



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS IDENTIFICADOS A
PARTIR DEL SISTEMA TRIPARTITA DE *TRICHODERMA* SP./*COLLETOTRICHUM*
GLOEOSPORIOIDES/*BACILLUS SUBTILIS* SOBRE LOS AGENTES CAUSALES DE LA
ANTRACNOSIS DEL AGUACATE *IN VITRO* Y *EX VIVO*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

I.B.Q. EMANUEL RAMÍREZ VIGIL

ASESOR

D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

CO-ASESOR

D.C. MAURICIO NAHUAM CHÁVEZ AVILÉS

Morelia Mich. a febrero 2023



Resumen

México es el principal productor y exportador de aguacate a nivel mundial, sin embargo, existen factores tanto abióticos como bióticos que disminuyen la producción del fruto, entre estos factores se encuentra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*, que son considerados como los principales fitopatógenos que afectan la producción del aguacate.

Aunque se han implementado medidas de control (utilización de pesticidas a base de cobre, remoción de partes afectadas, etc.) para prevenir y/o eliminar al patógeno, no se obtienen resultados favorables, y en algunos casos como en la utilización de pesticidas se presentan problemas secundarios, ya que los patógenos generan resistencia a estas sustancias, ocurre la migración de los pesticidas en las cadenas tróficas, etc. por estas razones se buscan alternativas que sean amigables con el medio ambiente.

En este sentido *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* son agentes de biocontrol reconocidos por la diversidad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica que producen.

Con base en lo anterior se investigó la eficacia de los compuestos orgánicos identificados en los extractos hexánicos producidos por la co-inoculación de *Trichoderma* sp./*Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*,

Los compuestos orgánicos probados fueron el butirato de etilo, ácido acético, 2-butoxietanol, 3,5-Di-Tert-butilo-4-hidroxibenzaldehído, ácido palmítico y ácido esteárico.

Al evaluar la actividad frente a los patógenos, en los bioensayos, los compuestos generaron efectos sobre la morfología y desarrollo del micelio de los patógenos como: inhibición del crecimiento radial, formación de vesículas y formación de colonias laxas. Por todo lo anterior, se concluye que la interacción entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* en co-cultivo produce compuestos orgánicos difusibles novedosos, con actividad antifúngica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*.

Palabras clave: fitopatógenos, biocontrol, metabolitos, bioensayos, vesículas

Abstract

Mexico is the main producer and exporter of avocado worldwide, however, there are both abiotic and biotic factors that decrease fruit production, among these factors are *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*, which are considered the main phytopathogens affecting avocado production.

Although control measures have been implemented (such as the use of copper-based pesticides, removal of affected parts, etc.) to prevent and/or eliminate the pathogen. However, favorable results haven't been obtained, and in some cases the use of pesticides has presented secondary problems by themselves, since the pathogens are capable to generate resistance to these substances, the migration of pesticides in the trophic chains occurs, etc. for these reasons alternatives that are friendly with the environment are in high necessity.

In this sense, *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* are biocontrol agents recognized for the wide diversity of secondary metabolites with antifungal activity that they can produce. Based on this, the efficacy of organic compounds identified in the hexane extracts produced by co-inoculation of *Trichoderma* sp./*Bacillus subtilis* over the growth and development of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* was investigated,

The organic compounds tested were ethyl butyrate, acetic acid, 2-butoxyethanol, 3,5-Di-Tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde, palmitic acid and stearic acid.

When evaluating the activity against the pathogens in the bioassays, the compounds generated effects on the morphology and mycelial development of the pathogens such as: inhibition of radial growth, vesicle formation and formation of lax colonies. Therefore, it is concluded that the interaction between *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* in co-culture is able to produce novel diffusible organic compounds with effective antifungal activity on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum*.

Key words: plant pathogens, biocontrol, metabolites, bioassays, vesicles.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Aguacate.....	3
1.2. Mercado internacional del aguacate	4
1.3. Producción nacional	4
1.4. Etapa de poscosecha.....	5
1.5. Antracnosis.....	6
1.5.1. Métodos de control.....	9
1.5.1.1 Control físico.....	9
1.5.1.2. Control químico.....	9
1.5.1.3. Control biológico.....	10
2. Antecedentes	12
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivo general	21
5.1. Objetivos específicos.....	21
6. Metodología	22
6. Resultados	26
6.1. Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	26
6.2 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	35
6.3 Evaluación <i>ex vivo</i> de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	41
7. Discusión.....	44
7.1 Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	44
7.2 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	49
7.3. Evaluación <i>ex vivo</i> de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de <i>Colletotrichum</i>	52
Conclusión.....	54
7. Bibliografía	55

Índice de figuras

Fig. 1 Cadena productiva de la comercialización del aguacate.....	5
Fig. 2 Ciclo de vida general de las especies de <i>Colletotrichum</i>	8
Fig. 3 Papel multifacético de los metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i>	12
Fig. 4 Compuestos activos aislados de <i>B. subtilis</i>	13
Fig. 5 Comparación de la inhibición ejercido por <i>Trichoderma</i> sp. en presencia de <i>B. subtilis</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i> en medio PDA.	14
Fig. 6 Efecto de los extractos hexánicos obtenidos de la co-inoculación de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>B. subtilis</i> sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i>	15
Fig. 8 Efecto del acetato de butilo sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i>	17
Fig. 9 Efecto de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i>	28
Fig. 10 Análisis morfológico de la colonia fúngica de <i>C. gloeosporioides</i> después de la exposición a los compuestos orgánicos.	29
Fig. 11 Análisis morfológico de la colonia fúngica de <i>C. acutatum</i> después de la exposición a los compuestos orgánicos.	31
Fig. 12 Micrografías de hifas de <i>C. gloeosporioides</i> crecidas en medio suplementado con los compuestos orgánicos.	32
Fig. 13 Micrografías de hifas de <i>C. acutatum</i> crecidas en medio suplementado con los compuestos orgánicos.	33
Fig. 14 Efecto de los compuestos orgánicos en el adelgazamiento de las hifas de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i>	34
Fig. 15 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre las especies del género <i>Colletotrichum</i>	37
Fig. 16 Análisis del efecto de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre <i>C. gloeosporioides</i>	39
Fig. 17 Análisis del efecto de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre <i>C. acutatum</i>	40
Fig. 18 Análisis del efecto de las mezclas de los compuestos orgánicos <i>ex vivo</i> sobre las cepas de <i>Colletotrichum</i>	42

Índice de tablas

Tabla 1 Enfermedades en el fruto de aguacate en la etapa poscosecha..... 6

Tabla 2 Compuestos de fracciones de TLC identificados usando GC-MS 16

1. Introducción

Aproximadamente 40% de la producción mundial de alimentos se pierde o destruye debido a insectos, enfermedades y malezas (Sánchez, 2019). Las plagas no sólo reducen la producción agrícola, sino que también disminuyen la calidad de los cultivos, lo cual genera grandes repercusiones al reducir los ingresos agrícolas (Agroasemex, 2019; FAO, 2001).

Los efectos de las plagas en la producción agrícola pueden ir acompañados por efectos en la oferta y la demanda. A través de la demanda, se refleja en los países que producen para la exportación o que desean exportar, ya que al excluir totalmente la exportación de productos de las áreas afectadas o condicionando su comercialización con una serie de medidas de precaución, se puede provocar un efecto económico mayor que las propias pérdidas directas de la producción (FAO, 2001).

El deseo de tener acceso a mercados de exportación rentables es sin duda lo que motiva muchos de los esfuerzos de erradicación de plagas y enfermedades. Sin embargo, esto se convierte en un problema cuando se utilizan los pesticidas de manera desmedida, ya que pueden dañar la fertilidad del suelo, contaminar los cuerpos de agua y afectar severamente la biodiversidad ecológica (Yadav & Devi, 2017).

Al mismo tiempo los pesticidas pueden causar problemas en la salud humana que pueden ir desde una intoxicación aguda, la cual es causada por la exposición a una sustancia particular a elevadas dosis durante un periodo de tiempo corto, ésta provoca náuseas, vómitos, dolor de cabeza, mareos, desorientación, hiperexcitabilidad, parestesias, irritación de la piel y las membranas mucosas, fasciculación muscular, dificultad para respirar, sangrado, convulsiones, coma y muerte; o bien, una intoxicación crónica que se caracteriza por un inicio tardío después de meses o años de exposición baja o moderada a productos químicos tóxicos o múltiples productos, lo que genera daños irreversibles como parálisis y neoplasia (Hernández *et al.*, 2006; Marcelino *et al.*, 2019). Aunado a esto, la resistencia de las plagas hacia los pesticidas es un problema serio y urgente que limita el uso de estos compuestos en el control de éstas (Kole *et al.*, 2019).

Estas desventajas allanan el camino para desarrollar soluciones alternativas al uso de pesticidas convencionales (sintéticos) como el control biológico, el cual se considera una alternativa amigable con el medio ambiente para controlar plagas o malezas en los agrosistemas (Amichot *et al.*, 2018).

Los agentes de control biológico (Biological Control Agents (BCAs), por sus siglas en inglés) son organismos vivos que interfieren con la productividad de otros organismos vivos. En términos de biotecnología, los BCAs son utilizados por los seres humanos para proteger los recursos de importancia económica o social (Kevan & Shipp, 2011).

En este sentido, algunas especies de microorganismos como *Trichoderma* han sido investigadas y se han utilizado como BCAs, cuyos aislados se han comercializado últimamente (Nawrocka *et al.*, 2018), dado que generan un efecto reductor significativo sobre las enfermedades de las plantas causadas por patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium culmorum* en condiciones de invernadero y de campo (Küçük & Kivanç 2003).

Del mismo modo, *Bacillus subtilis* se encuentra dentro de los principales BCAs, esta bacteria produce metabolitos antimicrobianos, los cuales se han usado con éxito para controlar hongos y bacterias, causantes de enfermedades en las plantas, entre las que se encuentra *Colletotrichum gloeosporioides* (Kim *et al.*, 2004; Stein, 2005).

Así pues, debido a la eficacia que presentan los metabolitos secundarios (producidos por los BCAs frente a diferentes patógenos) diversos investigadores han sugerido que la aplicación directa de metabolitos secundarios producidos por dichos agentes, solos o en combinación con enzimas antifúngicas, generalmente resulta en una actividad antifúngica mejorada, a veces incluso comparable con la actividad de funguicidas sintéticos, esto puede ser el camino para el futuro del biocontrol de fitopatógenos (Joshi *et al.*, 2016).

Sin embargo, estas alternativas se deben conjuntar con la seguridad alimentaria, ya que se encuentra entre las necesidades fundamentales de la vida humana (junto con la seguridad personal, el agua potable, el calor y la vivienda) (Lehotay, 2018). Dentro de este ámbito se encuentran una serie de medidas de seguridad alimentarias que han ayudado a mejorar la

salud humana, aumentar la duración y la calidad de vida, al reducir patógenos, toxinas, elementos tóxicos y otros contaminantes nocivos en nuestro suministro de alimentos (FAO & WHO, 2019; Smith *et al.*, 2018).

Dicho compendio de normas alimentarias, directrices y códigos de prácticas aceptadas internacionalmente facilita la comercialización internacional, dentro de los alimentos que se regulan se encuentran la piña, la papaya, el mango y el aguacate, este último es considerado uno de los principales productos de exportación en México (FAO & WHO, 2019).

1.1. Aguacate

El aguacate es una fruta tropical con creciente aceptación en los consumidores del mundo gracias a su contenido nutricional, a las diferentes opciones para su consumo en fresco y procesado así como su uso en la industria cosmética (Restrepo *et al.*, 2012).

El origen y domesticación del aguacate tuvo lugar en las partes altas del centro y este central de México y Guatemala, la evidencia más antigua del consumo de aguacate data de entre los años 8,000-7,000 A.C. en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México. Las culturas antiguas también contaban con un buen conocimiento acerca del aguacate y de sus variantes, como se muestra en el Códice Florentino, donde se mencionan tres tipos de aguacate, que de acuerdo con su descripción; “aoacatl” podría tratarse de *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaocatl” a *Persea americana* var. *americana* (Raza Antillana) y “quilaoacatl” a *Persea americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca) (Sánchez *et al.*, 2001).

Sin embargo, la variedad Hass es la más reconocida y su producción corresponde a cerca del 80% de todos los tipos de aguacates que se consumen en el mundo, esto debido a la alta calidad de su pulpa, mayor productividad y una madurez más tardía, características que provienen predominantemente del aguacate guatemalteco, pero con algunos genes mexicanos, y que fue seleccionado por Rudolph G. Hass, en La Habra Heights, California (DANE, 2016).

1.2. Mercado internacional del aguacate

México es el principal proveedor de aguacate del mercado internacional con una aportación del 45.95% del valor de las exportaciones mundiales, la demanda de este fruto se ha incrementado en 26 países que incluyen integrantes del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), el Tratado Integral y Progresivo de Asociación Transpacífico (Comprehensive and Progressive Agreement for Trans-Pacific Partnership, CPTPP, por su siglas en inglés), el Tratado de Libre Comercio celebrado entre los Estados Unidos Mexicanos y las Repúblicas de El Salvador, Guatemala y Honduras (TLCTN), así como China, países miembros del bloque de la Unión Europea y países con los que México no tiene acuerdo de libre comercio, que en conjunto consumen casi 2.01 millones de toneladas (CMDRS, 2019). En 2019 las importaciones de aguacate se dieron en Estados Unidos de América, China, Alemania, Japón, Reino Unido y Países Bajos (TRADE MAP, 2019).

