del antagonismo *in vitro* por compuestos orgánicos volátiles de rizobacterias frente a hongos de la pudrición peduncular de aguacate**

Con los resultados de la interacción 1 a 1 no se pudo concluir si el efecto observado fue debido a compuestos difusibles únicamente, ya que los dos tipos de microorganismos se encontraban en el mismo medio. Así que, en placas divididas con medio APD se inoculó de un lado 4  $\mu$ l de una suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/mililitro), del otro lado se inoculó un propágulo de 5 mm  $\Phi$  de un hongo de la PPA. El experimento se incubó a 25 °C por 4 d, después, el IC se evaluó de igual forma que el ensayo anterior. Lo anterior se repitió para cada uno de los 11 hongos de la PPA frente a las 4 bacterias seleccionadas con una n=3 para cada tratamiento. El experimento global se repitió tres veces de forma independiente.

Finalmente, con el propósito de reducir nuestro universo de estudio en cuanto a los hongos se establecieron los siguientes criterios:

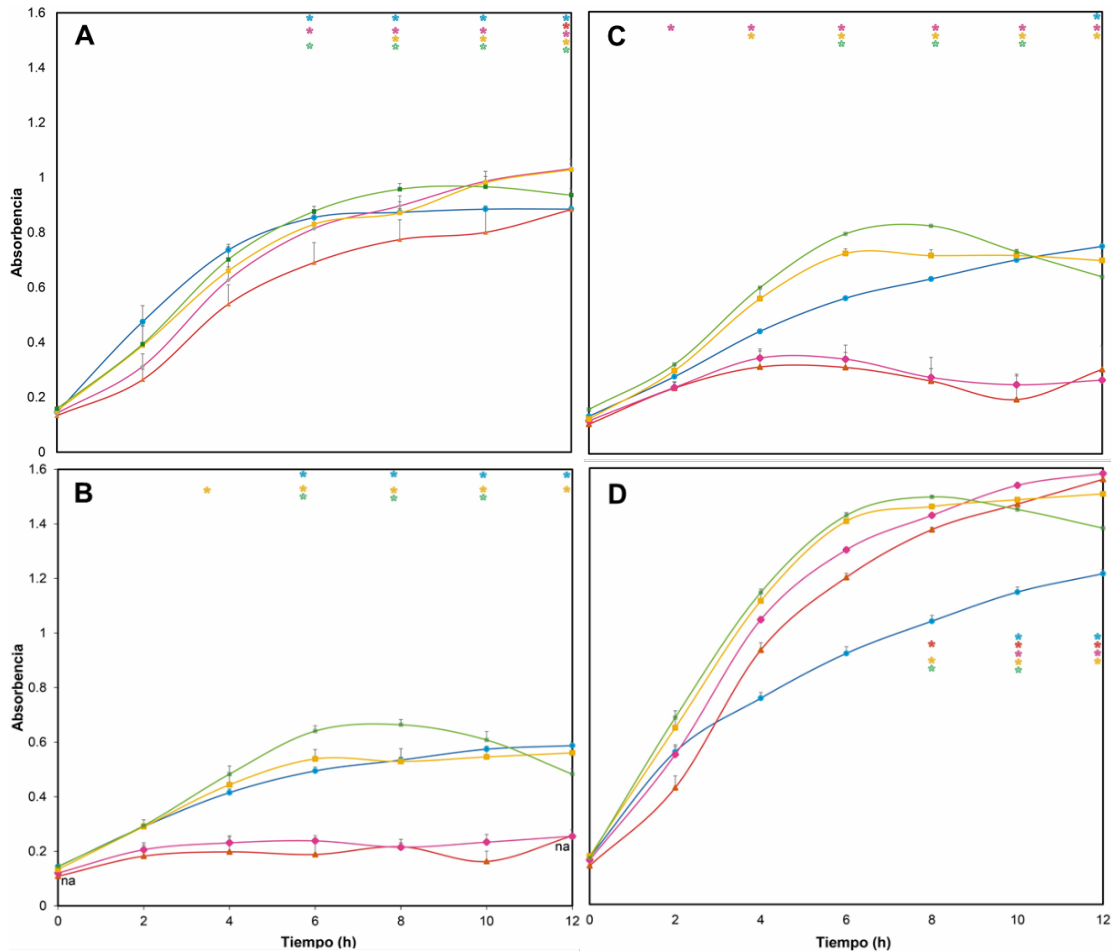
1. De los hongos inhibidos, se selecciona el de crecimiento rápido.
2. El patógeno seleccionado debe ser inhibido ( $IC < 1$ ) al menos por dos de los cuatro tratamientos bacterianos.

## 6.9. Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos se analizaron con los programas STATISTICA 10 y R (1.3.959), en los cuales se realizaron pruebas t-Student y, para otros análisis se realizaron ANOVA con prueba post hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ), en el cual se usaron diferentes letras para indicar los tratamientos que tienen significancia estadística.

## 7. Resultados

### 7.1. Curso temporal del crecimiento de aislados bacterianos rizosféricos



**Figura 15.** Curso de crecimiento temporal de rizobacterias en medios de crecimiento líquido. **A.** B-1. **B.** B-8. **C.** B-12. **D.** B-16. Los \* indican diferencias significativas, na es que no existen diferencias

—●— MH —▲— PD —◆— DS —■— MH:PD —■— MH:DS. Los datos son promedio de dos experimentos independientes  $\pm$  EE  $n=2$ . Tukey ( $p < 0.05$ ).

Para conocer la fisiología de crecimiento de las rizobacterias se construyeron curvas de crecimiento microbiano en diferentes medios líquidos. Lo anterior con dos finalidades: la primera, para conocer el crecimiento de las bacterias y la segunda, para seleccionar un medio de crecimiento bacteriano óptimo para llevar a cabo el escrutinio y, posteriormente, la interacción de bacterias frente a hongos de la PPA. Para resolver esto se ensayaron cinco combinaciones de medios líquidos

diferentes: caldo MH, caldo papa dextrosa (PD), caldo dextrosa Sabouraud (DS) y las mezclas de MH:PD (1:1 v/v) y MH:DS (1:1 v/v).

La **Fig. 15** contiene gráficas representativas del curso temporal de crecimiento bacteriano en donde B-1 y B-16 se comportaron de forma similar (**Fig. 15.A y D**). Las bacterias B-8 y B-12 (**Fig. 15.B y C**) presentaron una fase de adaptación de hasta 4 h y una fase exponencial aguda a través del tiempo hasta las 12 h; este fue el máximo intervalo de lectura de la densidad celular. En el caso del crecimiento bacteriano en los medios DS y PD, la fase exponencial se prolongó, al igual que la fase estacionaria, aunque no se pudo concluir que medio es mejor, ya que sólo se tuvo un intervalo de lecturas cada 2 h hasta llegar a 12 h, por lo que se propuso evaluar el crecimiento de las bacterias en los cinco medios, pero en estado sólido.

## 7.2. Condiciones óptimas en la interacción bacteria-hongo

Este experimento se hizo para seleccionar un medio sólido de interacción para llevar a cabo el escrutinio de rizobacterias frente a hongos de la PPA, ya que, con los resultados del experimento anterior se estableció que las rizobacterias crecen de forma distinta en diferentes medios líquidos. Además, desconocíamos si los hongos podían crecer en estos mismos medios, por lo que se evaluó el crecimiento microbiano de las 16 bacterias y los 11 hongos de la PPA de forma independiente en medios sólidos: MH, APD, ADS, MH:APD (1:1 p/p) y MH:ADS (1:1 p/p).

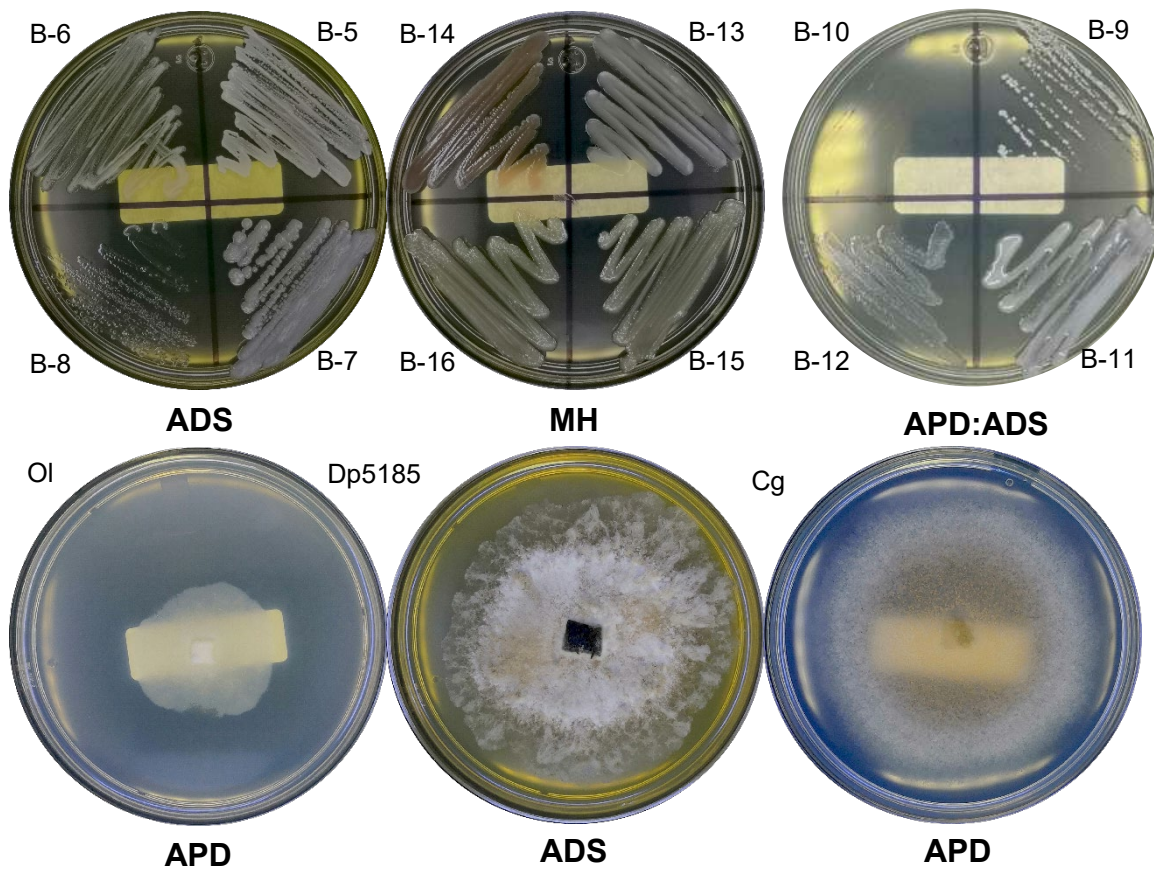
Además de lo anterior, la variable temperatura se incluyó en el experimento: 25 ° y 37 °C para seleccionar la temperatura óptima de interacción. La primera temperatura evaluada se debe a que la mayoría de los hongos ensayados en laboratorio crecen a temperaturas ambientales, que aproximadamente es 25 °C. La segunda temperatura seleccionada se debe a que la mayoría de las bacterias mesófilas crecen a 37 °C y aunque estas bacterias son extremófilas, tienen la capacidad de crecer en las dos condiciones (**Tabla 5**). En la **Fig. 16** se muestran fotografías representativas de este experimento.

Las bacterias crecieron en casi todas las condiciones propuestas con excepción del aislado bacteriano B-10, el cual no creció en el medio ADS y en la mezcla MH:ADS en las dos condiciones de temperatura. Los hongos sólo crecieron en APD a 25 °C. Con lo anterior se concluyó que un factor limitante en nuestro escrutinio será el hongo, ya que, si este no se desarrolla de forma adecuada, podrían presentarse falsos positivos, así que, el medio APD y la condición de temperatura de 25 °C se seleccionaron como variables óptimas en la interacción bacteria-hongo de la PPA.



**Tabla 5.** Elección de las condiciones de interacción microbiana: sustrato y temperatura.

Microorganismos		Medio									
		MH		APD		ADS		MH:APD		MH:ADS	
		Temperatura (°C)									
		25	37	25	37	25	37	25	37	25	37
<b>Hongos</b>	Ca 5446, Ca 10, Ca 21, Ca 25, Cg, Ol, Pv 5120 y Pv 5480	×	×	✓	×	×	×	×	×	×	×
	Csp, Dp 5185 y Dp 4461	×	×	✓	×	✓	×	×	×	×	×
<b>Bacterias</b>	B-1 a B-9 y B-11 a B-16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	B-10	✓	✓	✓	✓	×	×	✓	✓	×	×



**Figura 16.** Imágenes representativas de la evaluación del crecimiento de hongos (Ol, Dp5185 y Cg) y bacterias (B-1 a B-14) en diferentes medios sólidos de crecimiento (MH, APD, ADS y APD:ADS).

**Tabla 6.** Cuantificación del crecimiento de hongos de la pudrición peduncular del aguacate (PPA) en placa. Los datos son promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE  $n = 3$ . Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ).

Hongo	Velocidad de crecimiento
Ca 5446	$2.28 \pm 0.09$ cb
Ca 10	$2.84 \pm 0.09$ c
Ca 21	$1.50 \pm 0.15$ a
Ca 25	$2.82 \pm 0.07$ c
Cg	$5.63 \pm 0.24$ e
Csp	$4.28 \pm 0.15$ d
Dp 5185	$1.59 \pm 0.11$ ab
Dp 4461	$1.55 \pm 0.09$ a
OI	$2.67 \pm 0.14$ c
Pv 5120	$4.11 \pm 0.29$ d
Pv 5480	$1.54 \pm 0.05$ a

Finalmente, el crecimiento colonial de cada uno de los hongos se cuantificó en el medio de cultivo previamente seleccionado. La pendiente de la curva de crecimiento fúngico linealizada se reporta en la **Tabla 6**, un valor de pendiente  $> 1$  es crecimiento rápido, mientras que  $< 1$  es crecimiento lento. Entre los hongos de crecimiento rápido en medio sólido destacó *Colletotrichum gloeosporioides*, asimismo, el grupo de 4 cepas de *Colletotrichum acutatum* del cual Ca 10 fue el de crecimiento más rápido, al menos de forma numérica. Lo anterior nos sirvió para establecer un tiempo adecuado para cuantificar posteriormente el grado de inhibición de cada hongo.

### 7.3. La morfología colonial y microscópica de los posibles antagonistas bacterianos rizosféricos

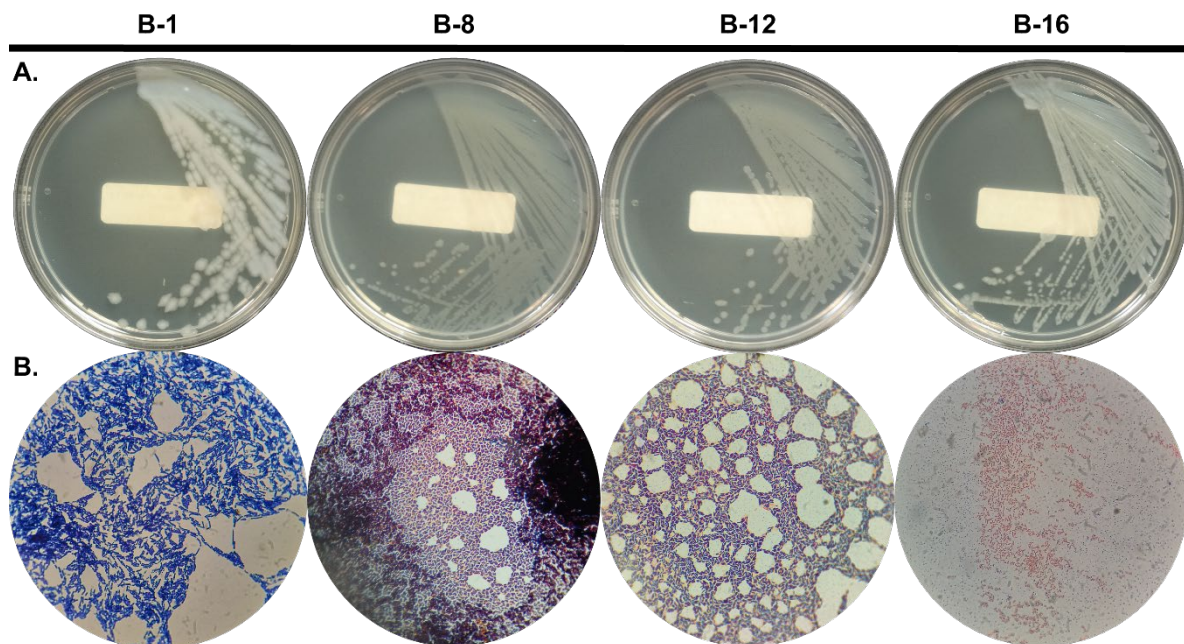
Algunos aspectos del crecimiento de los aislados bacterianos se muestran en la **Tabla 7**, por otro lado, en la **Fig. 17** se esquematizan microfotografías de la tinción Gram de cuatro bacterias, las cuales representan el universo de estudio de las 16 bacterias. La morfología macro y microscópica se reportó a partir de los cultivos bacterianos en medio MH, medio en el que se encuentran conservadas las bacterias en el Laboratorio de Fisiología Celular.

En cuanto a la morfología colonial, todas las bacterias presentaron diferentes características de crecimiento, las formas bacterianas fueron irregulares, circulares, puntiformes. El borde para algunas fue lobulado o filamentososo, pero, para la mayoría

fue entero. La elevación colonial sólo fue plana o convexa. El color en todas fue blanco, aunque cada una presentó características ópticas diferentes, ya que algunas fueron opacas y otras brillantes.

**Tabla 7.** Características morfológicas en el crecimiento de cultivos bacterianos rizosféricos.

Clave	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	Color	Pigmento	Propiedad óptica	Tinción Gram	Forma	Asociación
B-1	Irregular	Lobulado	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Cadenas
B-2	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Blanco	Np	Brillante	-	Cocos	Sarcinas
B-3	Irregular	Lobulado	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Cadenas
B-4	Irregular	Filamentoso	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Cadenas
B-5	Irregular	Lobulado	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Cadenas
B-6	Puntiforme	Entero	Convexa	Mucoide	Blanco	Np	Brillante	-	Bacilos	Irregular
B-7	Irregular	Entero	Convexa	Mucoide	Blanco	Np	Opaca	-	Bacilos	Irregular
B-8	Circular	Entero	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Diplobacilos
B-9	Irregular	Lobulado	Plana	Cremosa	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Irregular
B-10	Circular	Entero	Plana	Seca	Blanco	Np	Brillante	+	Bacilos	Cadenas
B-11	Circular	Ondulado	Convexa	Mucoide	Blanco	Np	Brillante	-	Bacilos	Irregular
B-12	Circular	Ondulado	Plana	Seca	Blanco	Np	Opaca	+	Bacilos	Irregular
B-13	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Blanco	Np	Brillante	-	Bacilos	Cadenas
B-14	Circular	Ondulado	Convexa	Cremosa	Blanco-rojo	Blanco-rojo	Brillante	+	Bacilos	Irregular
B-15	Irregular	Ondulado	Convexa	Cremosa	Blanco	Np	Brillante	-	Bacilos	Irregular
B-16	Irregular	Lobulado	Plana	Mucoide	Blanco	Np	Brillante	-	Bacilos	Irregular



**Figura 17.** Morfología colonial y microscópica de bacterias rizosféricas. **A.** Crecimiento en placa en medio MH. **B.** Tinción Gram.

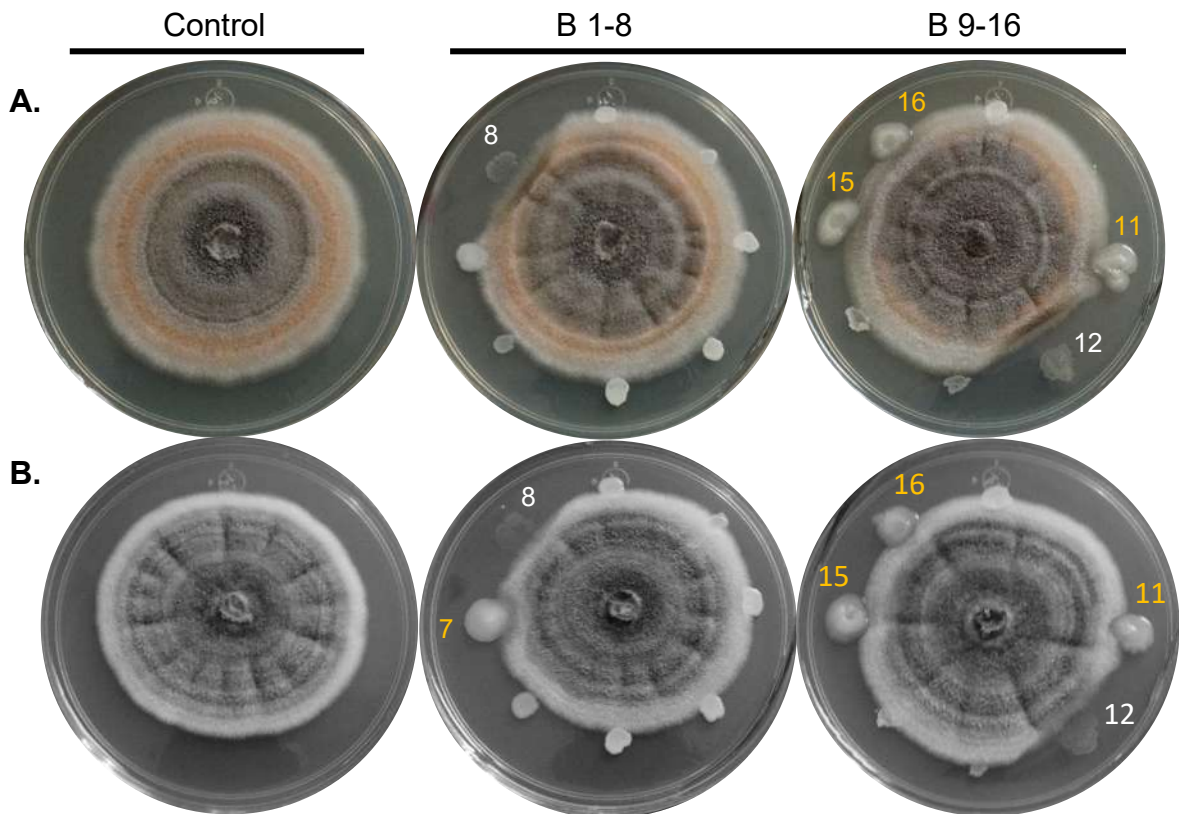
En cuanto a la morfología microscópica, 9 de las 16 bacterias fueron Gram positivas (G+), por otro lado 7 fueron Gram negativas (G-), las bacterias presentaron formas