1.3. Producción nacional

México aporta 2,307,971 t lo que se traduce como el 34.09% del aguacate que se produce en el mundo; lo cual lo coloca como el país número uno productor del fruto; seguido de República Dominicana, quien produce 10.05% y Perú con 7.87% (FAOSTAT, 2018; SIAP, 2019).

Los altos índices de producción y exportación de aguacate en México, se logran por la producción de Michoacán, ya que aporta el 94.6% de la producción total del fruto en el país; lo cual lo consolida como el líder productor de aguacate en la República Mexicana (SIAP, 2019).

Desde el 2013, la República Mexicana ha mantenido un saldo favorable en la balanza comercial de aguacate, con un ingreso promedio a los mil 270 millones de dólares anuales (CEDRSSA, 2017).

Como pilares en la producción y competitividad del producto, se destaca el alto desarrollo tecnológico del cultivo, su transferencia y los eficientes canales de comercialización. La

cadena productiva del aguacate engloba tres fases hasta llegar al consumidor final (fase primaria, fase industrialización y fase de comercialización) (Fig. 1) (CEDRSSA, 2017).

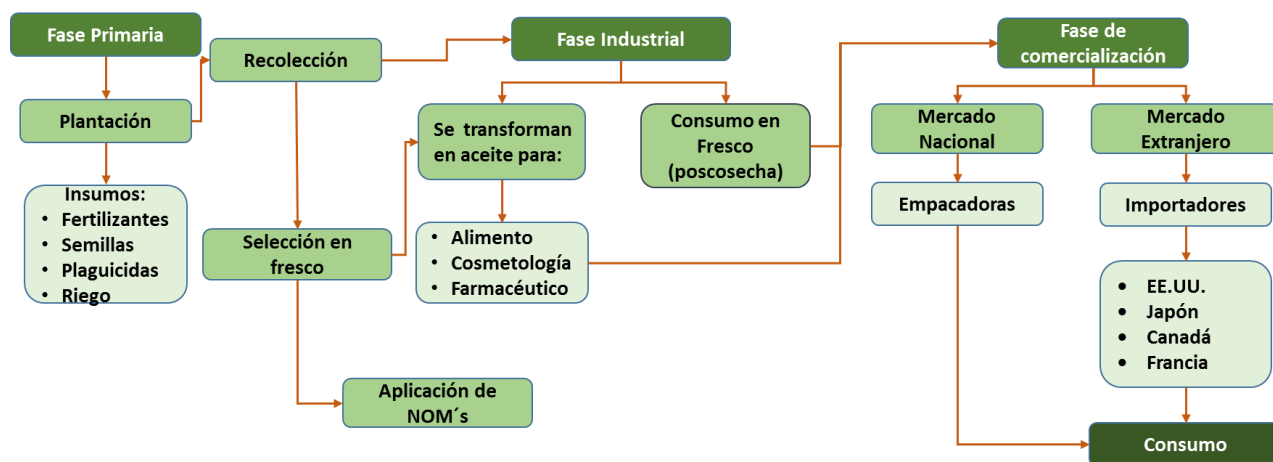


Fig. 1 Cadena productiva de la comercialización del aguacate. Modificado de CEDRSSA, 2017.

1.4. Etapa de poscosecha

Dentro de la cadena productiva del aguacate la etapa de poscosecha es la que tiene mayor relevancia dado su impacto económico (TRADE MAP, 2019). A pesar de los diferentes puntos de control se presentan pérdidas sustanciales en el fruto en esta etapa, ocasionadas mayormente por enfermedades desarrolladas durante la poscosecha (Tabla 1), las principales enfermedades poscosecha en el aguacate son la pudrición del extremo del tallo (*Lasiodiplodia theobromae*) y la antracnosis (*C. gloeosporioides* o *Colletotrichum acutatum*) (Obianom et al., 2019).

Tabla 1 Enfermedades en el fruto de aguacate en la etapa poscosecha (Fruittrop, 2016)

Enfermedades poscosecha causadas por hongos patógenos	
Patógeno	Enfermedades
<i>Alternaria</i> spp.	Podredumbre negra
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Pudrición del extremo del tallo
<i>Botryosphaeria ribis</i>	Pudrición del extremo del tallo
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis, Podredumbre negra
<i>Fusarium</i> spp.	Pudrición del extremo del tallo
<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul
<i>Pestalotiopsis perseae</i>	Mancha marrón
<i>Phomopsis perseae</i>	Podredumbre marrón
<i>Phytophthora citricola</i>	Pequeñas lesiones superficiales
<i>Pseudocercospora purpurea</i>	Podredumbre blanda
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Parches de corcho en la epidermis
<i>Trichothecium roseum</i>	Podredumbre rosa

El factor común de estas enfermedades es que aparecen cuando el fruto comienza su maduración, debido a esto, los síntomas visibles se presentan cuando los frutos se encuentran en el mercado de consumo. Mientras el fruto se mantiene verde, las infecciones permanecen en quiescencia, lo que hace imposible su remoción en el empaque, frutos infectados incluso, pueden no ser detectados en las inspecciones de calidad que comúnmente se realizan en el empaque (Zapata *et al.*, 2014).

1.5. Antracnosis

La antracnosis causada por *C. gloeosporioides* y, en menor medida, por *C. acutatum*; afecta tallos, hojas, flores y frutos, debido a que se desarrolla antes de la cosecha y se manifiesta en poscosecha, atacando a los frutos de aguacate cuando casi están para cosechar, por esta razón se considera la enfermedad que más afecta la productividad durante esta etapa (Phoulivong *et al.*, 2010; SAGARPA, 2011). Esta enfermedad se presenta como manchas circulares, cuyo centro se hunde ligeramente y se agrieta, con una alta humedad, en el centro de las manchas aparece un polvo y granos de color rosado (esporas del hongo), posteriormente, cuando el

fruto madura, la infección se extiende a la pulpa y ésta se torna de color oscuro, así pues, durante el transporte y almacenamiento se pueden generar pérdidas de grandes áreas o la totalidad del fruto (Cerdas *et al.*, 2006).

Los cambios en el estilo de vida a través de etapas sucesivas en el ciclo de vida de las especies *Colletotrichum*, que además varían entre crecimiento vegetativo (formación de haces miceliares, esclerocios y apresorios) y reproductivo (formación de esporas), pueden dificultar su detección y control (Fig. 2), por tal razón las estrategias de manejo no deben limitarse a la consideración sólo de huéspedes sintomáticos, sino también al estado de vida del patógeno donde las plantas infectadas pueden no mostrar síntomas (De Silva *et al.*, 2017).

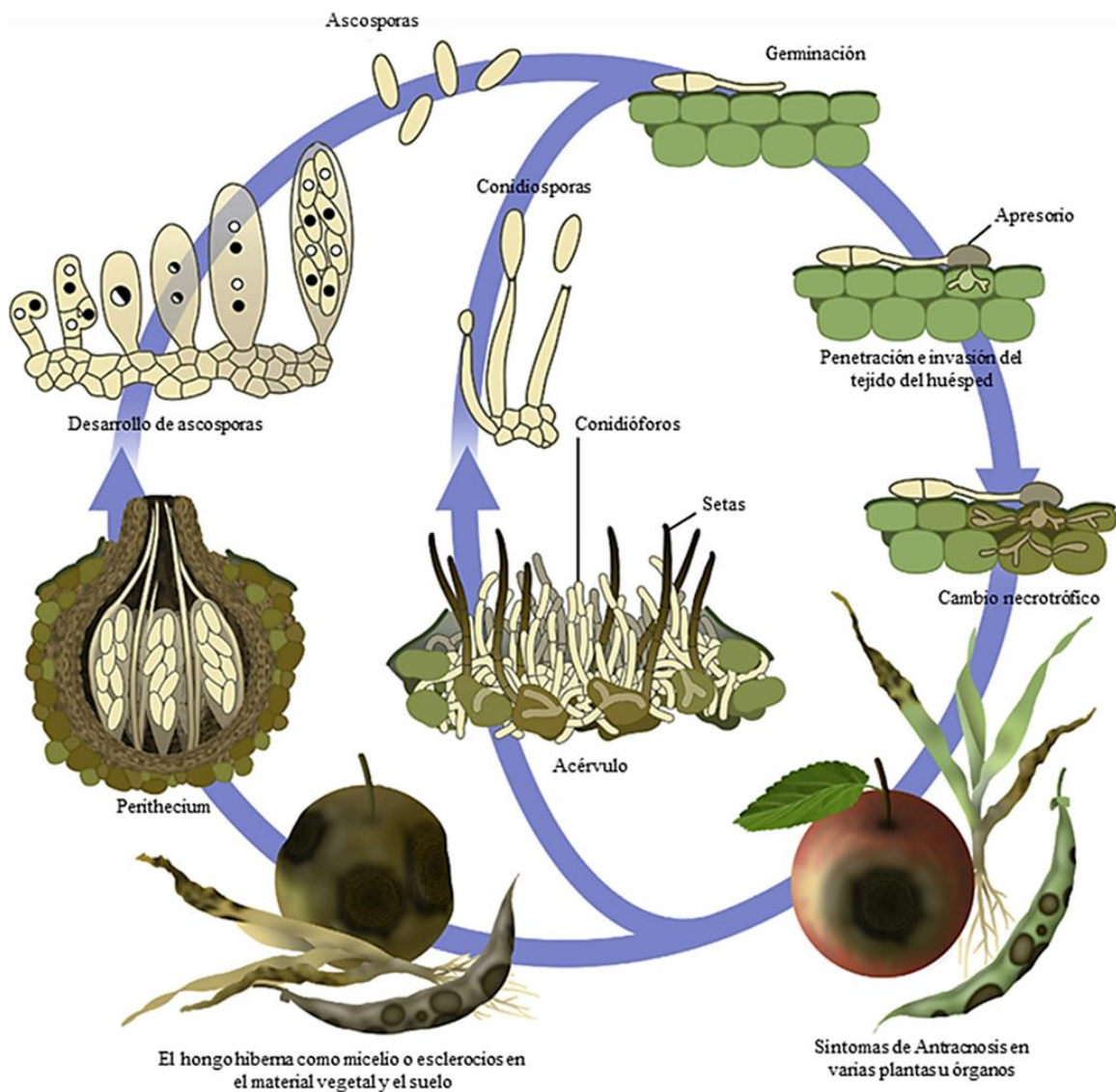


Fig. 2 Ciclo de vida general de las especies de *Colletotrichum*. El ciclo de vida de *Colletotrichum* especies también incluye etapas reproductivas (incluyendo tanto sexual, teleomorfo, asexual y anamorfo) que se producen en el huésped (Modificado de De Silva *et al.*, 2017).

Debido a que la antracnosis puede causar pérdidas económicas sustanciales en la industria del aguacate, se han desarrollado diferentes métodos de control (Bosse *et al.*, 2011).

1.5.1. Métodos de control

1.5.1.1 Control físico

Dentro de los métodos de control físico, se expone la planta a más luz solar mediante la poda para disminuir o evitar la propagación de la antracnosis, de esta forma se evita la formación de microclimas en los que proliferen mayor número de plagas y enfermedades, así mismo, se cortan frutos momificados y ramas con problemas de antracnosis, así como desechar los frutos que se encuentran dentro del cajete del árbol (SEGRADO, 2019).

1.5.1.2. Control químico

El prochloraz (Chronos 450 g/L SC-Adama) está registrado como un tratamiento poscosecha para controlar la antracnosis (*C. gloeosporioides*) en una concentración de 180 mL/100 L de agua + 0.2% HCl, mientras que la formulación del concentrado emulsionable está registrada como 1,100 mL/100 L de agua como un tratamiento de pulverización utilizando una mezcla de pulverización de 1.6 L por tonelada de fruta, aplicada con un aplicador de bajo volumen, aunque el Límite máximo de residuos (LMR) predeterminado de exportación permitido para el prochloraz es de 2 ppm (Daneel *et al.*, 2017).

Para que el control químico sea eficaz, no dañe el medio ambiente y sea viable económicamente, debe tener como soporte información actual y completa sobre los ciclos de vida de las plagas y sus interacciones con el medio ambiente y todos los métodos de control de plagas disponibles. Sin embargo, aun cuando se usan las concentraciones recomendadas, se tiende a exceder el LMR más bajo (Daneel *et al.*, 2017; Restrepo *et al.*, 2012).

Es importante tener en cuenta que el tratamiento en poscosecha no es un sustituto de la pulverización de campo, ambos son necesarios para lograr una fruta de alta calidad (Muirhead *et al.*, 1982).

Sin embargo, aunque los productos químicos tienen cierta efectividad para erradicar plagas, éstos tienen indudables desventajas, ya que los pesticidas entran en los cursos de agua

superficial y subterránea a través de procesos de escorrentía y de infiltración, además de los crecientes reportes de cepas resistentes al control químico, así mismo estos compuestos se acumulan en los alimentos como residuos (Marican & Durán-Lara, 2018).

Lo anterior combinado con los problemas de seguridad con respecto a los productos de consumo contaminados con pequeñas cantidades de productos químicos, son motivo de preocupación para los consumidores, lo que ocasiona un aumento en la quimiofobia, esto hace que sea deseable buscar nuevas estrategias de control (Küçük & Kivanç 2003; Lee *et al.*, 2019).

1.5.1.3. Control biológico

Con el propósito de superar estrategias de control peligrosas, se están desarrollando métodos alternativos que son seguros y no tóxicos para los seres humanos y los animales, como el uso de BCAs (Sharma *et al.*, 2017).