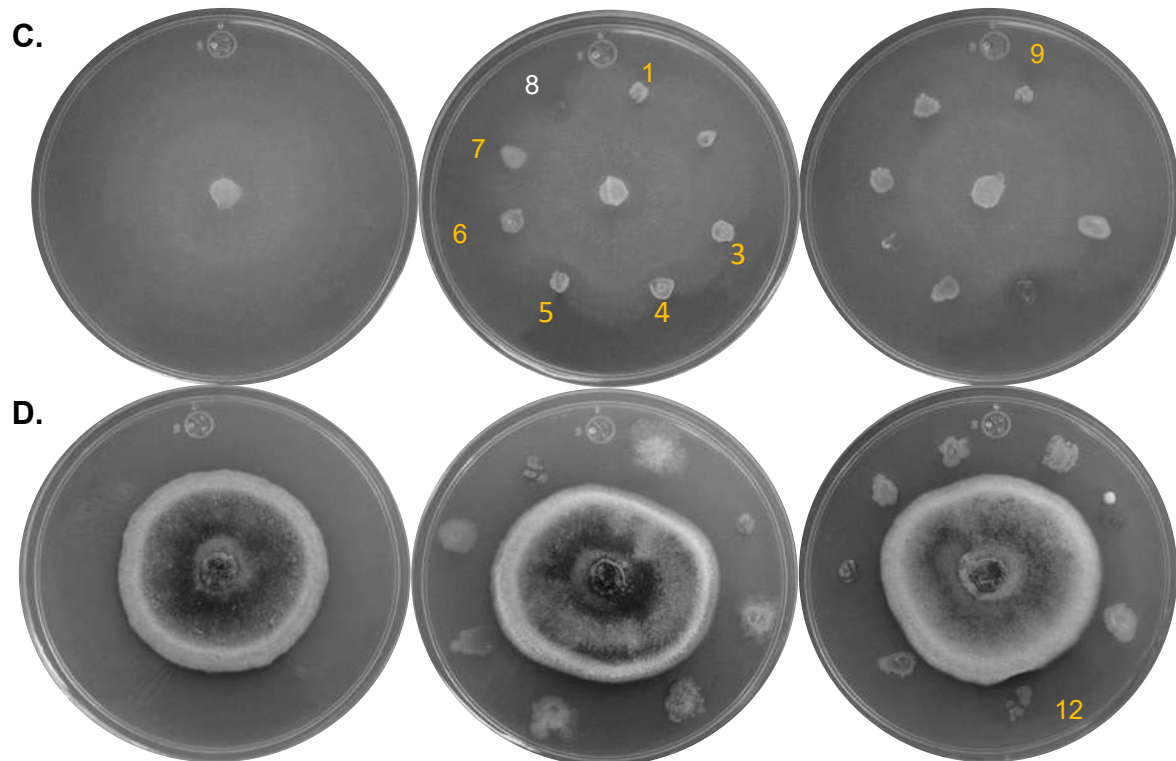
bacilares, conocidas actualmente como forma de bastones y otras bacterias tienen forma de coco. Los dos tipos de formas bacterianas presentaron diferentes asociaciones, la más común fue en cadenas, otras tantas en sarcinas o diplobacilos y muchas otras su tipo de asociación fue irregular.

#### 7.4. La búsqueda de candidatos bacterianos que antagonicen a hongos de la pudrición peduncular de aguacate

La selección de los mejores antagonistas bacterianos de 11 hongos de la PPA se hizo en el medio de interacción y temperatura seleccionadas: APD a 25 °C, 8 bacterias por placa frente a 1 hongo.

En la búsqueda del o los mejores prospectos como agentes de control biológico (ACB) bacterianos se seleccionaron aquellas que inhibieran el crecimiento colonial de los hongos de la PPA al retrasar el crecimiento normal del patógeno (se comparó con el control de crecimiento). Esto se manifestó mediante un halo de inhibición, como se puede observar en la **Fig. 18**.





**Figura 18.** Determinación de los prospectos de ACB bacterianos por un ensayo *in vitro* de bacterias frente a los hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA): **A.** Ca 5446. **B.** Ca 10. **C.** Ol. **D.** Pv 5120. Los números en blanco indican las bacterias que presentaron mejor actividad antagonista frente a los hongos. Los números amarillos indican las bacterias que tienen menor capacidad antagonista.

Dos bacterias del grupo ensayado cumplieron este criterio de selección (B-8 y B-12), adicionalmente las cepas B-1 y B-16 se incluyeron con la finalidad de contrastar los efectos observados *in vitro* en la interacción 1 a 1, por tanto, los prospectos de ACB bacterianos fueron cuatro: B-1, B-8, B-12 y B-16.

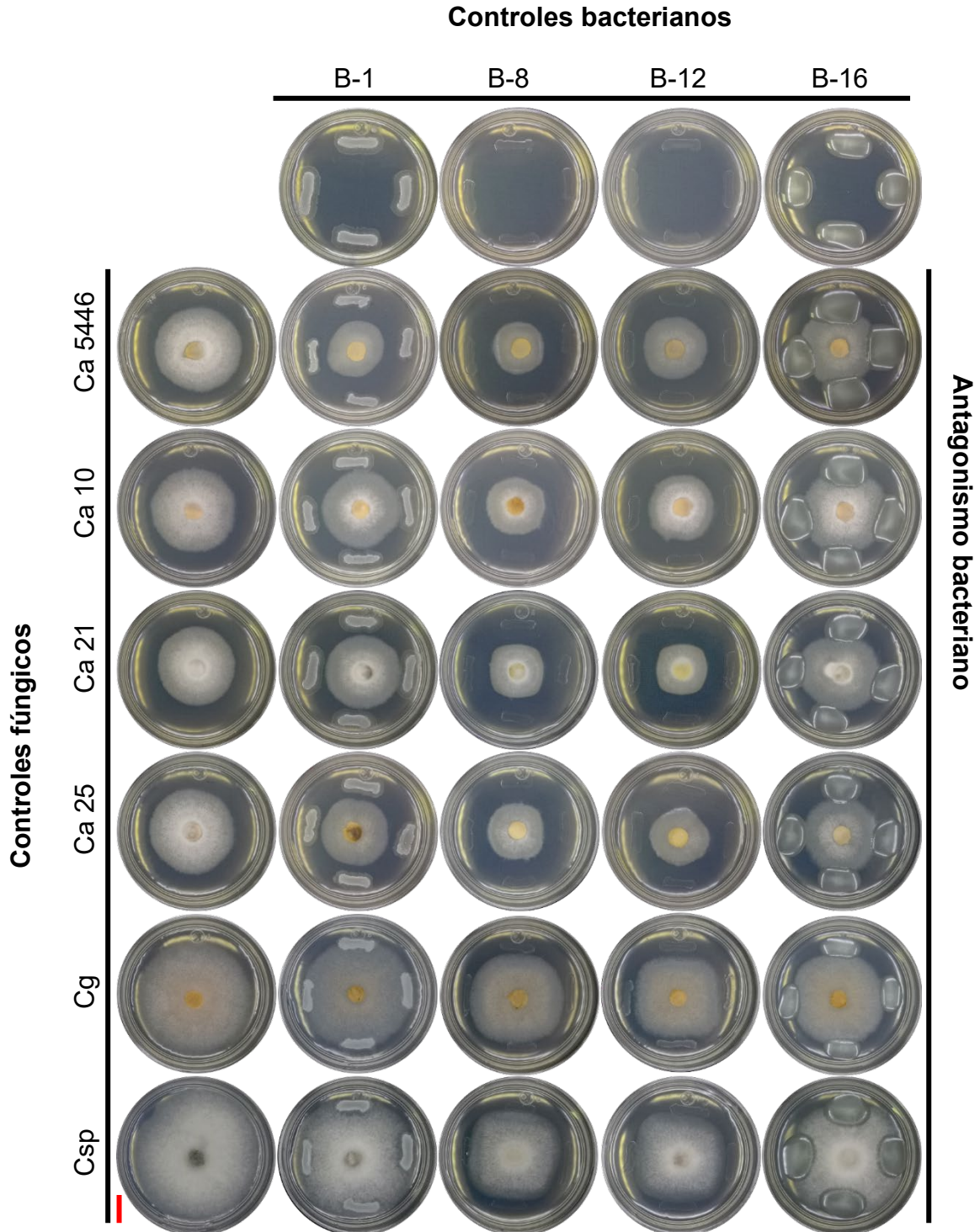
### **7.5. Los prospectos de agentes de control biológico bacterianos antagonizan a hongos de la pudrición peduncular de aguacate**

El experimento de antagonismo bacteriano se realizó con la confrontación 1 a 1 de una bacteria prospecto a ACB bacteriano frente a un hongo en medio sólido. Este patrón experimental se repitió para cada uno de los 4 prospectos de ACB bacterianos (B-1, B-8, B-12 y B-16) frente a cada uno de los 11 hongos de la PPA.