Sobre el particular, *Trichoderma* es uno de los BCAs ubicuos más ampliamente usados, su potencial antagonista predominante y la facilidad con la que puede multiplicarse en masa en el laboratorio, han mejorado virtualmente su alcance para aprovechar dicho microorganismo para el manejo de una variedad de enfermedades causadas por fitopatógenos, por ejemplo *S. rolfsii* causante de tizón de la base del tallo, *R. solani* y *F. oxysporum* que provocan marchitamiento, entre otros (Hubballi *et al.*, 2019; Keswani *et al.*, 2014). Su diversidad en el control de enfermedades se debe a los diferentes mecanismos que posee como el micoparasitismo, la competición por espacio y nutrientes, la producción de enzimas hidrolíticas y la antibiosis (Sood *et al.*, 2020).

Por su parte, las especies del género *Bacillus* son excepcionalmente ubicuas, ya que pueden habitar una gran variedad de nichos ecológicos. Están presentes en el suelo, el agua y el aire, así como en superficies y rizosferas de plantas, en el tracto gastrointestinal de animales, así como en muchos ambientes extremos. Desde el punto de vista biotecnológico, la característica más importante de las especies de *Bacillus* es su diverso metabolismo

secundario y la capacidad de producir una amplia variedad de sustancias antagonistas estructuralmente diferentes (Fira *et al.*, 2018). *Bacillus subtilis*, es parte del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR, por sus siglas en inglés), éstas se aplican ampliamente para controlar las enfermedades de los cultivos, debido a que tienen aproximadamente del 4% al 5% de sus genomas completos dedicados a la síntesis de metabolitos secundarios, con la capacidad de producir más de dos docenas de compuestos antimicrobianos estructuralmente diversos como bacteriocinas, péptidos antimicrobianos y lipopéptidos, policétidos, sideróforos, iturinas y surfactinas, que al mismo tiempo mostraron propiedades promotoras del crecimiento de las plantas (Fira *et al.*, 2018; Hinarejos *et al.*, 2016).

2. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente las especies de *Trichoderma* generan compuestos con capacidad antagónica sobre el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos (Medina *et al.*, 2020). Esto se debe en gran medida a que segrega una variedad de metabolitos secundarios que no solo contribuyen significativamente en la señalización sino que también interactúan con otros organismos de varias maneras (Fig. 3), la producción plétora de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* es la fuente de su potencial de biocontrol (Keswani *et al.*, 2014).



Fig. 3 Papel multifacético de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* (Keswani *et al.*, 2014).

Las propiedades antimicrobianas, en el caso de *Trichoderma* sp., pueden estar relacionadas por las interacción con los patógenos que va a conducir al aumento en la producción de algunos metabolitos secundarios como una forma de biocontrol (Reim & Lopes, 2018).

Por su parte *B. subtilis* es una bacteria Gram-positiva ubicua que demuestra una adaptabilidad genética inusual, lo que le permite colonizar hábitats diversos y que diferencia de varios de las más de 200 especies clasificadas de *Bacillus*, *B. subtilis* no es patógena y muestra diversidad genética, incluso entre cepas estrechamente relacionadas (Kaspar *et al.*, 2019). Lo anterior se refleja en su capacidad para producir antibióticos como los lipopéptidos, los cuales poseen diferentes mecanismos de acción en contra de diversas enfermedades vegetales. Además, *B. subtilis* produce enzimas hidrolíticas, lo que le confiere amplias propiedades supresoras en contra de más de 23 tipos de patógenos de plantas *in vitro* (Huang *et al.*, 2017; Nagórska *et al.*, 2007).

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis* se han identificado las surfactinas, iturinas y bacilomicinas (Fig. 4), que han atraído un mayor interés biotecnológico y farmacéutico como biosurfactantes y antibióticos, además de varias dihidroisocoumarinas, macrólidos derivados de policétidos y lipopéptidos lineales con potentes propiedades antimicrobianas, la identificación de estos compuestos han ido esclareciendo las capacidades biosintéticas de la bacteria (Kaspar *et al.*, 2019).

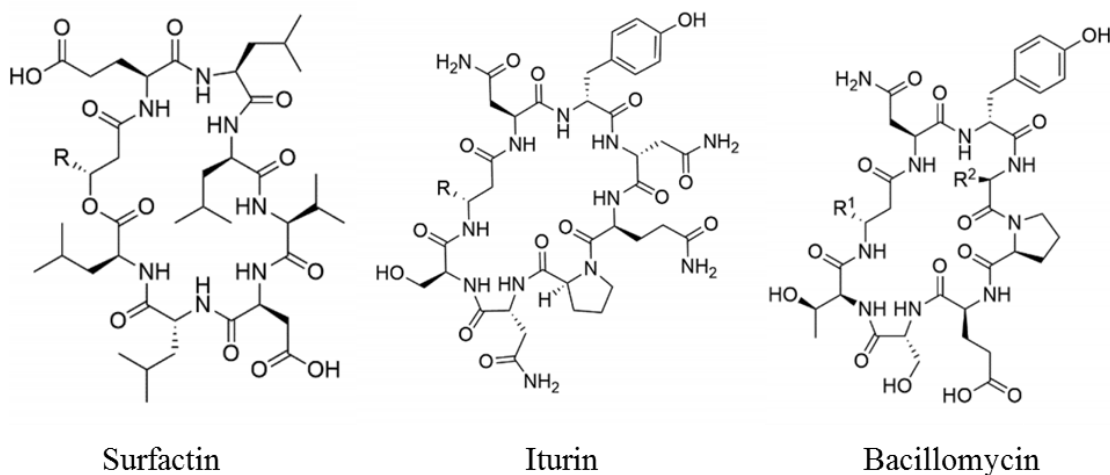


Fig. 4 Compuestos activos aislados de *B. subtilis* (Kaspar *et al.*, 2019).

A esto se le suma que diferentes investigadores han observado una respuesta compleja con una variedad de efectos antagónicos entre las cepas de *Bacillus* y respuestas distintas a diferentes patógenos; lo cual podría esperarse como un mecanismo novedoso (Huang *et al.*, 2017).

Con lo anterior se sustenta el hecho de que los hongos y las bacterias coexisten en diversos entornos, como en entornos agrícolas y forestales, por tal razón la capacidad de control biológico puede producirse mediante el uso de mezclas de BCAs. Con respecto a esto, algunos informes indicaron que una combinación de bacterias antagonistas con hongos antagonistas, especialmente *Trichoderma* sp. mostró una mayor protección de las plantas a patógenos que cuando se inocularon de manera individual (Ali *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

Por lo cual se ha estudiado la interacción entre los BCAs *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* frente al patógeno *C. gloeosporioides*, en donde se observó que el porcentaje de biocontrol sobre *C. gloeosporioides* incrementa cuando se co-cultivan estos dos BCAs en dos de tres cepas de *Trichoderma* probadas (Fig. 5) (Hernández, 2013).

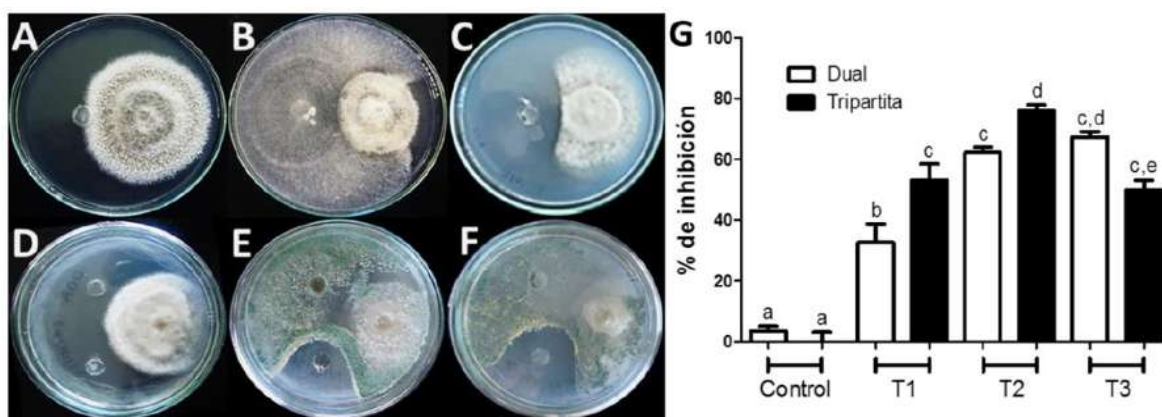


Fig. 5 Comparación de la inhibición ejercido por *Trichoderma* spp. en presencia de *B. subtilis* sobre *C. gloeosporioides* en medio PDA. Se incubó *C. gloeosporioides* en medio PDA, a las 24 y 72 h de crecimiento de *C. gloeosporioides* se incubó *B. subtilis* y *Trichoderma* respectivamente, fotografías representativas del bioensayo. A) Control sistema dual, B) T1 vs *C. gloeosporioides*; C) *B. subtilis* vs *C. gloeosporioides*, D) Control sistema tripartita, E) Potenciación de T1 vs *C. gloeosporioides* y F) Potenciación de T2 vs *C. gloeosporioides* G) Comparación del porcentaje de inhibición. Las barras blancas representan el porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* en co-cultivo y las barras negras el sistema tripartita. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm$ la DE. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Tukey con una $P \leq 0.001$. Las letras diferentes indican grupos diferentes estadísticamente significativos (Hernández, 2013).

Por esto, se realizó la evaluación del efecto de los extractos hexánicos obtenidos del co-cultivo de *B. subtilis* y *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*. De los extractos evaluados, se observó inhibición del crecimiento diametral de *C. gloeosporioides* en las distintas concentraciones probadas (Fig. 6) que fueron del 17.24% al 73.63% para el extracto obtenido del co-cultivo de T1 + Bs, del 14.28% al 68.12% para el extracto obtenido de T2 + Bs y del 20.9% al 74.31% para el extracto obtenido de T3+ Bs, siendo los extractos de T1 + Bs y T3 + Bs más eficientes a 300 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 6b) (Maldonado Zuñiga *et al.*, 2019).

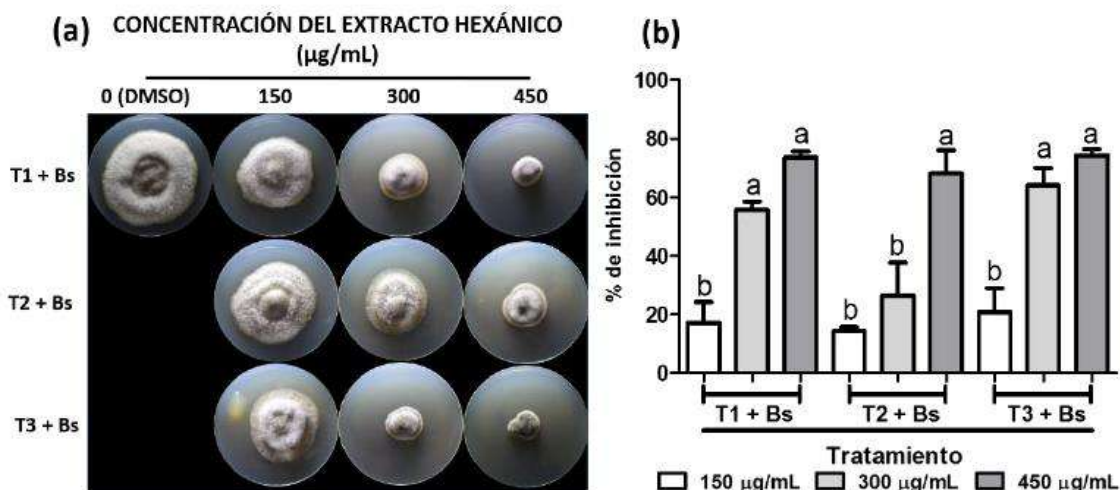


Fig. 6 Efecto de los extractos hexánicos obtenidos de la co-inoculación de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*. (a) Fotografías representativas del crecimiento de *C. gloeosporioides* en presencia de los metabolitos obtenidos del co-cultivo. (b) Porcentaje de la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* (Maldonado Zúñiga *et al.*, 2019).

En muchos casos, se observó que la aplicación de un compuesto purificado, como un metabolito secundario, produce efectos comparables a los obtenidos al tratar el cultivo con el microorganismo vivo, el uso de estos compuestos derivados de forma natural como alternativa o en combinación con el microorganismo vivo puede contribuir al desarrollo de nuevos productos fitosanitarios y biofertilizantes que pueden ser más efectivos y confiables cuando se aplican a una variedad de cultivos y condiciones ambientales (Manganiello *et al.*, 2018).

Por tal razón, se llevó a cabo la identificación de los compuestos activos presentes en las fracciones hexánicas del co-cultivo de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, dentro de los cuales se identificaron: acetato de butilo, butirato de etilo, 2-Butoxietanol, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-hidroxibenzaldehído, ácido acético, ácido esteárico y ácido palmítico (Fig. 7) (Ramírez *et al.*, 2020).

Tabla 2 Compuestos de fracciones de TLC identificados usando GC-MS

Componentes	Tiempo de retención (min)
Butirato de etilo	5.02
Acetato de butilo	5.43
ácido acético	5.69
2-butoxietanol	8.15
3,5-di-tert-butilo-4-hidroxibenzaldehído	31.28
3,5-di-tert-butilo-4-alcoholhidroxibencílico	31.395
ácido palmítico	35.21
ácido esteárico	38.93

Los compuestos se identificaron tentativamente utilizando la biblioteca NIST (Ramírez *et al.*, 2020).

Dados los resultados de abundancia de los compuestos identificados, se llevó a cabo la evaluación del efecto del acetato de butilo a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 μM sobre *C. gloeosporioides*, donde se observó que la concentración de 0.1 μM inhibió el crecimiento radial del 8.95% respecto al control, además causó disminución en la melanización de las hifas, comprometiendo la patogenicidad de *C. gloeosporioides* (Fig. 8a) (Ramírez *et al.*, 2020).

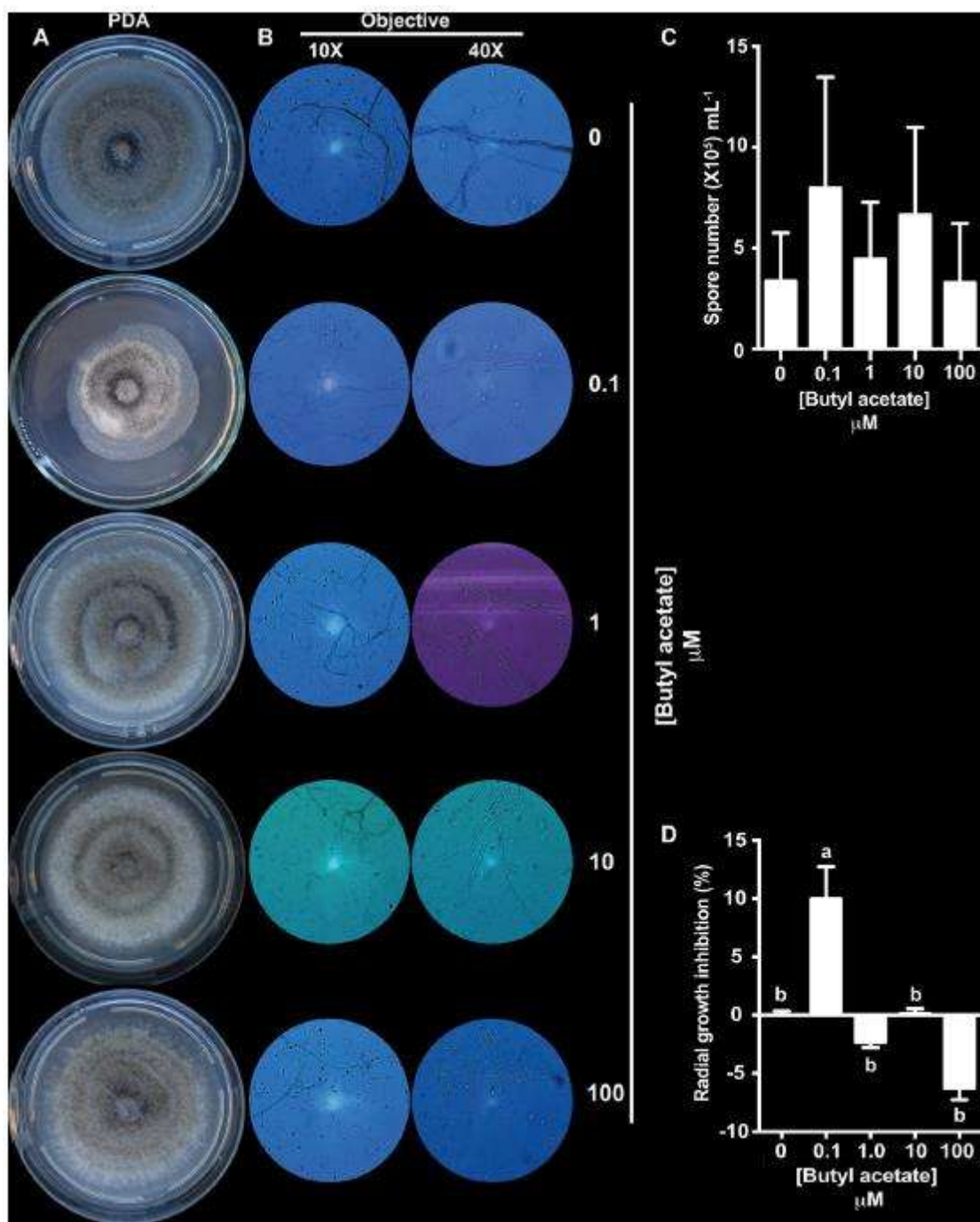


Fig. 7 Efecto del acetato de butilo sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*. A) Se muestran fotografías representativas del control con etanol y tratamientos realizados en medio PDA en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. B) Se muestran micrografías representativas del control con etanol y los tratamientos realizados en medio PDA en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, se tomó una muestra de micelio de cada concentración adicionando una gota de azul brillante y se analizó al microscopio con un objetivo 10X y 40X (Ramírez *et al.*, 2020).

Al analizarse microscópicamente las colonias, se observó adelgazamiento de las hifas de manera dosis dependiente dado que a medida que se aumentaba la concentración del acetato de butilo las hifas se volvían laxas, además de que se presentó un efecto de septado (división) de éstas a partir de la concentración 10 μ M (Fig. 8b) (Ramírez *et al.*, 2020). Aunque el acetato de butilo tuvo un efecto biocontrolador considerable del patógeno, este provocó efectos diferentes a lo mostrado en las fracciones hexánicas, por lo que es necesaria la evaluación del resto de compuestos.

3. Justificación

Para llevar a cabo la comercialización y/o exportación del aguacate, el fruto debe de cumplir diferentes normas de calidad que se aplican a las variedades comerciales, las cuales se ven incumplidas por enfermedades poscosecha como la antracnosis ocasionada por los patógenos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, por lo cual se emplean pesticidas que ayudan a controlar esta problemática. Sin embargo, éstos presentan diferentes desventajas, además de que no deben exceder los niveles máximos de la *Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos* (CODEX STAN 193-1995), lo cual limita la efectividad de éstos y muchas veces los límites establecidos se ven sobrepasados. Es por esto por lo que el análisis del efecto *in vitro* y *ex vivo* de los compuestos identificados a partir de la co-inoculación de *B. subtilis* y *Trichoderma* sp., propone una alternativa adecuada para la prevención del desarrollo de la antracnosis en los frutos de aguacate, permitiendo cumplir con las normas de calidad deseadas.

4. Hipótesis

Los compuestos orgánicos identificados durante la interacción ente *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, de manera individual y/o combinada, inhiben el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y de *C. acutatum* *in vitro* y *ex vivo*.

5. Objetivo general

Analizar el efecto de los compuestos orgánicos identificados a partir del sistema tripartita de *Trichoderma* sp./*Colletotrichum gloeosporioides*/*Bacillus subtilis*, de manera individual y combinada, sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* *in vitro* y *ex vivo*

5.1. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del butirato de etilo, el 2-Butoxietanol, el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, el ácido acético, el ácido esteárico y del ácido palmítico, de manera individual y en mezcla sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.
- Analizar el efecto de los compuestos identificados en el sistema tripartita sobre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en hojas aguacate.

6. Metodología

Medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA)

Se rehidrataron 39 g del medio PDA (DIBICO®) en un litro de agua destilada. Se dejaron reposar de 10 a 15 min y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 min.

Medio papa dextrosa (PD)

Se cortaron 200 g de papas y se hirvieron durante 20 min en 500 mL de agua destilada, se dejaron en reposo hasta que llegaron a temperatura ambiente y se filtraron. Posteriormente, se pesaron 20 g de glucosa y se disolvieron en 500 mL de agua destilada en un matraz de 1 L, se agregó el filtrado de papa y se aforaron a 1 L, luego se esterilizaron a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 min.

Propagación de cepas

Las cepas fúngicas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* se reactivaron utilizando medio PDA, se resembraron en cajas Petri de 4.5 cm de radio, inoculando discos de 8 mm de diámetro.

Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Para llevar a cabo la evaluación de los compuestos orgánicos: butirato de etilo, 2-Butoxietanol, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido acético, ácido esteárico y ácido palmítico; sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, se preparará medio PDA en cajas Petri, suplementado con diferentes concentraciones (0, 0.1, 1, 10 y 100 µM) de cada compuesto de manera individual, posteriormente, se inoculó un disco

del agente fitopatógeno en el centro de las placas y se realizaron mediciones de crecimiento diametral durante 14 días, momento en el cual se determinó la inhibición del crecimiento radial mediante la siguiente ecuación: inhibición del crecimiento = $[(\text{Crecimiento control} - \text{Crecimiento tratado}) / (\text{Crecimiento control})] \times 100$ (Abdelshafy *et al.*, 2020; Arjona-Girona *et al.*, 2014). Adicionalmente, se observó el micelio del fitopatógeno utilizando un microscopio con cámara (i4 lw scientific) con el objetivo 10X y 40X (González *et al.*, 2011).

Análisis microscópico de las hifas de las especies de *Colletotrichum* por microscopia electrónica de barrido

Adicionalmente para caracterizar los cambios morfológicos en las hifas de *C. gloeosporioides* (Cg) y *C. acutatum* (Ca) después del tratamiento con los COs utilizando SEM, para lo cual las muestras se tomaron utilizando tiras de cinta industrial de espuma doble cara de 3 x 0.5 cm, a continuación, las muestras se introdujeron por 15 min a una cámara de al vacío para recubrir con iones de cobre las muestras utilizando un pulverizador de iones, finalmente las muestras fueron observadas con el SEM (SEM Jeol JSM 6400), con magnificación 1,000X, alto voltaje 15 KV y distancia de trabajo 9 mm.

Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Con la finalidad de analizar un posible efecto aditivo o sinérgico entre los compuestos orgánicos previamente evaluados, se realizaron mezclas de los compuestos (previamente mencionados) a diferentes concentraciones en las que se observaron mayores alteraciones en las colonias de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Para llevar a cabo dicha evaluación, se preparó medio PDA en cajas Petri, al cual se le adicionaron los compuestos orgánicos a las diferentes concentraciones seleccionadas. Posteriormente, se inoculó un disco del agente fitopatógeno en el centro de las cajas y se realizaron mediciones del crecimiento diametral

durante 14 días, se determinó la inhibición del crecimiento y se observaron las alteraciones microscópicas como se describió previamente.

Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum ex vivo* sobre hojas de aguacate

Se seleccionaron hojas sanas de aguacate (*Persea americana*), las cuales se sometieron a un tratamiento de desinfección. Para lo cual, se lavó el material vegetal con agua corriente, posteriormente se agregaron las hojas a una solución de Tritón-X 100 al 1%, durante 5 minutos, en agitación suave, después se pasaron las hojas a etanol al 70% durante 1 minuto, en agitación suave, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio (NaCl) al 10%, en agitación suave, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril (Saint-Vincent *et al.*, 2020) .

Análisis de la capacidad de infección de los fitopatógenos expuestos a los compuestos orgánicos

Se agregaron las mezclas de los compuestos orgánicos al recubrimiento elaborado según lo descrito por Soto *et al.*, 2020, después se asperjaron las hojas con las mezclas, una vez las mezclas se secaron se colocó un disco de PDA de 5 mm previamente inoculado con cada fitopatógeno, en el envés de las hojas, como controles se colocaron discos de PDA con los patógenos sin los compuestos orgánicos y discos de medio PDA, en la misma posición, se monitorearon las hojas cada 24 horas, finalizando a las 96 horas.

7.2 Clareo de tejido vegetal

Para determinar el grado de infección de las hojas de aguacate por parte de los patógenos, se realizó un clareo de tejidos, el cual consistió en tomar las secciones en donde se colocaron los discos de medio PDA y donde se generaron lesiones, en una solución de tres partes de etanol al 95% y una parte de ácido acético glacial, durante dos horas en agitación constante,

con un recambio de la solución cada hora, después se incubaron en una solución de etanol al 70% a 4 °C durante toda la noche. El tejido se enjuagó con agua desionizada estéril durante 5 minutos con agitación constante, después con una solución 0.5 M EDTA; finalmente, a la muestra se agregó azul brillante (González *et al.*, 2011) y glicerol al 50% (Saint-Vincent *et al.*, 2020).

7.3 Análisis microscópico del tejido vegetal infectado

Se preparó la muestra agregando azul de cresil brillante y glicerol al 50%, después se volvió a agregar azul de cresil brillante, para poder teñir el micelio contenido en el tejido, se colocó la muestra en un portaobjetos y se observó en un microscopio con cámara (i4 lw scientific) con el objetivo 10X y 40X (González *et al.*, 2011).

7.4 Análisis estadístico

Se utilizó GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) para realizar análisis estadísticos. Los datos se expresaron como la media $\pm$ SD de tres experimentos y fueron analizados por ANOVA unidireccional seguido de las pruebas post-hoc de Tukey para diferencias en el porcentaje de inhibición crecimiento de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Las diferencias se consideraron significativas a $\alpha < 0.01$

6. Resultados

6.1. Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Con el objetivo de evaluar el potencial antifúngico de los compuestos orgánicos obtenidos del co-cultivo de *Trichoderma* sp. más *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides* sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y/o *C. acutatum*, se adicionaron los compuestos orgánicos: butirato de etilo, 2- Butoxietanol, ácido acético, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido esteárico y ácido palmítico a concentraciones de 0, 1, 10 y 100 μM en medio PDA. Se determinó su efecto sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* o *C. acutatum* durante 14 días (Fig. 9).

Se analizó macroscópicamente las colonias fitopatógenas de *C. gloeosporioides* en las cuales se observaron alteraciones como adelgazamiento, decoloración y malformaciones en el micelio, éstas estuvieron en función de los compuestos orgánicos probados.