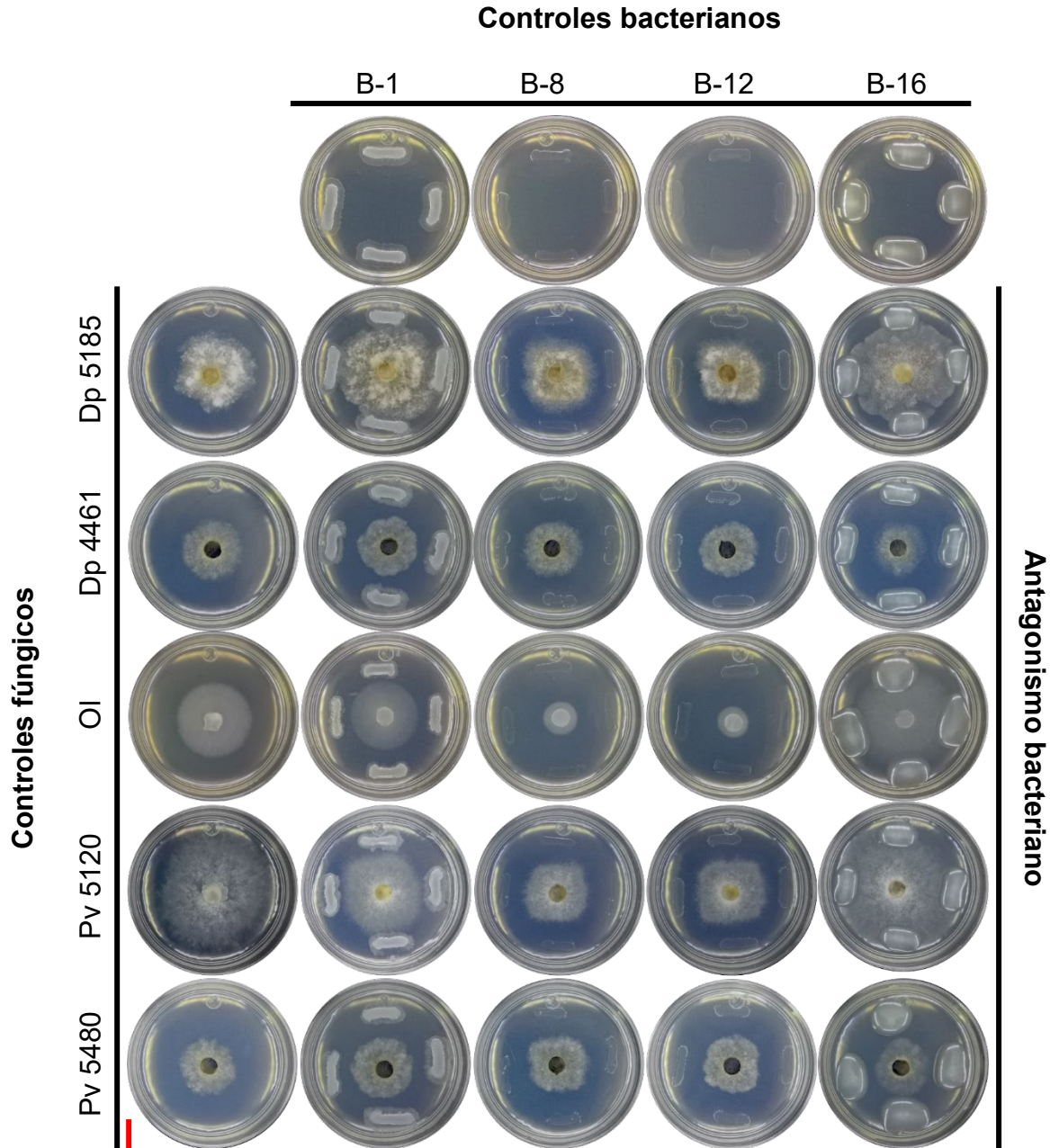
Las cepas 5185 y 4461 de *D. phaseolorum* y *P. viticola* 5480 no fueron inhibidos por ninguna bacteria, *D. phaseolorum* 4461 fue inhibido de forma estadísticamente significativa por B-16 con un IC de 0.85. Para *D. phaseolorum* 5185, *Oligoporus* sp. y *P. viticola* 5120 se observó un aumento en su IC: 1.95, 1.90 y 1.18, respectivamente (**Tabla 8**), indicativo de que el tratamiento promovió su crecimiento. Ocho de los once hongos de la PPA fueron inhibidos al menos por dos de los cuatro tratamientos bacterianos, un caso de esto fue *Oligoporus* sp. frente a la bacteria B-8, ya que tuvo un IC de 0.39 y de 0.33 frente a B-12, frente a B-1 su IC fue de 0.94. Lo anterior lo clasifica como el hongo más sensible, ya que se presentaron IC cercanos a la inhibición total por dos de los cuatro tratamientos bacterianos. *P. viticola* 5120 fue inhibido por B-8 y B-12 con IC de 0.62 y 0.59, respectivamente, con significancia estadística.

Los metabolomas bacterianos en Ca 5446 (**Fig. 19**) modificaron el crecimiento colonial con respecto al blanco. Las moléculas bacterianas de naturaleza difusible y por COVs indujeron al hongo a crecer embebido en el medio de cultivo, por lo que se infirió que las bacterias secretan sustancias inhibitorias del crecimiento fúngico, esto fue evidente frente al tratamiento con las bacterias B-8 y B-12.

En el caso frente a B-16, el efecto observado fue inhibición por secreción de compuestos difusibles en el medio y/o competencia por espacio, ya que, el crecimiento del hongo rodea y evita la presencia de la bacteria. Los IC de este hongo fueron de 0.57, 0.48, 0.60 y 0.67, respectivamente, para cada una de las bacterias. Para la cepa 10 fue distinto, ya que el IC frente a B-1 fue 0.95 lo cual no representa algún efecto, debido a que, con la desviación estándar el IC llega a 1. Frente a B-8, B-12 y B-16 los IC fueron de 0.61, 0.65 y 0.79, respectivamente, lo que significa una restricción en el crecimiento. El hongo *C. acutatum* 21 fue inhibido por B-1, B-8 y B-12 con IC de 0.85, 0.66 y 0.62, frente a B-16 no se presentó el efecto buscado (IC de 1.02). Finalmente, la cepa 25 fue inhibida por B-8, B-12 y B-16 con IC de 0.59, 0.58 y 0.76, respectivamente, y no presentó efecto frente a B-1 (IC de 0.91). Los hongos Cg y Csp fueron sensibles a los metabolomas bacterianos, en el caso de Cg este creció por encima de las bacterias. En los hongos Csp, Dp 5185, Dp 4461, Pv 5120 y Pv 5480 se presentó un crecimiento fúngico restringido del micelio aéreo y el vegetativo creció embebido en el agar frente a los tratamientos B-8 y B-12. El género *Colletotrichum* (Ca 5446, Ca 10, Ca 21, Ca 25, Cg y Csp) fue inhibido por completo por los cuatro aislados bacterianos (**Tabla 8**), el IC de los hongos Ca 5446, Ca10 y Ca25 fue el más bajo de forma significativa frente a los tratamientos de B-8 y B-12.



**Figura 19.** Inhibición del crecimiento de hongos de la PPA por acción del metaboloma extracelular de bacterias antagonicas. Las inhibiciones de los hongos se registraron a los 4 d post-inoculación. La barra roja indica la escala de las fotos (1 cm).



**Figura 19 (Continuación).** Inhibición del crecimiento de hongos de la PPA por acción del metaboloma extracelular de bacterias antagónicas. Las inhibiciones de los hongos se registraron a los 4 d post-inoculación. La barra roja indica la escala de las fotos (1 cm).

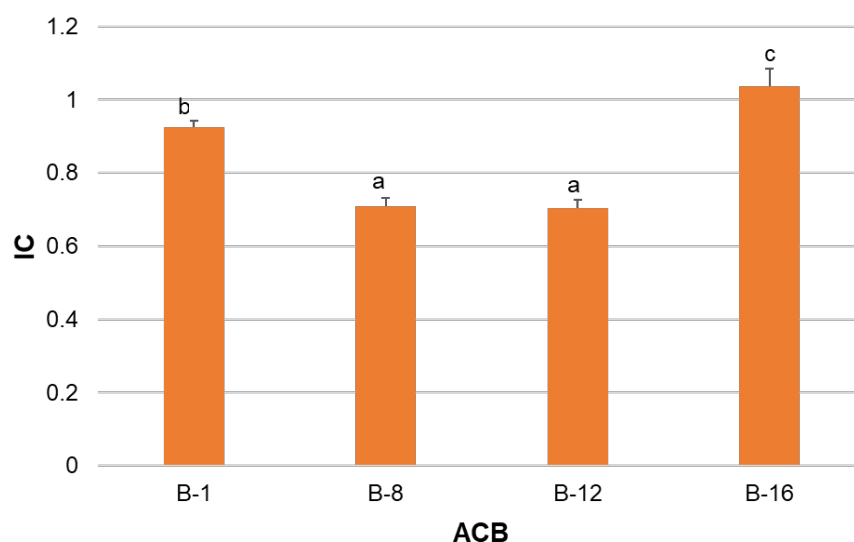
En los hongos *Diaporthe phaseolorum* (5185 y 4461) y *Phomopsis viticola* 5480 no se presentó un efecto inhibitorio. En el caso Pv 5120, este fue sensible a los metabolomas de las bacterias B-8 y B-12.



**Tabla 8.** Sensibilidad del crecimiento fúngico en interacción bacteriana representada con el índice de crecimiento (IC) de hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA). Los datos son promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE con  $n = 9$ . Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ). El IC se reportó a los 4 d post-inoculación.

Hongo	IC			
	B-1	B-8	B-12	B-16
<b>Ca 5446</b>	0.57 $\pm$ 0.04ab	0.48 $\pm$ 0.03a	0.60 $\pm$ 0.04ab	0.67 $\pm$ 0.04b
<b>Ca 10</b>	0.95 $\pm$ 0.03c	0.61 $\pm$ 0.02a	0.65 $\pm$ 0.03a	0.79 $\pm$ 0.01b
<b>Ca 21</b>	0.85 $\pm$ 0.10ab	0.66 $\pm$ 0.03a	0.62 $\pm$ 0.01a	1.02 $\pm$ 0.05b
<b>Ca 25</b>	0.91 $\pm$ 0.03c	0.59 $\pm$ 0.01a	0.58 $\pm$ 0.02a	0.76 $\pm$ 0.05b
<b>Cg</b>	0.89 $\pm$ 0.02c	0.73 $\pm$ 0.01b	0.66 $\pm$ 0.02ab	0.62 $\pm$ 0.01a
<b>Csp</b>	0.99 $\pm$ 0.03b	0.71 $\pm$ 0.03a	0.70 $\pm$ 0.03a	0.64 $\pm$ 0.02a
<b>Dp 5185</b>	1.01 $\pm$ 0.08a	0.91 $\pm$ 0.07a	0.95 $\pm$ 0.09a	1.95 $\pm$ 0.11b
<b>Dp 4461</b>	1.01 $\pm$ 0.03b	0.99 $\pm$ 0.02b	0.96 $\pm$ 0.03ab	0.85 $\pm$ 0.03a
<b>OI</b>	0.94 $\pm$ 0.03b	0.39 $\pm$ 0.02a	0.33 $\pm$ 0.01a	1.90 $\pm$ 0.06c
<b>Pv 5120</b>	0.95 $\pm$ 0.02b	0.62 $\pm$ 0.04a	0.59 $\pm$ 0.02a	1.18 $\pm$ 0.02c
<b>Pv 5480</b>	1.03 $\pm$ 0.02a	1.06 $\pm$ 1.04a	1.05 $\pm$ 0.03a	0.97 $\pm$ 0.04a

Para determinar qué candidato a ACB fue más exitoso, un análisis ANOVA factorial con post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ) se realizó (**Fig. 20**), el resultado fue que el efecto de las bacterias B-8 y B-12 es similar, seguido de la bacteria B-1 y al final la bacteria B-16. Aunque, el efecto antifúngico que exhiben las bacterias es interesante, desconocemos si hay un efecto diferencial debido a los metabolitos secretados; es decir, que sean únicamente compuestos difusibles, COVs o ambos.