En este sentido, en el butirato de etilo a 0.01 y 0.1 μM así como en el 2-Butoxietanol a 0.01 μM , se observó el desarrollo de micelio vegetativo, además de una disminución en la pigmentación de las colonias, lo que sugiere una reducción en la producción de melanina, el cual es un factor de patogenicidad importante para este hongo.

Para el ácido acético en todas las concentraciones analizadas presentó deformación en los bordes de las colonias. El 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico provocó el desarrollo de vegetativo del fitopatógeno a 0.1 μM , mientras que a 10 y 100 μM de manera ascendente se observó una reducción en el crecimiento radial de las colonias.

Para el ácido esteárico se observó adelgazamiento del micelio en el centro de la colonia a 100 μM . Por su parte el ácido palmítico a 100 μM disminuyó la pigmentación de la colonia y volvió delgado el micelio en el centro de la colonia.

De manera similar se probaron los compuestos orgánicos frente a *C. acutatum* en donde para el butirato de etilo a 100 μM se observó desarrollo vegetativo del micelio y adelgazamiento de éste en el centro de la colonia.

Para el 2-butoxietanol se produjo adelgazamiento del micelio en el centro de las colonias en todas las concentraciones analizadas. El ácido acético generó cambios en la pigmentación de las colonias.

Por su parte el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 10 μM causó adelgazamiento en el centro de la colonia y a 100 μM se observó reducción en el crecimiento diametral del 10.12% de la colonia fúngica.

El ácido esteárico a 100 μM ocasionó la reducción en el desarrollo vegetativo de la colonia, mientras que el ácido palmítico a 100 μM ocasionó adelgazamiento en el centro de la colonia. La diversidad de efectos observados sugiere que cada compuesto podría tener diferentes blancos de acción contra los hongos fitopatógenos.

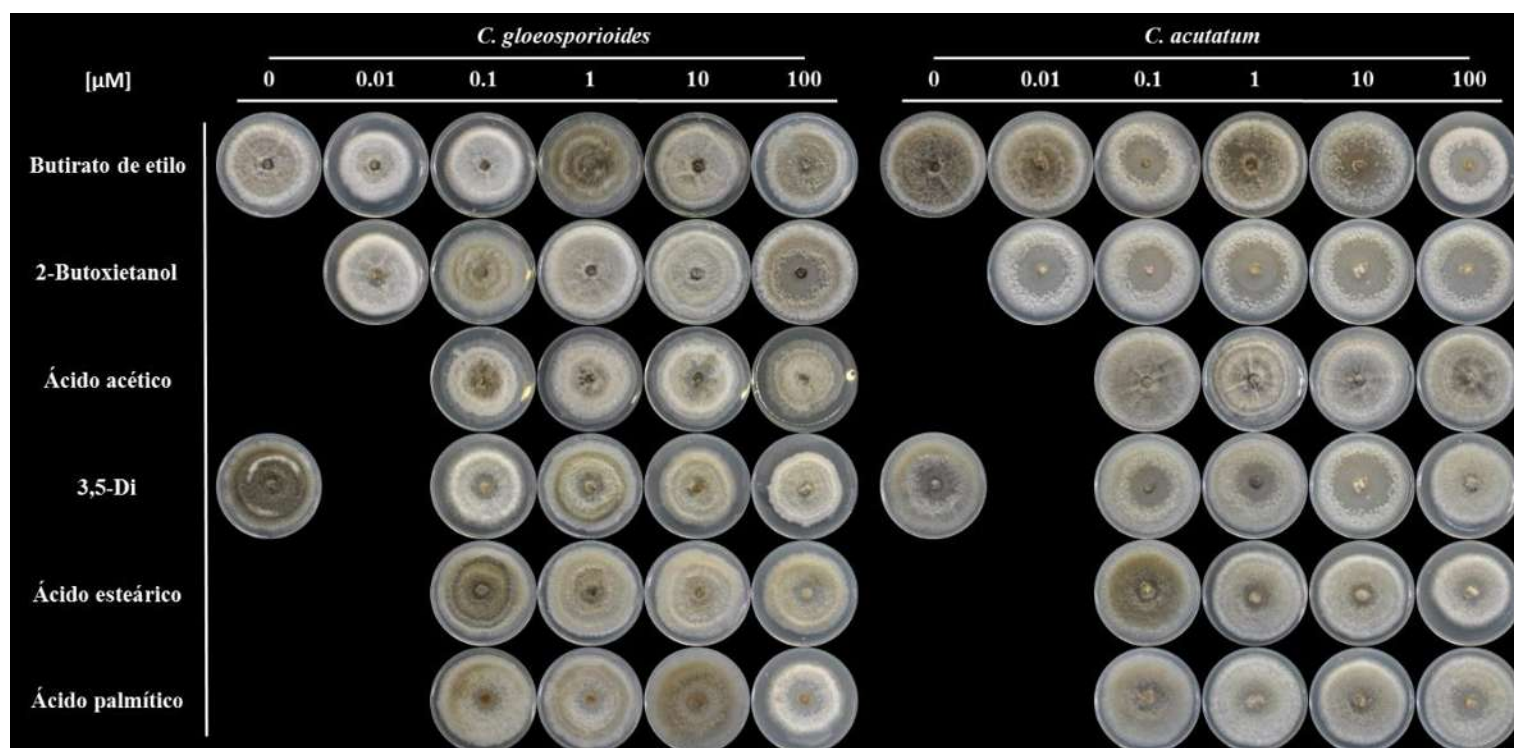


Fig. 8 Efecto de los compuestos orgánicos sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Se muestran imágenes representativas de los ensayos de inhibición de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, a diferentes concentraciones de los compuestos orgánicos a los 14 días de exposición.

Posteriormente se evaluó los cambios morfológicos microscópicos de las colonias fúngicas (Fig. 10). Para la cepa de *C. gloeosporioides* en presencia de 0.01 μM de butirato de etilo se observaron alteraciones como formación de vesículas y enrollamiento de hifas en la zona media y final de la colonia fúngica. Sin embargo, al aumentar la concentración a 100 μM , dichos efectos se hicieron menos evidentes (Fig. 10A). Los efectos anteriores fueron similares, para el 2-Butoxietanol a 0.01 μM en la zona media y borde de la colonia fúngica (Fig. 10B).

El ácido acético a 100 μM ocasionó adelgazamiento de las hifas a partir de la zona media, además se observaron vesículas y distorsión de las hifas (Fig. 10C). El 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μM ocasionó formación de vesículas y enrollamiento de hifas en las zonas media y borde de la colonia fúngica (Fig. 10D).

A su vez, el ácido esteárico a 100 μM produjo la formación de vesículas en la zona media, y enrollamiento de las hifas en la zona borde (Fig. 10E). Por último, el ácido palmítico provocó la distorsión y formación de vesículas en las hifas a la concentración de 100 μM (Fig. 10F).

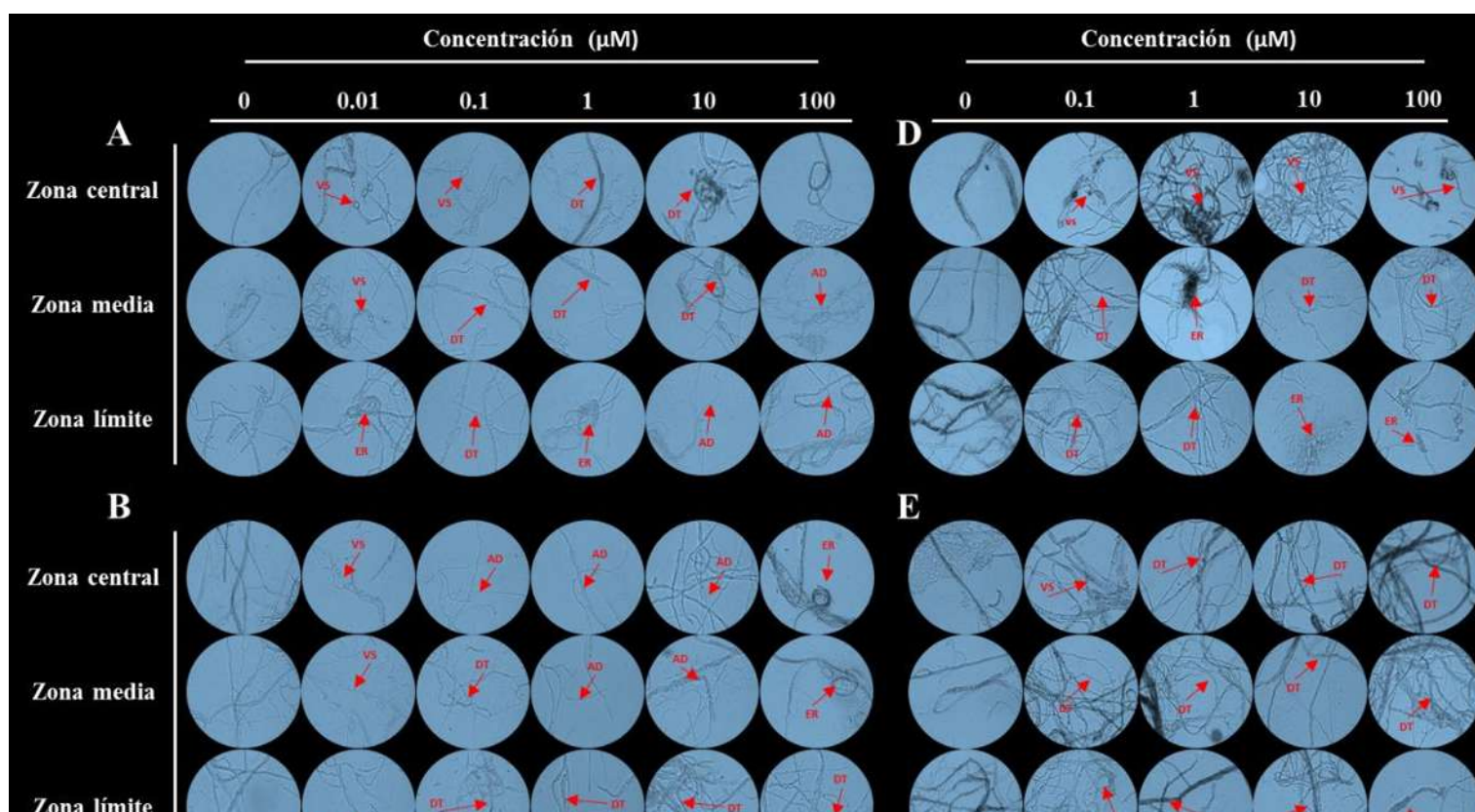


Fig. 9 Análisis morfológico de la colonia fúngica de *C. gloeosporioides* después de la exposición a los compuestos orgánicos. Se muestran fotografías representativas del análisis microscópico de las cepas de *C. gloeosporioides* después del tratamiento (13 a 15 días). Se tomaron improntas del micelio de las colonias expuestas a los compuestos orgánicos. **A)** butirato de etilo, **B)** 2-Butoxietanol, **C)** ácido acético, **D)** 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, **E)** ácido esteárico y **F)** ácido palmítico. Se analizaron las muestras de tres zonas (zona inicial, zona media y zona final) de la colonia fúngica a las diferentes concentraciones probadas. Los códigos representan los efectos observados a las diferentes concentraciones: adelgazamiento (AD), esporulación (ES), distorsión (DT), vesículas (VS), enrollamiento (ER) y septos (SP). Se utilizó azul brillante para realizar la tinción y posteriormente se visualizó en el microscopio con el objetivo 40X.

De igual forma se realizaron observaciones microscópicas para la cepa de *C. acutatum* (Fig.11). Primeramente, el butirato de etilo a 10 μ M generó alteraciones en la morfología del micelio entre las cuales se encuentran la distorsión y enrollamiento de las hifas (zona inicial y media) (Fig. 11A).

Posteriormente, el 2-Butoxietanol a 100 μ M ocasionó cambios morfológicos que incluyen distorsión y enrollamiento de las hifas (Fig. 11B). A su vez, el ácido acético generó distorsiones en la estructura de las hifas en la zona media y formación de vesículas en la zona borde de la colonia a 100 μ M (Fig. 11C).

Por su parte, el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μ M causó distorsión y enrollamientos de las hifas en la zona media y borde (Fig. 11D). De manera similar, el ácido esteárico ocasionó alteraciones morfológicas que incluyeron, distorsión y formación de vesículas en las hifas a 100 μ M, además un aumento en la formación de septos (Fig. 11E).

Por último, el ácido palmítico a 100 μM generó vesículas y distorsión en las hifas en la zona media de la colonia (Fig. 11F). Las alteraciones morfológicas en las hifas del patógeno fueron diferentes para cada compuesto, por lo que se sugiere que los compuestos orgánicos tienen diferentes blancos de acción, así mismo, los efectos observados como la formación de vesículas, indican que los compuestos podrían estar ocasionando alteraciones a nivel celular y molecular.

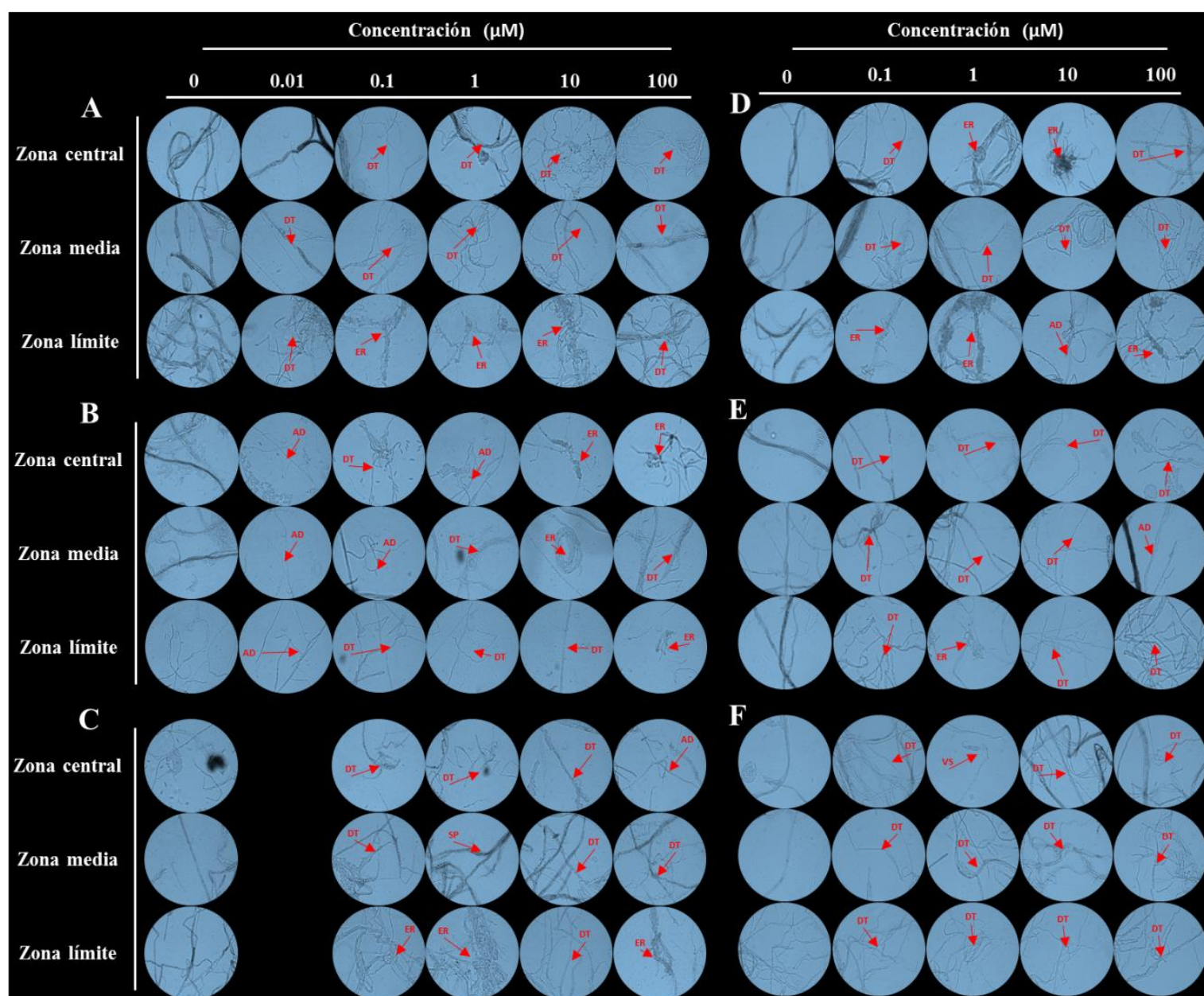


Fig. 10 Análisis morfológico de la colonia fúngica de *C. acutatum* después de la exposición a los compuestos orgánicos. Se muestran fotografías representativas del análisis microscópico de las cepas de *C. acutatum* después del tratamiento (13 a 15 días). Se tomaron improntas del micelio de las colonias expuestas a los compuestos orgánicos volátiles. **A)** butirato de etilo, **B)** 2-Butoxietanol, **C)** ácido acético, **D)** 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, **E)** ácido esteárico y **F)** ácido palmítico. Se analizaron las muestras de tres zonas (zona inicial, zona media y zona final) de la colonia fúngica, a las diferentes concentraciones probadas. Los códigos representan los efectos observados a las diferentes concentraciones: adelgazamiento (AD), esporulación (ES), distorsión (DT), vesículas (VS), enrollamiento (ER) y septos (SP). Se utilizó azul brillante para realizar la tinción y posteriormente se visualizó en el microscopio con el objetivo 40X.

6.1.1 Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre desarrollo de las especies de *Colletotrichum* por microscopia electrónica de barrido

Para caracterizar los efectos de los compuestos orgánicos sobre las especies de *Colletotrichum* se realizó microscopia electrónica de barrido (FE-SEM), primeramente se evaluó *C. gloeosporioides*, para empezar se observa el control con agua, en donde se muestran hifas con estructuras rectas, con un grosor típico de 5µm (Fig. 12A). Mientras que el tratamiento con butirato de etilo a 0.01 µM se observó enrollamiento de las hifas (Fig. 12B). Este efecto fue similar para el tratamiento con 2-Butoxietanol a 0.01 µM (Fig. 12C). En el tratamiento con ácido acético a 100 µM, se observó adelgazamiento y distorsión en las hifas (Fig. 12D). Asimismo tenemos el control con DMSO en donde se muestran estructuras ligeramente curvadas y con un grosor típico de 4µm (Fig. 11E). En los tratamientos con los compuestos 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido esteárico y ácido palmítico a 100 µM respectivamente se presentó un efecto de enrollamiento de hifas además de que en el compuesto 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico se presentó adelgazamiento y/o aplanamiento de las hifas (Fig. 12F, 12G, 12H).

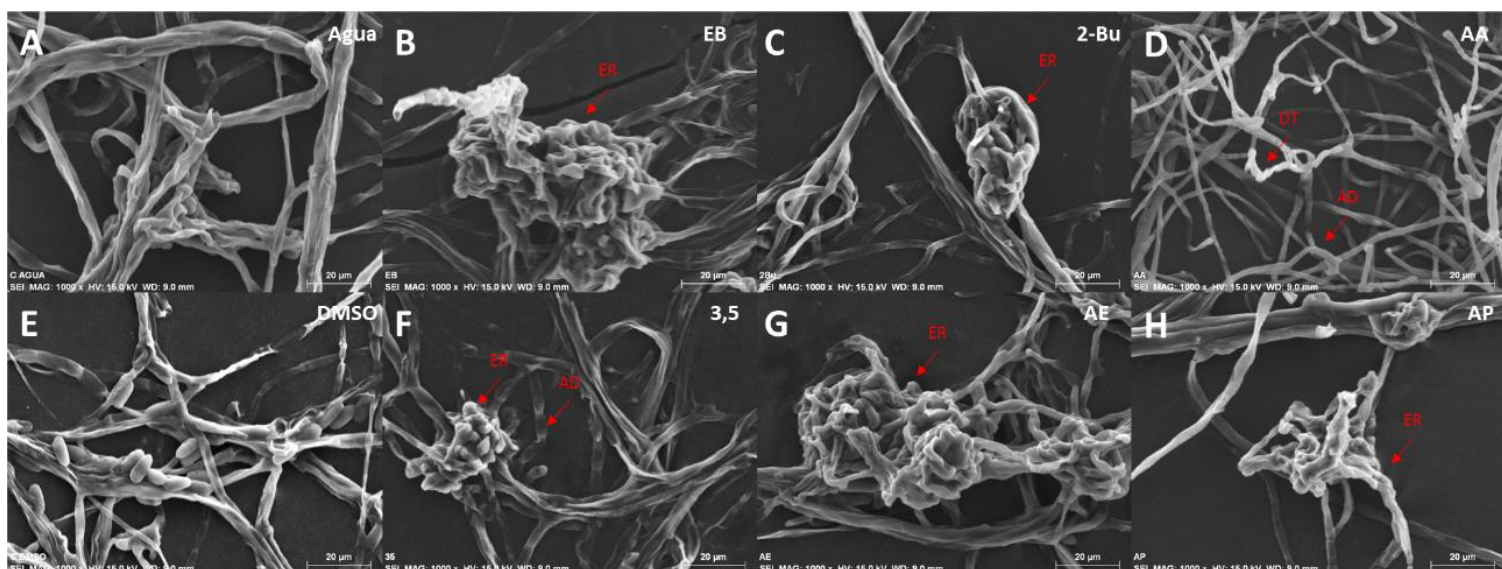


Fig. 11 Micrografías de hifas de *C. gloeosporioides* crecidas en medio suplementado con los compuestos orgánicos. Se muestran fotografías representativas del análisis microscópico electrónico de barrido de las cepas de *C. gloeosporioides* después del tratamiento de 14 días con los compuestos orgánicos. Medio suplementado con: **A)** con agua (control), **B)** butirato de etilo a 0.01 μ M (EB), **C)** 2- Butoxietanol a 0.01 μ M (2-Bu), **D)** ácido acético a 100 μ M (AA), **E)** DMSO (Control), **F)** 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μ M (3,5), **G)** ácido esteárico a 100 μ M (AE), **H)** ácido palmítico a 100 μ M (AP. Magnificación 1,000X, Alto voltaje: 15KV, distancia de trabajo: 9mm).

De la misma manera se realizó microscopia electrónica de barrido en las hifas de *C. acutatum*, en donde el control con agua se muestran hifas con estructuras rectas, con un grosor típico de 5 μ m (Fig. 13A). Mientras que en el tratamiento con butirato de etilo a 10 μ M se observaron hifas enrolladas (Fig. 13B). El efecto anterior fue más marcado en el tratamiento con 2-Butoxietanol a 100 μ M (Fig. 13C). Del mismo modo también se apreció en el tratamiento con ácido acético a 100 μ M (Fig. 13D). Asimismo tenemos el control con DMSO se muestran estructuras ligeramente curvadas, con un grosor típico de 3 μ m (Fig. 13E). En el tratamiento con 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μ M se observó distorsión

y aplanamiento de las hifas (Fig. 13F). Posteriormente los tratamientos con ácido esteárico y ácido palmítico a 100 μ M, presentaron enrollamiento de hifas que fue de mayor a menor (Fig. 13G y 13H), estos datos corroboran los cambios estructurales de las hifas ocasionados por los compuestos orgánicos.

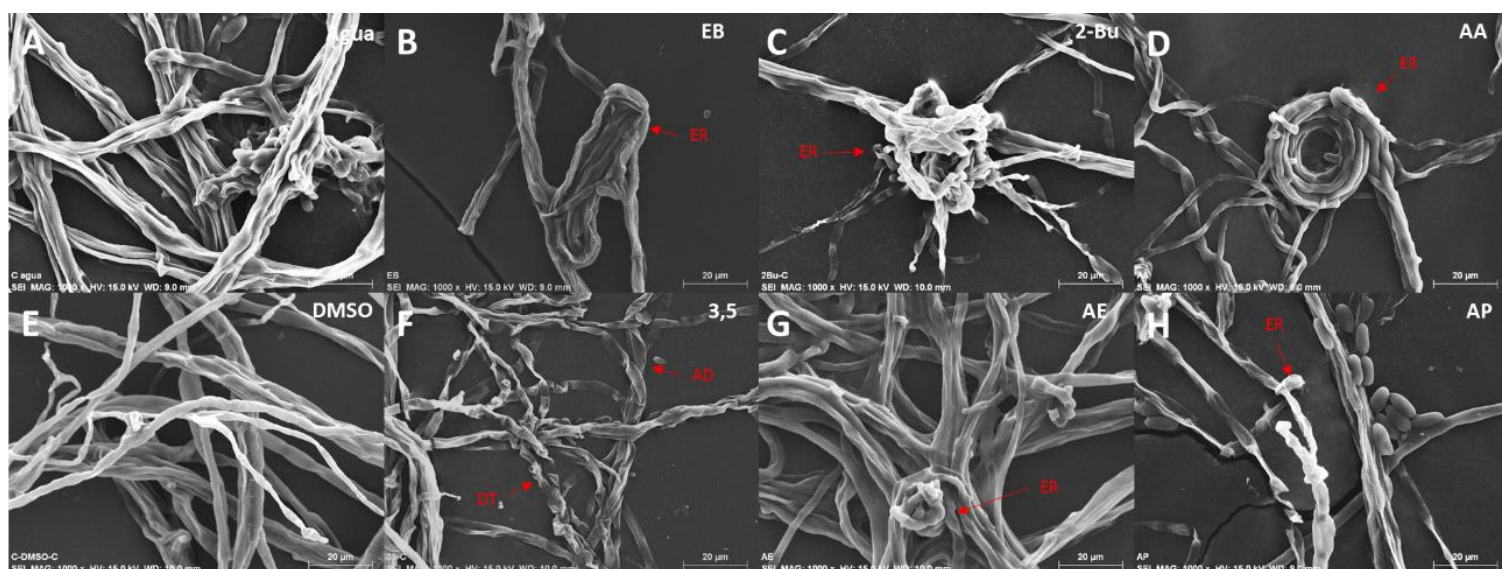


Fig. 12 Micrografías de hifas de *C. acutatum* crecidas en medio suplementado con los compuestos orgánicos. Se muestran fotografías representativas del análisis microscópico electrónico de barrido de las cepas de *C. acutatum* después del tratamiento de 14 días con los compuestos orgánicos. Medio suplementado con: **A**) con agua (control), **B**) butirato de etilo a 10 μ M (EB), **C**) 2- Butoxietanol a 100 μ M (2-Bu), **D**) ácido acético a 100 μ M (AA), **E**) DMSO (Control), **F**) 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μ M (3,5), **G**) ácido esteárico a 100 μ M (AE), **H**) ácido palmítico a 100 μ M (AP. Magnificación 1000X, Alto voltaje: 15KV, distancia de trabajo: 9mm).