**Figura 20.** Efecto antagónico diferencial de los prospectos de agentes de control biológico (ACB) bacterianos. Los datos son promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE  $n = 9$ ; letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ).

Para saber si los prospectos de ACB bacterianos pertenecen a esta clase de microorganismos se establecieron dos criterios de selección:

1. Cada bacteria prospecto a ser ACB debe inhibir al menos el 70% de los patógenos.
2. El IC de los hongos inhibidos debe ser  $< 1$  (inhibición).

Las bacterias B-8 y B-12 cumplieron con ellos, los hongos antagonizados con un IC  $< 1$  fueron Ca 10 y OI, pero se decidió continuar el estudio con las cuatro bacterias, ya que son útiles para contrastar el efecto antagónico bacteriano sobre los patógenos fúngicos.

Una interrogante surgió: ¿este efecto se debe también por compuestos orgánicos volátiles (COVs) o únicamente por compuestos difusibles?, para responder a esto se estableció un nuevo experimento debido a que, la confrontación microbiana sucede en la misma placa de agar papa dextrosa se realizó un experimento en placas divididas para evaluar la respuesta a COVs.

## **7.6. Los compuestos orgánicos volátiles de los agentes de control biológico bacterianos inhiben el crecimiento de hongos de la pudrición peduncular del aguacate**

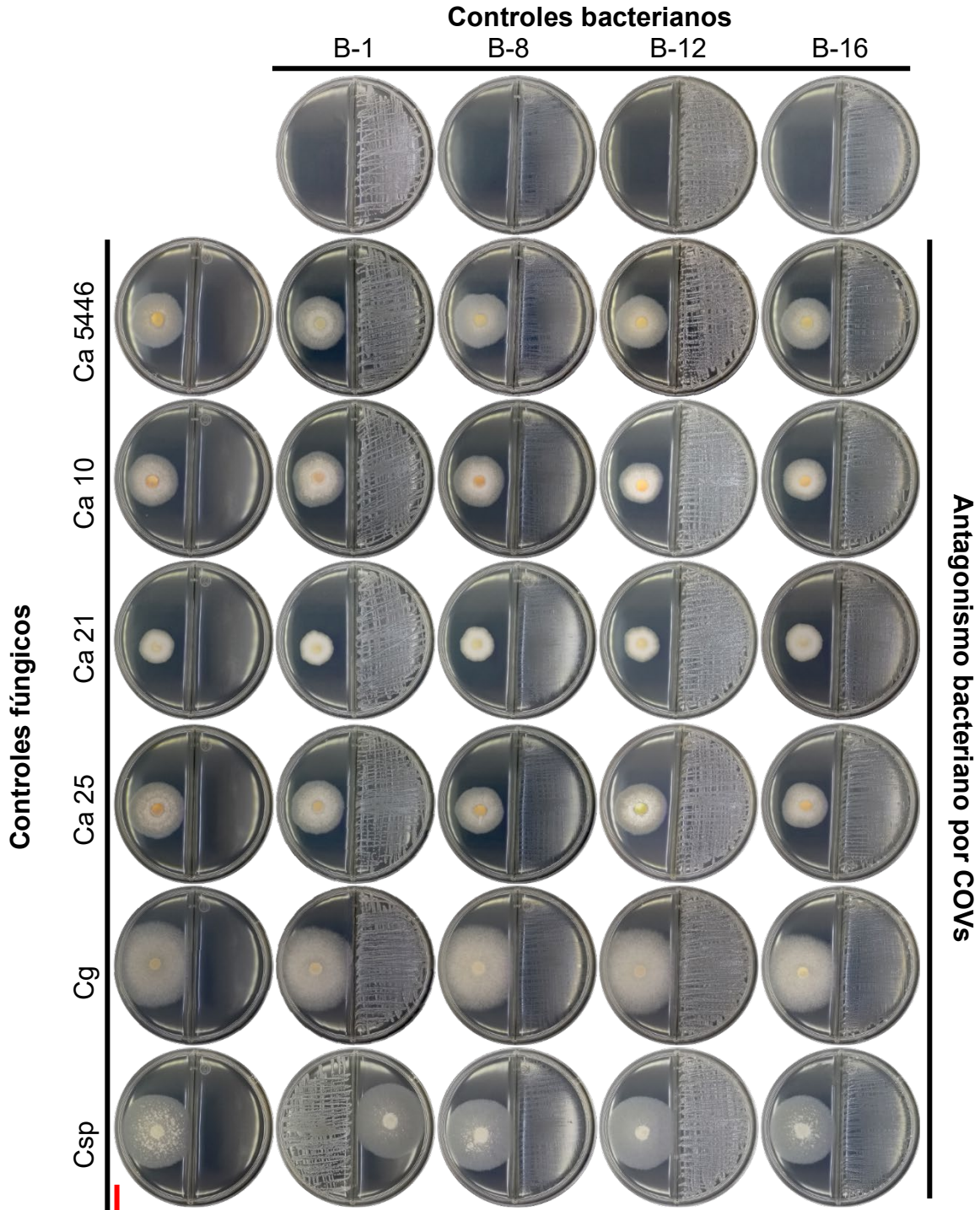
Los hongos Ca 5446, Ca 21, Ca 25, Cg, Csp, Dp 5185, Dp 4461, OI, Pv 5120 y Pv 5480 fueron insensibles a los COVs bacterianos (**Fig. 21**). No se observaron diferencias significativas entre COVs bacterianos ya que el valor de IC fue cercano a 1 (**Tabla 9**). Dentro del grupo de cepas de *C. acutatum*, todos los aislados (Ca 5446, Ca 10, Ca 21 y Ca 25) fueron inhibidos numéricamente por al menos 3 de los 4 tratamientos. La cepa Ca 10 se destacó por su sensibilidad frente a los ACB bacterianos B-8 y B-12 (IC de 0.71, 0.83). Con la finalidad de reducir nuestro universo de estudio y quedarnos con un hongo para evaluar el efecto diferencial de metabolitos bacterianos particulares sobre el patógeno se establecieron dos criterios:

1. El patógeno debe ser inhibido (IC  $< 1$ ) al menos por dos de los cuatro tratamientos bacterianos.
2. Dentro de los hongos inhibidos, se selecciona el de crecimiento rápido.

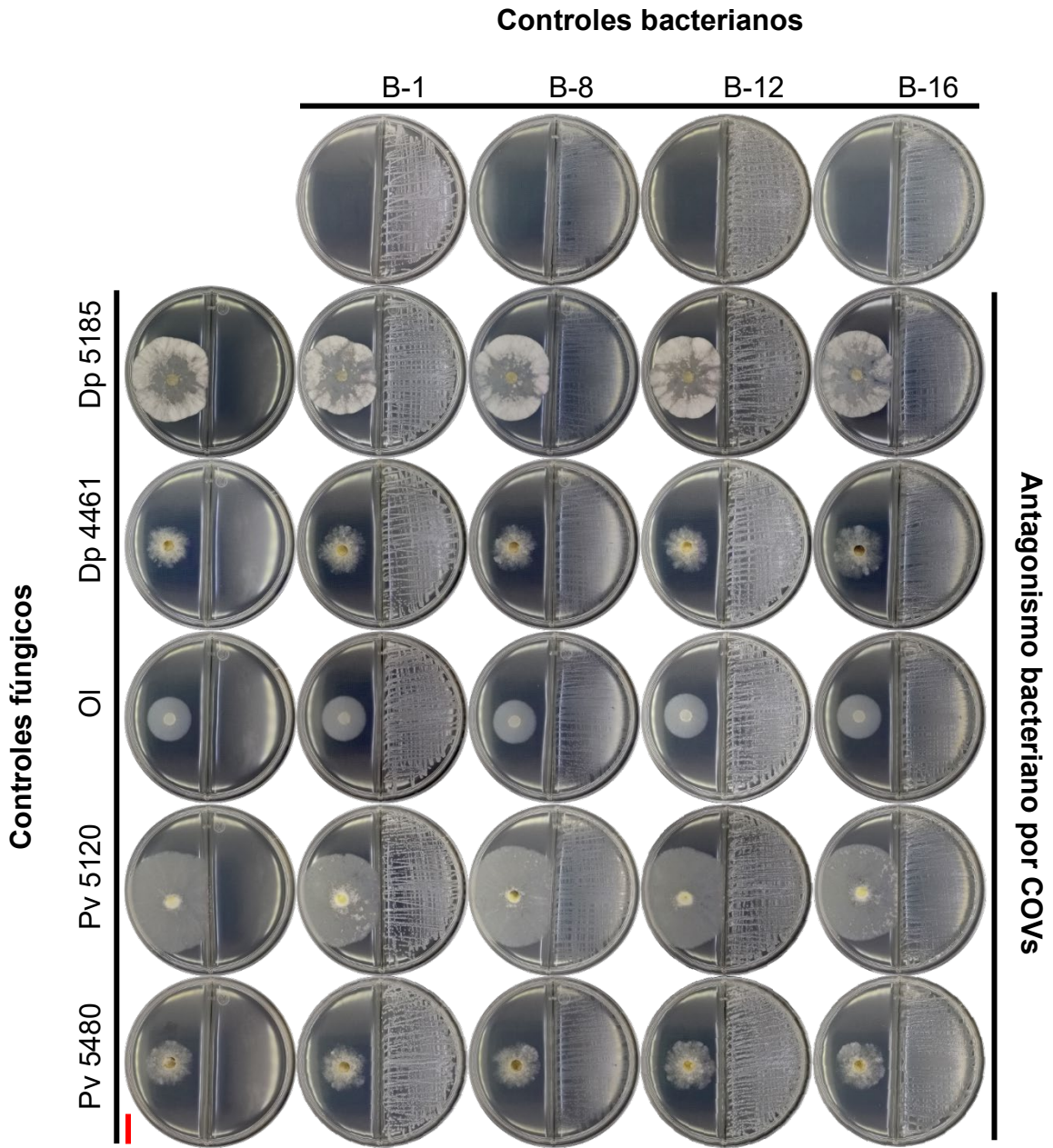
**Tabla 9.** Sensibilidad del crecimiento fúngico en interacción por compuestos orgánicos volátiles (COVs) de bacterias antagónicas representada como el índice de crecimiento (IC) de hongos de la pudrición peduncular de aguacate (PPA). Los datos son promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  EE con  $n = 9$ . Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas, Tukey ( $p < 0.05$ ). El IC se reportó a los 4 d post-inoculación.

Hongo	IC			
	B-1	B-8	B-12	B-16
<b>Ca 5446</b>	0.90 $\pm$ 0.02a	0.86 $\pm$ 0.03a	0.92 $\pm$ 0.02a	0.85 $\pm$ 0.03a
<b>Ca 10</b>	0.84 $\pm$ 0.03b	0.71 $\pm$ 0.01a	0.83 $\pm$ 0.02b	0.83 $\pm$ 0.02b
<b>Ca 21</b>	0.78 $\pm$ 0.02a	0.91 $\pm$ 0.07a	0.94 $\pm$ 0.06a	0.79 $\pm$ 0.07a
<b>Ca 25</b>	0.88 $\pm$ 0.03ab	0.84 $\pm$ 0.02a	0.87 $\pm$ 0.03ab	0.99 $\pm$ 0.03b
<b>Cg</b>	0.93 $\pm$ 0.01a	0.89 $\pm$ 0.03a	0.90 $\pm$ 0.02a	0.91 $\pm$ 0.01a
<b>Csp</b>	0.98 $\pm$ 0.00a	0.97 $\pm$ 0.03a	1.01 $\pm$ 0.00a	1.02 $\pm$ 0.01a
<b>Dp 5185</b>	0.95 $\pm$ 0.03a	1.19 $\pm$ 0.02c	1.05 $\pm$ 0.01b	0.96 $\pm$ 0.01ab
<b>Dp 4461</b>	0.87 $\pm$ 0.03a	0.96 $\pm$ 0.05a	0.98 $\pm$ 0.04a	1.01 $\pm$ 0.06a
<b>OI</b>	0.91 $\pm$ 0.04ab	0.85 $\pm$ 0.05ab	0.80 $\pm$ 0.04a	1.03 $\pm$ 0.06b
<b>Pv 5120</b>	0.84 $\pm$ 0.01ab	0.78 $\pm$ 0.02a	0.95 $\pm$ 0.03b	0.87 $\pm$ 0.03ab
<b>Pv 5480</b>	1.13 $\pm$ 0.07ab	1.17 $\pm$ 0.04b	0.92 $\pm$ 0.06a	1.03 0.05ab

Los hongos Ca 5446 y Ca 10 cumplieron con los criterios de selección, ya que son sensibles al menos a dos de las cuatro bacterias. El hongo de crecimiento rápido y resistente Ca 10 se seleccionó, ya que fue el hongo con inhibición en confrontación 1 a 1 y por COVs, además, de interés resultó que fuera inhibido ya que en los antecedentes directos este fue el hongo más resistente a tratamientos químicos



**Figura 21.** Control en el crecimiento fúngico por compuestos orgánicos volátiles (COVs) bacterianos. Las inhibiciones de los hongos se registraron a los 4 d post-inoculación. La barra roja indica la escala de las fotos (1 cm).



**Figura 21 (Continuación).** Control en el crecimiento fúngico por compuestos orgánicos volátiles (COVs) bacterianos. Las inhibiciones de los hongos se registraron a los 4 d post-inoculación. La barra roja indica la escala de las fotos (1 cm).

## 8. Discusión

La pudrición peduncular del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) se produce en post-cosecha por la penetración de hongos fitopatógenos y la promoción del crecimiento de hongos endófitos en el fruto. Los signos de enfermedad inician como manchas de putrefacción café oscuro a negro (Espinoza-Madrigal *et al.*, 2021) que se extienden al mesocarpio (pulpa) y con ello disminuye su valor comercial (Ploetz, 2003; Guarnaccia *et al.*, 2017; Espinoza-Madrigal *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2019). Los agentes etiológicos reportados son diversos, en México destacó un consorcio de hongos entre los que se encuentran: *Colletotrichum* spp., *Oligoporus* sp., *Diaporthe* spp. y *Phomopsis* spp. (Vidales-Fernández y Sánchez-Pérez, 1991; Ochoa, 2009; Espinoza-Madrigal *et al.*, 2018; Mendoza-Vázquez *et al.*, 2019). *Colletotrichum acutatum* destaca del resto, ya que es una especie fúngica multirresistente categorizada como principal patógeno en enfermedades como la antracnosis y la PPA (Damm *et al.*, 2012; Espinoza Madrigal *et al.*, 2021). El género fúngico *Colletotrichum* se conforma de alrededor de 700 especies, además, este fue enlistado en el octavo lugar de una lista de diez patógenos fúngicos de mayor prevalencia y relevancia en cultivos de interés económico (Dean *et al.*, 2012).

Es de gran interés el control de la PPA ya que, la producción nacional del fruto aportó cerca de 50 mil millones de pesos para el 2020 (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2020). Producción en la cual, Michoacán contribuyó con el 75% de la producción (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2018). De forma tradicional, se trata a la enfermedad con fungicidas aplicados en pre-cosecha, pero, estos tratamientos generan efectos adversos en la salud humana y al medio ambiente (Campos-Martínez *et al.*, 2016; Shimshoni *et al.*, 2020). En nuestro grupo de trabajo Espinoza-Madrigal (2018) demostró que dentro de los géneros fúngicos que ocasionan la PPA, el grupo de aislados de *Colletotrichum acutatum* destacó del resto: en específico la cepa 10, debido a que, al evaluar la acción de compuestos químicos comúnmente empleados en el tratamiento del patógeno, esta cepa presentó resistencia. Además, es el patógeno con mayor incidencia en la enfermedad de la PPA en aguacate (Espinoza Madrigal *et al.*, 2021). Por lo anterior, las investigaciones se han centrado en buscar alternativas para reemplazar el uso de fungicidas en post-cosecha.

En búsqueda de otra opción al tratamiento químico de patógenos fúngicos de plantas se planteó una alternativa de control biológico, específicamente con el uso de bacterias (ACB: agente de control biológico) antagonistas y/o por su metaboloma bacteriano antifúngico (MBA) (Sengar y Singh, 2018).



Los ACB de forma popular son los organismos o partes de ellos que controlan la población de otros organismos (plaga). En este estudio se planteó el uso de las rizobacterias, ya que tienen capacidad de sintetizar diferentes clases de compuestos que potencialmente inhiben el crecimiento de patógenos entre ellos a los hongos (Tofazzal *et al.*, 2019). Los ACB deben de ser amigables con el medio ambiente e inocuos para el ser humano, animales y para microorganismos benéficos (Montesinos, 2003). En este trabajo el universo de estudio fue el metaboloma de rizobacterias extremófilas y el mecanismo antagónico de antibiosis, que es la acción inhibitoria del crecimiento fúngico por el MBA de naturaleza difusible y por compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Brahmaprakash *et al.*, 2017). Por lo anterior, el estudio partió de seleccionar rizobacterias prospectos de inhibición de patógenos fúngicos, las cuales se aislaron del desierto de Chihuahua en un previo estudio (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2017).

Unas de las características de las bacterias de esta zona extrema es que se suponemos que se desarrollan en condiciones ambientales hostiles límites de pH, temperatura, concentración de sal, sequía y de nutrientes. Además, bacterias y plantas establecen una interacción de competencia por espacio y nutrientes (Raddadi *et al.*, 2015), por lo que, la capacidad de suprimir el crecimiento de patógenos debe de ser fuerte. Dado lo anterior, el interés fue buscar y caracterizar un metaboloma extracelular rizobacteriano con capacidad antagónica en el control de los hongos de la PPA, ya que no existen estudios al respecto de moléculas particulares provenientes de bacterias que inhiban este tipo de patógenos fúngicos del aguacate.

El medio de cultivo sólido para el óptimo crecimiento microbiano en la confrontación es determinante. Ambos grupos microbianos crecieron adecuadamente en el medio APD, por lo que el factor limitante en la interacción de hongos frente a bacterias son los hongos, ya que, estos sólo crecieron de forma idónea en el medio de APD a 25 °C, por lo que decidimos optar por este medio y esta temperatura para llevar a cabo los experimentos de confrontación. En la literatura existen reportes de este tipo de selección de medios, acordando en la mayoría en optar por el medio APD. Confrontaciones como *Bacillus subtilis* frente *Botryosphaeria dothidea* (Fan *et al.*, 2017), la de *B. amyloliquefaciens* B14 frente a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) (Sabaté *et al.*, 2018), o frente a *Botrytis cinerea* (Salvatierra-Martinez *et al.*, 2018) tienen en común esta elección de cultivo.

Posteriormente, el crecimiento en placa de cada uno de los 11 hongos de la PPA se cuantificó, lo que resultó en un crecimiento más rápido con una pendiente de

2.84 (de forma numérica) para *C. acutatum* 10, patógeno fúngico con mayor resistencia frente a tratamientos químicos (Espinoza Madrigal *et al.*, 2021).

En el ensayo de escrutinio, las bacterias con mejor capacidad antagónica de hongos fueron los aislados: B-8 y B-12, ya que inhibieron a la mayoría de los hongos de la PPA, pero, también seleccionamos a B-1 y B-16 para continuar con la confrontación 1 a 1.