Posteriormente, al apreciar el recurrente adelgazamiento de las hifas ocasionado por los compuestos orgánicos se hizo un análisis estadístico del grosor de las hifas, para lo cual al analizar a *C. gloeosporioides*. Inicialmente se observó que el ácido acético reduce de manera significativa el diámetro de las hifas en la zona media de las colonias (Fig. 14A), por su parte no se mostraron diferencias significativas en el diámetro de las hifas para los compuestos 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido esteárico y ácido palmítico (Fig. 14B).

Así mismo, al analizar el efecto de los compuestos orgánicos sobre *C. acutatum*, se observa que el AA reduce de manera significativa el diámetro de las hifas en la zona media de las colonias (Fig. 14C), por su parte no se mostraron diferencias significativas en el diámetro de las hifas para los compuestos 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido esteárico y ácido palmítico (Fig. 14D).

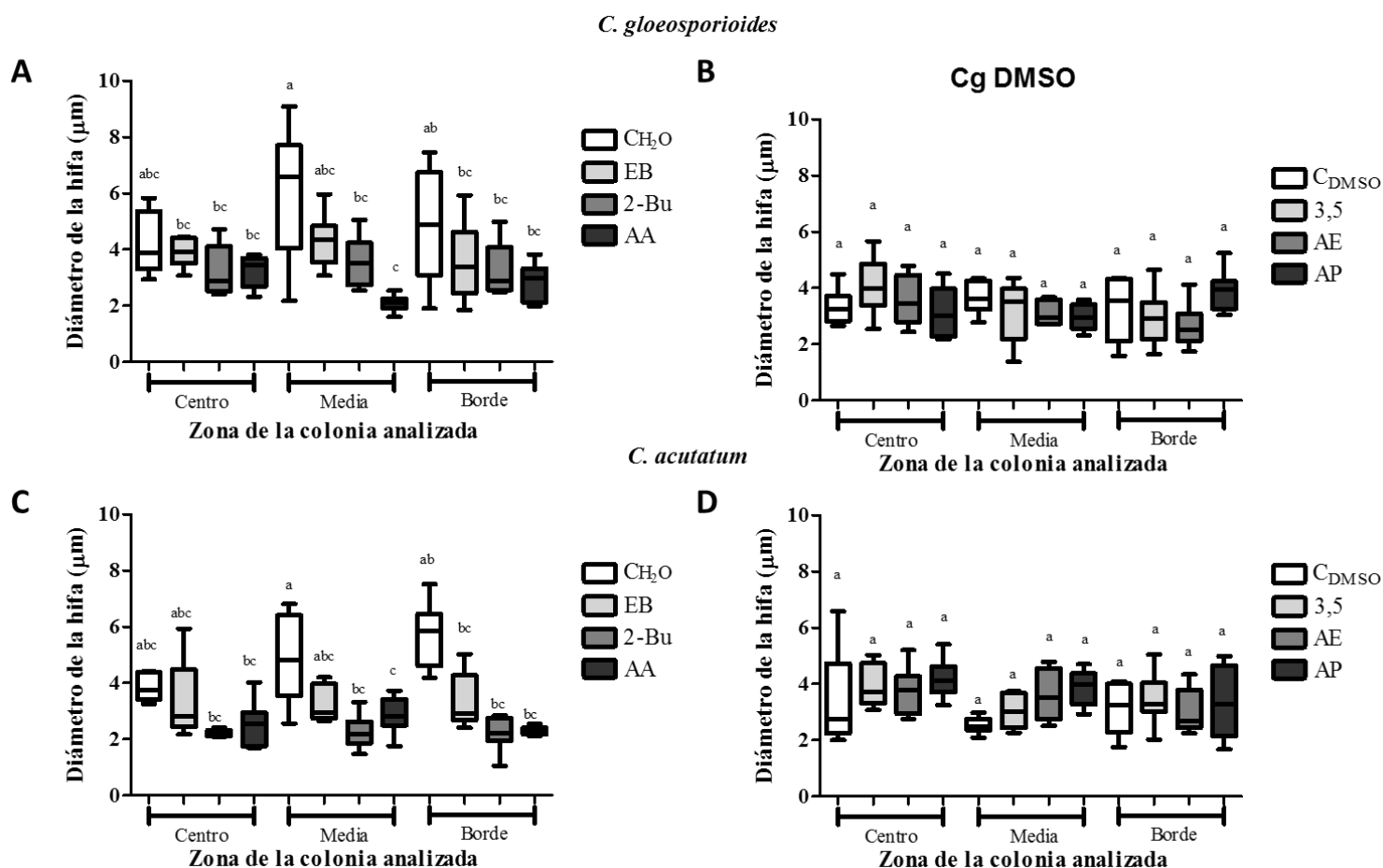


Fig. 13 Efecto de los compuestos orgánicos en el adelgazamiento de las hifas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. A) Diámetro de las hifas de *C. gloeosporioides* tratadas con los compuestos orgánicos, B) Diámetro de las hifas de *C. acutatum* tratadas con los compuestos orgánicos. Los datos mostrados en los paneles representan el promedio de una $n=6$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $P \leq 0.01$. Las letras mostradas en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

Dados los anteriores resultados se concluye que el AA tiene efecto de adelgazamiento de las hifas de los patógenos conforme pasa el tiempo, por lo que es posible que al alcanzar cierta concentración intracelular, éste podría regular de manera negativa factores que están involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo del hongo.

6.2 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

A continuación se evaluó el potencial antifúngico de las mezclas de los compuestos orgánicos, sobre el crecimiento y desarrollo de ambos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Fig. 15).

Las mezclas empleadas fueron, *mezcla 1*: 0.01 μ M butirato de etilo más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico más 100 μ M ácido esteárico, *mezcla 2*: 0.01 μ M 2-Butoxietanol más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico más 10 μ M ácido palmítico, *mezcla 3*: 0.01 μ M butirato de etilo más 100 μ M ácido acético más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, *mezcla 4*: 0.01 μ M 2-Butoxietanol más 100 μ M ácido acético más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, *mezcla 5*: 0.01 μ M butirato de etilo más 0.01 μ M 2-Butoxietanol más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, *mezcla 6*: 0.01 μ M butirato de etilo más 0.01 μ M 2-Butoxietanol más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico más 10 μ M ácido palmítico y finalmente *mezcla 7*: 0.01 μ M butirato de etilo más 0.01 μ M 2-Butoxietanol más 100 μ M ácido acético más 100 μ M 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico.

Una vez establecidas las mezclas, en primer lugar, se realizaron ensayos en caja Petri contra *C. gloeosporioides*, la *mezcla 1* ocasionó deformaciones en forma de huecos en la zona media de la colonia además de disminuir la pigmentación y provocar que el micelio se adelgazará en el borde de ésta. La *mezcla 2* provocó los mismos efectos que la *mezcla 1* (Fig. 15A).

La *mezcla 3* provocó el adelgazamiento del micelio en el borde de la colonia, mientras que la *mezcla 4* ocasionó crecimiento irregular en el centro y borde de la colonia en forma de huecos (Fig. 15A).

De la misma forma se analizó el efecto de las *mezclas 1, 2, 3 y 4* contra *C. acutatum*, en este sentido la *mezcla 1* redujo la pigmentación de la colonia, este efecto fue similar para el resto de las mezclas. Sin embargo, la *mezcla 2* provocó crecimiento irregular en el borde la colonia (Fig. 15A).

Enseguida se analizaron los efectos de las *mezclas 5 a la 7*, en donde primeramente se muestran los ensayos frente a *C. gloeosporioides*, las mezclas provocaron el adelgazamiento de las colonias del centro al borde de las colonias, así como huecos en el micelio del tratamiento con la *mezcla 5*, aunado a esto se aprecia una reducción en la pigmentación de las colonias. Asimismo, para *C. acutatum* se observó que las mezclas disminuyen la pigmentación de las colonias, además de observarse disminución en la formación de hifas aéreas (Fig. 15B).

Al mismo tiempo se analizó el efecto sobre el diámetro de las colonias de las mezclas en las especies de *C. gloeosporioides*, dicho esto se observó que el diámetro de la colonia con la *mezcla 1* tuvo un crecimiento de 6.15 cm, con la *mezcla 4* fue de 6.92 cm, con la *mezcla 5* fue de 7.11 cm, mientras que la *mezcla 6* fue de 6.97 cm, estos valores representan una disminución del crecimiento diametral de las colonias respecto al control del 24.4, 13.6, 11.2 y 14.07%, respectivamente (Fig. 15B).

De la misma manera se observaron los tratamientos frente a *C. acutatum*, los cuales también mostraron un efecto en la reducción del diámetro de las colonias, los datos obtenidos fueron para la *mezcla 2 y 4* tuvieron un crecimiento de 6.8 y 6.76 cm, lo que representó un 14.3 y 14.7% de inhibición respectivamente, por su parte las *mezclas 5, 6 y 7* obtuvieron valores de 6.86, 6.97 y 6.95 cm, con porcentajes de inhibición del 14.3, 14.07 y 14.7%, respectivamente (Fig. 15D).

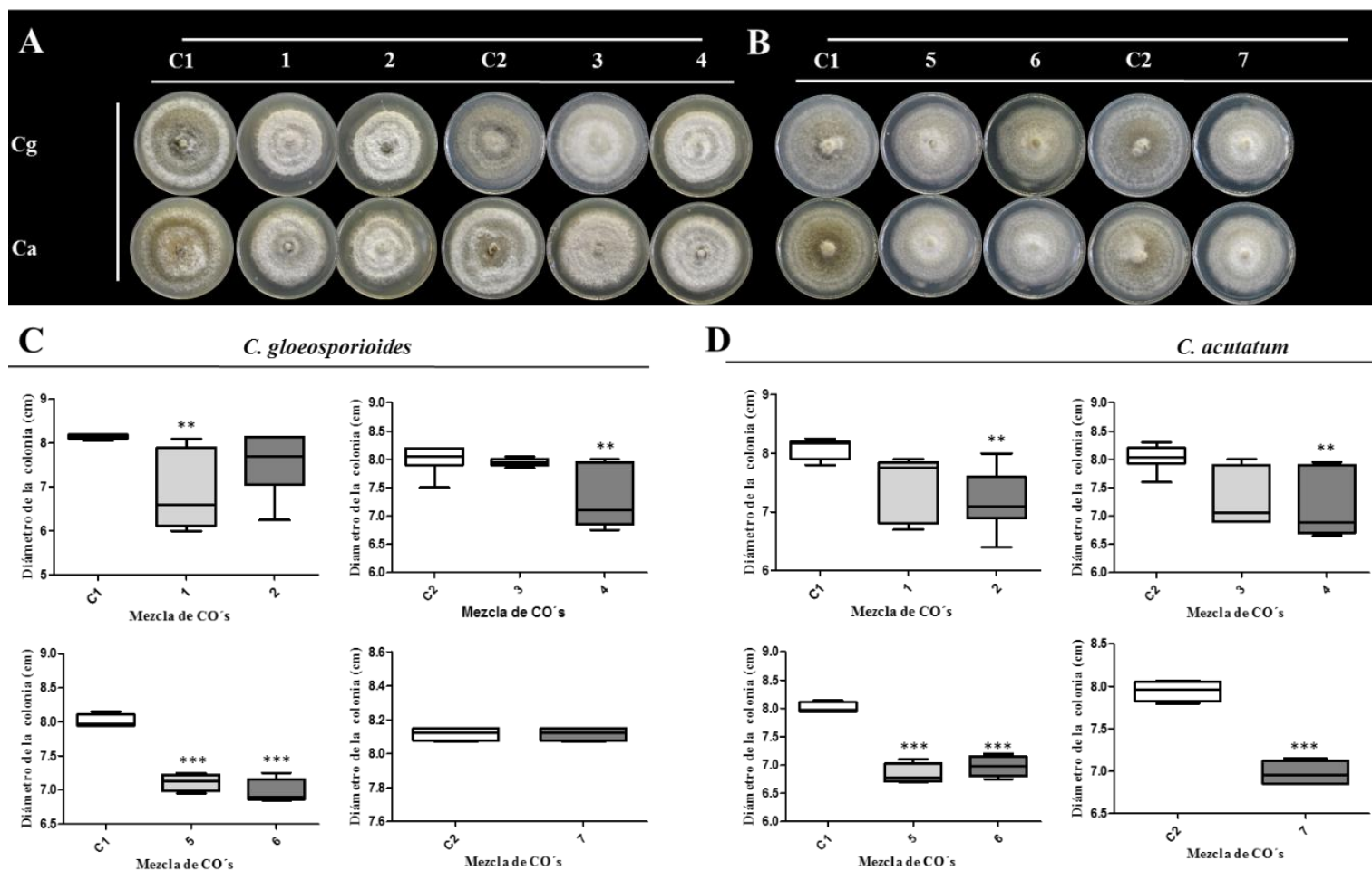


Fig. 14 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre las especies del género *Colletotrichum*. **A)** Efecto de las mezclas triples sobre las especies de *Colletotrichum*. **B)** Efecto de las mezclas cuádruples sobre las especies de *Colletotrichum*. En el panel **A** y **B** se muestran fotografías representativas de los ensayos en caja Petri de las mezclas contra las especies del género *Colletotrichum*. **C)** Diámetro de la colonia de *C. gloeosporioides* y **D)** Diámetro de la colonia de *C. acutatum*. Los datos mostrados en C y D para las mezclas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 representan el promedio de una $n=6 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Tukey con una $P \leq 0.01$. Los datos mostrados en C y D para las mezclas 7 representan el promedio de una $n=6 \pm EE$. Se realizó un análisis de *t* de student. Los asteriscos en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

Después se realizó un análisis microscópico con la finalidad de visualizar la posible existencia de alteraciones morfológicas en las hifas de cepas de los patógenos, para este ensayo se analizaron tres zonas diferentes (zona centro, zona media y zona final).