En el experimento de interacción bacteria-hongo se observó un control diferencial de los metabolomas bacterianos en el crecimiento fúngico: unos, lo promovieron, otros no provocaron cambios y otros los inhibieron. Asimismo, variabilidad fúngica se observó en la respuesta a los metabolomas entre e intra especie. Interesantemente, *Colletotrichum* spp. fueron sensibles a los metabolomas bacterianos. Tanto *C. gloeosporioides* como *Colletotrichum* sp. fueron inhibidos por tres de los cuatro tratamientos bacterianos: en específico por B-8, B-12 y B-16. Con IC para el primer hongo de 0.73, 0.66 y 0.62, respectivamente, y de 0.71, 0.70 y 0.64 para *Colletotrichum* sp. Mientras que el grupo de *C. acutatum* (5446, 10, 21 y 25) se observó variabilidad en la respuesta a los metabolomas bacterianos. Lo anterior resulta interesante y más si lo contrastamos con los resultados que obtuvo Espinoza Madrigal *et al.*, (2021), ya que se demostró la resistencia tratamientos químicos sobre los hongos de la PPA. Estudio en el cual se destacó *Oligoporus* sp., debido a que fue sensible frente a los fungicidas Bankit, CuSO<sub>4</sub> y Tecto 60 con IC de 0.61, 0.29 y 0.36, respectivamente. La sensibilidad de esta especie fúngica se conservó, pero esta vez frente a tratamientos bacterianos. *C. acutatum* 10 exhibió resistencia a Benlate, CuSO<sub>4</sub> y Tecto 60 con IC de 0.90, 0.85 y 0.85, respectivamente, pero en la confrontación 1 a 1 frente a bacterias, este hongo fue sensible a 3 de los 4 tratamientos. Es un efecto directo de biocontrol por parte de estas bacterias, de las cuales se conocen distintos mecanismos antagónicos de acción. En la literatura existen reportes en el tratamiento de diversos patógenos como: *Fusarium oxysporum*, *D. phaseolorum*, *Rhizoctonia solani* y *C. acutatum*, los cuales fueron antagonizados por la cepa UM96 de *Bacillus* sp. con porcentajes de inhibición de 22, 32, 35 y 46%, respectivamente (Martinez-Absalon *et al.*, 2012). En otro estudio se ensayaron siete aislados del género *Bacillus*, cuyo origen fue la rizósfera de plantas del arroz (*Oryza sativa* L.). Estos se enfrentaron con los patógenos fúngicos del arroz *Curvularia* sp. (Boed) y *Pyricularia grisea* (Sacc.), que fueron inhibidos por los tratamientos de los aislados bacterianos de *Bacillus* spp. JRRB7 y JRRB9, con porcentajes de inhibición de 80 y 90%, respectivamente frente al primer patógeno y de 85% por los aislados bacterianos JRRB2, JRRB3, JRRB7 y JRRB9 frente al segundo patógeno (Tejera *et al.*, 2012). En otra investigación, cuatro bacterias aisladas de la rizósfera de caña y arroz se identificaron



molecularmente: *Pseudomonas fluorescens* PC4, *Stenotrophomonas rhizophila* PC9, *P. fragi* PC11 y *Azospirillum lipoferum* PCJ2. Estas cepas se evaluaron frente a *Phytophthora capsici*, un oomiceto que ocasiona la enfermedad de la pudrición de la raíz, que es una patología recurrente del pimiento morrón (*Capsicum annuum*). Este patógeno fue inhibido por un 54, 30 y 50% por las bacterias: *P. fluorescens* PC4, *S. rhizophila* PC9 y *A. lipoferum* PCJ2 (Ramírez *et al.*, 2015). Por otro lado, y en búsqueda de inhibir a patógenos fúngicos del género *Fusarium* spp. que ocasionan la marchitez del chile habanero (*Capsicum chinense*). El efecto inhibitorio por 10 cepas de *Bacillus* spp. frente a *F. equiseti* ITCF1 y *F. solani* ITCF2 se evaluó con resultados satisfactorios en todos los tratamientos y porcentajes de inhibición de 21.28 y 71.70% (Mejía-Bautista *et al.*, 2016).

Los hongos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* sp. son considerados como los fitopatógenos de mayor incidencia y devastación en cultivos de interés económico. Actualmente no existe un tratamiento que sea eco amigable, que no genere resistencia entre patógenos y sobre todo que sea inocuo para el ser humano, por lo cual, el uso de bacterias en el tratamiento de patógenos es una alternativa viable. *Bacillus* spp. es uno de los géneros bacterianos que se utiliza como biofungicida, ya que posee distintos mecanismos de acción, pero su principal característica es que son inocuas al ser humano. En un estudio realizado por Arroyave-Toro *et al.*, (2017) se evaluó el efecto inhibitorio por parte de *Bacillus subtilis* EA-CB0015 frente a *B. cinerea* y *C. acutatum*, los cuales fueron antagonizados con un 33.9 y 67.5%, respectivamente.

En algunos casos de antagonismo se deben a competencia de espacio, ya que, el hongo solo crece alrededor de las bacterias formando un halo de inhibición alrededor de sus colonias, mientras que, en otros casos se atribuyó a la secreción de compuestos inhibitorios de naturaleza difusible y/o volátil, debido a que, el medio de confrontación fue el mismo. Por otro lado, algunas bacterias generan un efecto de inhibición en la formación de micelio aéreo y disminución del crecimiento en general, lo que puede deberse a la secreción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) bacterianos.

Hasta este punto evaluamos únicamente el efecto en interacción directa; es decir, en la misma caja Petri, por lo cual, no sabíamos si el fenómeno observado sólo fue un efecto sinérgico entre compuestos difusibles y COVs. Para resolver esto se realizó un experimento en placas divididas, en las cuales se inoculó de forma independiente un hongo en un lado de la caja y en el otro la bacteria, a su vez, dos criterios de selección se establecieron para identificar un aislado fúngico con el cual continuar el análisis con mayor profundidad. En el caso de *Colletotrichum acutatum*

10 se presentaron IC de 0.84, 0.71, 0.83 y 0.83 frente a B-1, B-8, B-12 y B-16, respectivamente, por lo cual, este hongo si fue inhibido por COVs bacterianos en todos los casos y de forma sobresaliente frente a B-8 (IC de 0.71), dado lo anterior, estos dos últimos hongos cumplieron con nuestro primer criterio de selección, ya que fueron inhibidos por al menos dos de los cuatro tratamientos por COVs bacterianos. Pero el segundo criterio, el cual fue seleccionar el hongo de crecimiento rápido entre los mejores candidatos. *C. acutatum* 10 tuvo un pendiente de crecimiento de 2.84, en el caso de la cepa 5446 fue de 2.28. Por lo que se decidió optar por la cepa 10, aunque, no se presentó significancia estadística con respecto a la otra cepa.

Esto es interesante, sobre todo al contrastar los resultados con los de la confrontación directa, y más aún, con los antecedentes ya que *C. acutatum* 10 se reportó como el patógeno con mayor incidencia en ser agente etiológico de la PPA en aguacate en Michoacán (Espinoza-Madrigal *et al.*, 2018). Además de ser resistente frente a tratamientos químicos, por lo que esta alternativa eco amigable de ACB bacterianos resulta promisoría en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo que este hongo es sensible a COVs bacterianos fue interesante y decidimos continuar con un análisis detallado de los compuestos presentes en esta interacción.

## 9. Conclusión

Los metabolomas extracelulares difusibles y volátiles de las rizobacterias *Bacillus halotolerans* B-8 y *Bacillus* sp B-12 antagonizaron el crecimiento micelial del hongo resistente *Colletotrichum acutatum*, un agente causal de la pudrición del fruto de aguacate.

## 10. Literatura citada

- Abdallah, D. Ben, Frikha-Gargouri, O., y Tounsi, S. (2018). Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. *Biological Control*, 124(January), 61–67.
- Arroyave-Toro, J. J., Mosquera, S., y Villegas-Escobar, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114(7), 195–200.
- Bergh, B. O. (2013). NORMA DEL CODEX PARA EL AGUACATE (CODEX STAN 197-1995). *CODEX STAN 197*, 1–5.
- Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., y Marinelli, F. (2018). Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*, 36(3), 818–838.
- Bill, M., Sivakumar, D., Thompson, A. K., y Korsten, L. (2014). Avocado Fruit Quality Management during the Postharvest Supply Chain. *Food Reviews International*, 30(3), 169–202.
- Bowers, K. J., Mesbah, N. M., y Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5(1), 1–8.
- Brahmaprakash, G. P., Kumar Sahu, P., Lavanya, G., Nair, S. S., Gangaraddi, V. K., y Gupta, A. (2017). Microbial Functions of the Rhizosphere. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological* (Vol. 1).
- Campos-Martínez, A., Velázquez-del Valle, M. G., Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J. A., y Hernández-Lauzardo, A. N. (2016). Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. *Crop Protection*, 89, 101–104.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., y Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3).
- Chen, G. Q., y Jiang, X. R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 94–100.
- Cochrane, S. A., y Vederas, J. C. (2014). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews*, 36(1), 4–31.
- Curl, C. L., Spivak, M., Phinney, R., y Montrose, L. (2020). Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. *Current Environmental*



*Health Reports*, 7(1), 13–29.

Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., y Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113.

Darvas, J., y Kotze, J. (1987). Fungi associated with pre-and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica*, 19(1), 83–85.

Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430.

Demoz, B. T. (2005). *ALTERNATIVE APPLICATION METHODS OF ANTAGONISTS TO AVOCADO FLOWERS TO CONTROL STEM-END ROT PATHOGENS BY*.

Devi, A. R., Sharma, G. D., Majumdar, P. B., y Pandey, P. (2018). A multispecies consortium of bacteria having plant growth promotion and antifungal activities, for the management of *Fusarium* wilt complex disease in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16(October), 614–624.

Espinoza Madrigal, R. M., Del Río Torres, R., Flores García, A., y Martínez Pacheco, M. M. (2018). Potassium Bicarbonate on Stem End Root Avocado (*Persea americana* Mill. Var Hass). *Transylvanian Review*, XXVI(30), 9.

Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., y Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89–97.

FAO. (2012). Directrices sobre la prevención y manejo de la resistencia a los plaguicidas. In *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación* (Vol. 3).

Flores-Fernández, M. L., Zavaleta, A. I., y Chávez-Hidalgo, E. L. (2010). Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana - San Martín. *Ciencia e Investigación*, 13(2), 88–92.

Fuentes-Aragón, D., Juárez-Vázquez, S. B., Vargas-Hernández, M., y Silva-Rojas, H. V. (2018). *Colletotrichum fructicola*, a Member of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. “Hass.” *Mycobiology*, 46(2), 92–100.

Galsurker, O., Diskin, S., Maurer, D., Feygenberg, O., y Alkan, N. (2018). Fruit stem-end rot. *Horticulturae*, 4(4), 1–16.

González, F. B., de los angeles Beltan Camacho, V., del Carmen Colin Olmos, M., y Vandame, R. (2018). *Highly Hazardous Pesticides in Mexico*. 1–181.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., y Patra, J. K. (2018).

- Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206(August 2017), 131–140.
- Guarnaccia, V., Aiello, D., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Susca, A., Epifani, F., y Perrone, G. (2016). Characterisation of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado fruit in Italy. *Acta Horticulturae*, 1144, 133–139.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Polizzi, G., y Crous, P. W. (2017). High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39(December), 32–50.
- Guarnaccia, Vladimiro, Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G., y Polizzi, G. (2016a). Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 146(4), 963–976.
- Guarnaccia, Vladimiro, Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G., y Polizzi, G. (2016b). Characterisation of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado fruit in Italy. *Acta Horticulturae*, 1144, 133–139.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Sneh, S. K., y Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial y Biochemical Technology*, 07(02), 96–102.
- Hartill, W. F. T. (1991). Post-harvest diseases of avocado fruits in new zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 19(3), 297–304.
- Hartill, W. F. T., y Everett, K. R. (2002). Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of 'Hass' avocado (*Persea americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(4), 249–260.
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M. G., y Hernández-Lauzardo, A. N. (2006). Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 42–49.
- Herrera-González, Juan Antonio; Zapien-Ramos, Juan Esteban; Vite-Hernández, Maureen Yamile y Mercado-Silva, E. (2017). *Enfermedades Postcosecha De Aguacate 'Hass' En*. 126–134.
- Hopkirk, G., White, A., Beever, D. J., y Forbes, S. K. (1994). Influence of postharvest temperatures and the rate of fruit ripening on internal postharvest rots and disorders of new zealand 'hass' avocado fruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(3), 305–311.
- Hurtado-Fernández, E., Fernández-Gutiérrez, A., y Carrasco-Pancorbo, A. (2018). Avocado fruit— *Persea americana*. *Exotic Fruits*, 37–48.
- Jiménez-Vázquez, K. R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R.,

- Ruiz-Herrera, L. F., Ramos-Acosta, B. P., Coria-Arellano, J. L., Sáenz-Mata, J., y López-Bucio, J. (2020). The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *Plant Journal*, 103(5), 1639–1654.
- Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., Kulabuhova, D., y Maksimov, I. (2019). *Bacillus* spp.: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. In *Plants* (Vol. 8, Issue 4, pp. 1–24).
- Lim, L., Mohd, M. H., y Zakaria, L. (2019). Identification and pathogenicity of *Diaporthe* species associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 155(2), 687–696.
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541–556.
- Madrigal-Espinoza, R. M. (2019). *Control de la pudrición peduncular del fruto de aguacate (Persea americana Mill. cv Hass) con derivados vegetales*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Márquez, C. J., Yepes, D. P., De Alimentos, I., Sanchez, L., Quimica, I., y Osorio, J. A. (2014). CAMBIOS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill. cv. Hass) EN POSCOSECHA PARA DOS MUNICIPIOS DE ANTIOQUIA CHANGES PHYSICAL-CHEMICAL OF AVOCADO (*Persea americana* Mill. cv. Hass) IN POSTHARVEST FOR TWO MUNICIPALITIES OF A. *Temas Agrarios*, 19(1), 32–47.
- Martinez-Absalon, S. C., del C Orozco-Mosqueda, M., Martinez-Pacheco, M. M., Farias-Rodriguez, R., Govindappa, M., y Santoyo, G. (2012). Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 11(3), 2665–2673.
- Mejía-Bautista, M. Á., Reyes-Ramírez, A., Cristobal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., Borges-Gómez, L. D. C., y Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 34(3), 208–222.
- Mendoza-Vázquez, M. A., Espinoza-Madrigal, R. M., Muñoz-Parra, E., Flores-García, A., Huerta-Venegas, P. I., Ruiz-Herrera, L. F., Martínez-Pacheco, M., y López-Bucio, J. (2019). Growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(7–8), 681–697.
- Mohanram, S., y Kumar, P. (2019). Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. *Annals of Microbiology*, 69(4), 307–320.
- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6(4), 245–252.

- Morath, S. U., Hung, R., y Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2–3), 73–83.
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., y Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83.
- Obianom, C., y Sivakumar, D. (2018). Natural plant volatiles as an alternative approach to control stem-end rot in avocado cultivars. *Journal of Phytopathology*, 166(1), 1–9.
- Ochoa Ascencio, S. (2009). Enfermedades poscosecha del fruto de aguacate. *III Congreso Latinoamericano Del Aguacate*, 2–14.
- OMS. (2010). Exposure To Highly Hazardous Pesticides : a Major Public Health Concern. *WHO Document Production Services*.
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-Pacheco, M., y Velázquez-Becerra, C. (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 219–228.
- Orrieta-Fernández, y Larrea-Vega. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, 62, 96–100.
- Pal, K. K., y Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094. *The Plant Health Instructor*, 1–25.
- Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J. L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., Castañeda-Gaytán, G., y Sáenz-Mata, J. (2017). Halophilic rhizobacteria from *Distichlis spicata* promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, 73(3), 179–189.
- Pérez-Jiménez, R. M. (2008). Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(1), 1–24.
- Pérez, M. A., Navarro, H., y Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: Problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(SPEC.ISSUE), 45–64.
- Ploetz, R. C. (2003). *Diseases of Tropical Fruit Crops*.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., y Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907–7913.
- Rahman, S. F., Ab, S., Singha, E., Pieterseb, C. M. J., y Schenka, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267(November 2017), 102–111.



- Ramírez, C., Soto, Z., Castro, L., Arauz, L. F., Uribe Lorío, L., y Uribe, L. (2015). Efecto de cuatro rizobacterias promotoras de crecimiento sobre la pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*). *Agronomía Costarricense*, 39(3), 87–100.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M. del C., Macías-Rodríguez, L., y Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13(January), 46–52.
- Sabaté, D. C., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., y Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research*, 211(October 2017), 21–30.
- SADER. (2019). *Reporte del mercado de aguacate*. 1–17.
- SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. In *Planeación Agrícola Nacional* (Vol. 1, pp. 1–63).
- SAGARPA, S. (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018. In *Atlas Agroalimentario*.
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., y Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 601–612.
- Sapbamrer, R., y Thammachai, A. (2020). Factors affecting use of personal protective equipment and pesticide safety practices: A systematic review. *Environmental Research*, 185(January), 109444.
- Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A. I., Palmateer, A. J., Lopez, P., y Soleymani, A. (2018). In Vitro Evaluation of Eight Plant Essential Oils for Controlling *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Fusarium* and *Phytophthora* Fruit Rots of Avocado, Mango and Papaya. *Plant Protection Science*, 54(3), 153–162.
- Sarkhosh, A., Vargas, A. I., Schaffer, B., Palmateer, A. J., Lopez, P., Soleymani, A., y Farzaneh, M. (2017). Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit with plant-extracted oils. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 16–22.
- Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., y Whiley, A. W. (2012). *The Avocado Botany, Production and Uses*.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, P. y A. (2017). *NORMA Oficial Mexicana NOM-082-SAG-FITO/SSA1-2017. Límites máximos de residuos. Lineamientos técnicos y procedimiento de autorización y revisión*. 1–11.
- Secretaría de Economía. (2016). *México es el principal productor y exportador de aguacate en el mundo*. Gob.Mx.

- Sengar, R. S., y Singh, A. (2018). Bioformulation and Fluid Bed Drying: A New Approach Towards an Improved Biofertilizer Formulation. In *Eco-friendly Agro-biological Techniques for Enhancing Crop Productivity*.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Panorama agroalimentario 2019. In *Secretaría de agricultura y Desarrollo social*.
- Sharma, A., Diwevidi, V. D., Singh, S., Pawar, K. K., Jerman, M., Singh, L. B., Singh, S., y Srivastawa, D. (2013). Biological Control and its Important in Agriculture. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(3), 175–180.
- Sharma, R. R., Singh, D., y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221.
- Shimshoni, J. A., Bommuraj, V., Chen, Y., Sperling, R., Barel, S., Feygenberg, O., Maurer, D., y Alkan, N. (2020). Postharvest fungicide for avocado fruits: Antifungal efficacy and peel to pulp distribution kinetics. *Foods*, 9(2), 1–13.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Cierre de La Producción Agrícola.
- Social, S. del T. y P. (1999). NORMA Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999, Actividades agrícolas-Uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición vegetal o fertilizantes-Condiciones de seguridad e higiene. *Diario Oficial de La Federación*, 1–14.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosh, R., y Hagen, K. S. (1959). The Integration of Chemical and Biological Control of the Spotted Alfalfa Aphid. *Journal of Petrology*, 29(2), 79–101.
- Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Carvalho, C. R., De Snoo, G. R., y Eden, P. (2001). Ecological impacts of arable intensification in Europe. *Journal of Environmental Management*, 63(4), 337–365.
- Storey, W. B., Bergh, B., y Zentmyer, G. A. (1986). The Origin , Indigenous Range , and Dissemination of the Avocado. *California Avocado Association. Annual Report*, 70, 127–133.
- Tan, S. Y., y Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Medical Journal*, 56(7), 366–367.
- Tejera, B., Heydrich, M., y Rojas, M. M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 117–122.
- Tilocca, B., Cao, A., y Migheli, Q. (2020). Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(February).
- Tofazzal Islam, M., Mahfuz Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M. H., y Haesaert,

- G. (2019). *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol*.
- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E., y Eskalen, A. (2013). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*, 97(12), 1580–1584.
- Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E., y Hyde, K. D. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity*, 61(1), 165–179.
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C., y Valencia-Cantero, E. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*, 250(6), 1251–1262.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadias, M., Torres, R., y Usall, J. (2013). Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. *Innovaciones Fisiológicas y Tecnológicas de La Maduración Postrecolección de Frutas y Hortalizas*, 263–373.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., y Takabe, T. (2016). Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology*, 2(1), 42–54.
- Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1–4), 357–364.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(SPEC. ISS. MAR.), 487–511.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., y Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3–10.
- Yáñez-Mendizábal, V., y Falconí, C. E. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on *Andean lupin* seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, 122(December 2017), 67–75.
- Yang, X., y Hong, C. (2018). Biological control of boxwood blight by *Pseudomonas protegens* recovered from recycling irrigation systems. *Biological Control*, 124(January), 68–73.

## 11. Apéndice

### Participación en congresos:

1. **Hernández-Izquierdo, A.**, Flores-García, A., López-Bucio, J.L., Martínez-Pacheco, M.M. (2019). ANTAGONISMO BACTERIANO EN EL CONTROL DE HONGOS DE LA PUDRICIÓN PEDUNCULAR DE AGUACATE. (Ponencia). 14vo Congreso Estatal de Ciencia Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
2. **Hernández-Izquierdo, A.**, Flores-García, A., López-Bucio, J.L., Martínez-Pacheco, M.M. (2020). ANTAGONISMO BACTERIANO POR COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN EL CONTROL DE UN HONGO DE LA PUDRICIÓN PEDUNCULAR DE AGUACATE. (Ponencia). 15vo Congreso Estatal de Ciencia Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
3. **Hernández-Izquierdo, A.** (2020). Asistente. II Congreso en Ciencias Agronómicas Aplicadas y IV Encuentro Nacional de la Red de Vinculación de SOMUCAAB. AC, Realizado de forma virtual.
4. **Hernández-Izquierdo, A.**, Flores-García, A., López-Bucio, J.L., Martínez-Pacheco, M.M. (2021). Secretoma bacteriano como control de hongos fitopatógenos del fruto de Aguacate (*Persea americana* Mill). (Ponencia cartel). 16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Zacatecas, Zacatecas, México.

### Participación en una publicación durante la realización de este trabajo:

Ramírez-López, C. B., Beltrán-Sánchez, R., **Hernández-Izquierdo, A.**, Salvador-Hernández, J. L., Salcedo-Pérez, E., Del Río, R. E., y Pacheco, M. M. M. (2021). Antifeedant Activity of *Caesalpinia coriaria* Essential Oil Against *Incisitermes marginipennis* (Latreille). *Phyton*, 90(3), 907.