Para lo cual se analizaron los efectos causados en *C. gloeosporioides* (Fig. 16), en donde la *mezcla 1* en la zona inicial causó la distorsión de las hifas, este efecto fue progresivo hasta la zona final en donde se observó el enrollamiento de éstas.

Por su parte la *mezcla 2* en la zona inicial provocó el enrollamiento y adelgazamiento de las estructuras, posteriormente en las otras zonas hubo distorsión de las hifas. Por otro lado, la *mezcla 3* ocasionó el enrollamiento de las hifas en todas las zonas analizadas, adicionalmente se presentó la formación de vesículas y distorsión de hifas en la zona media y final. De la misma manera la *mezcla 4* provocó la formación de vesículas en la zona media de la colonia, mientras que en la zona final se enrollaron las hifas.

Para las mezclas de cuatro compuestos se obtuvo que la *mezcla 5* provocó la distorsión de las hifas en la zona inicial, mientras que en la zona media se formaron vesículas y, por último, en la zona final se presentó el enrollamiento. Para la *mezcla 6* se observó distorsión y formación de vesículas en las hifas en la zona inicial y media de la colonia, además de enrollamiento y adelgazamiento de hifas en la zona final. Por último, para la *mezcla 7* se apreció la formación de vesículas y adelgazamiento en la zona media, así como enrollamiento de las hifas en zona final.

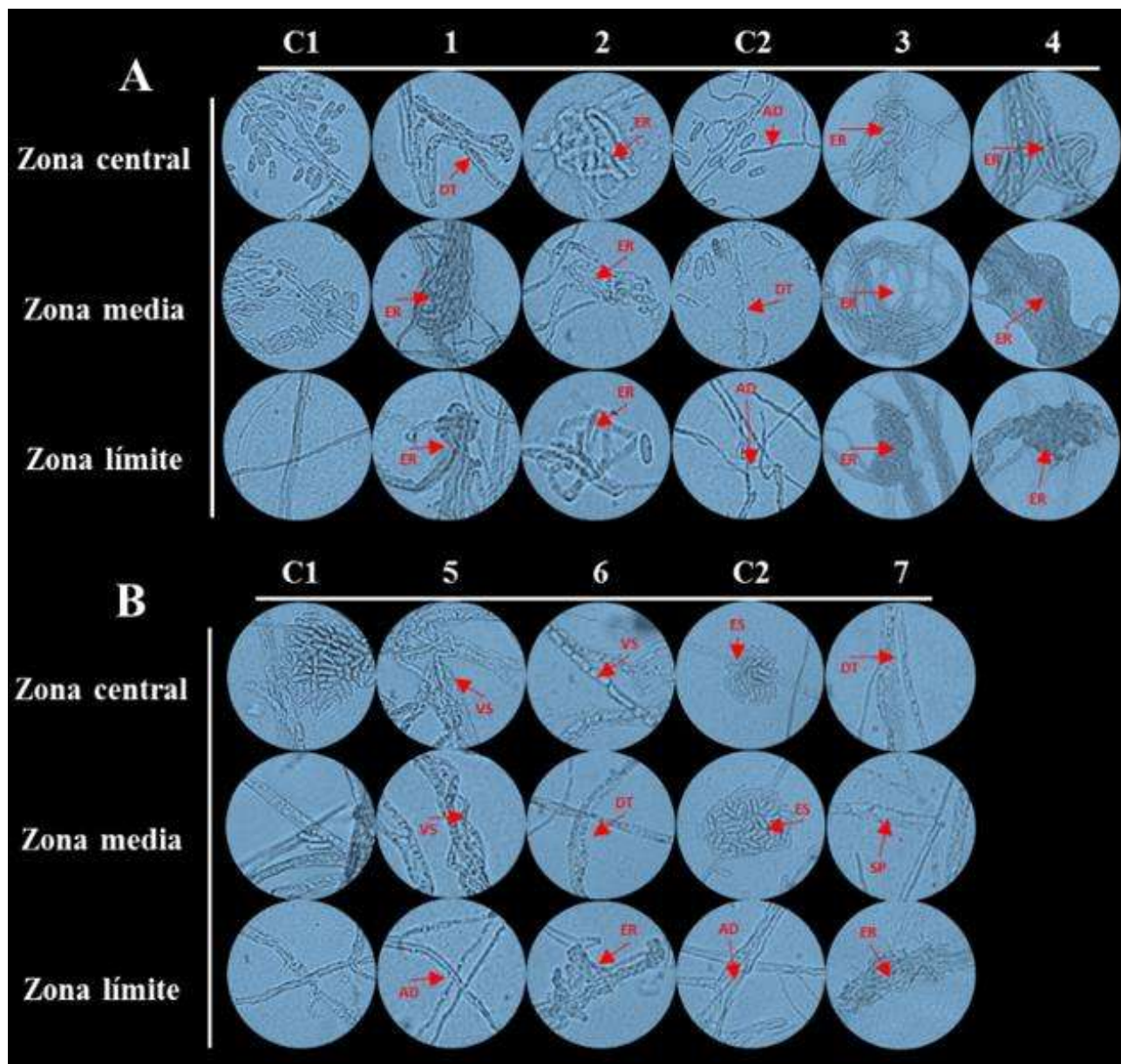
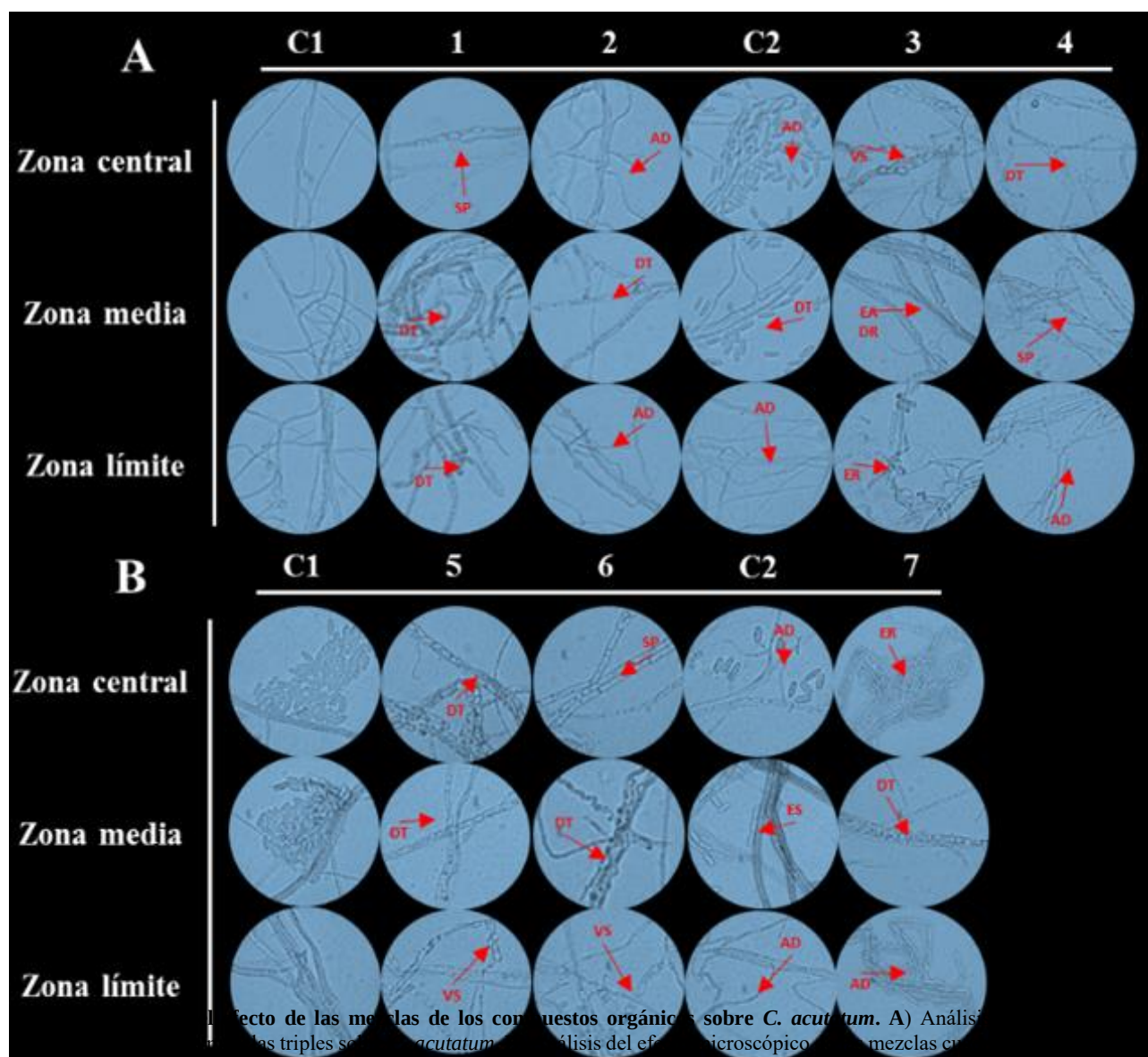


Fig. 15 **Análisis del efecto de las mezclas de los compuestos orgánicos sobre *C. gloeosporioides*.** **A)** Análisis del efecto microscópico de las mezclas triples sobre *C. gloeosporioides*. **B)** Análisis del efecto microscópico de las mezclas cuádruples sobre *C. gloeosporioides*. En el panel **A** y **B** se muestran fotografías representativas de los ensayos en caja Petri de las mezclas contra *C. gloeosporioides*. Se muestran micrografías representativas de los ensayos en caja Petri de *C. gloeosporioides* en donde se observaron cambios en la morfología de las hifas. Los códigos representan los efectos observados a las diferentes concentraciones: adelgazamiento (AD), esporulación (ES), distorsión (DT), vesículas (VS), enrollamiento (ER) y septos (SP). Se utilizó azul brillante para realizar la tinción y posteriormente se visualizó en el microscopio con el objetivo 40X.

De la misma manera se analizaron los efectos causados por las mezclas en *C. acutatum* (Fig. 17), para lo cual la *mezcla 1* ocasionó la formación de vesículas en la zona media y el adelgazamiento de hifas en la zona final. La *mezcla 2* provocó el adelgazamiento de hifas y la distorsión de éstas a partir de la zona media hasta la zona final.

La *mezcla 3* originó la formación de vesículas y distorsión en la zona media y el enrollamiento de hifas en la zona final. La *mezcla 4* promovió la distorsión de hifas en la zona inicial y el adelgazamiento de éstas en la zona final.

Para las mezclas cuádruples; la *mezcla 5* generó la formación de vesículas en la zona inicial y la distorsión de las hifas en la zona media y final. La *mezcla 6* tuvo efectos similares a los mostrados por la *mezcla 5* aunque más notorios. Por último, la *mezcla 7* ocasionó la distorsión de las hifas en la zona inicial y su enrollamiento a partir de la zona media.



C. acutatum. Se muestran micrografías representativas de los ensayos en caja Petri de *C. acutatum* en donde se observaron cambios en la morfología de las hifas. Los códigos representan los efectos observados a las diferentes concentraciones: adelgazamiento (AD), esporulación (ES), distorsión (DT), vesículas (VS), enrollamiento (ER) y septos (SP). Se utilizó azul brillante para realizar la tinción y posteriormente se visualizó en el microscopio con el objetivo 40X.

Los diferentes efectos observados macroscópicamente (micelio laxo, disminución en la pigmentación y reducción en el diámetro de la colonia) y microscópicamente (enrollamiento de la hifas, adelgazamiento, distorsión de éstas, además de la formación de vesículas) estuvieron en función de la combinación de los diferentes compuestos a diferentes concentraciones, esto propone que los compuestos orgánicos en mezclas pueden tener diferentes blancos de acción, por lo que, al ser combinados causan mayores alteraciones con respecto a los tratamientos individuales sobre los patógenos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

6.3 Evaluación *ex vivo* de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Se evaluaron las *mezclas* 5, 6 y 7 como pretratamiento en hojas de *Persea americana* inoculadas con las especies de *Colletotrichum*, primeramente se observó el tratamiento sin recubrimiento (Sr), que presenta marchitamiento parcial de la hoja además de esta mostrarse rígida, mientras que el tratamiento con recubrimiento (Cr) no se presentaron cambios significativos, de la misma forma se presentan controles sin recubrimientos inoculados con *C. gloeosporioides* (CsrCg) y *C. acutatum* (CsrCa), en donde para ambos casos se aprecia una tonalidad café oscura y una textura blanda para las hojas, además de apreciarse crecimiento de los hongos en forma de zonas de color gris (Fig. 18A).

Por otra parte, se observan micrografías de de Sr y Cr, donde se observar que las nervaduras de las hojas no están comprometidos además de no presentarse manchas de color negro en el limbo, caso contrario para CsrCg se observó el crecimiento de hifas sobre las diferentes estructuras de la hojas, para CsrCa el crecimiento de las hifas fue menor pero se produjeron una mayor cantidad de manchas de color negro en el limbo de la hoja (Fig. 18B).

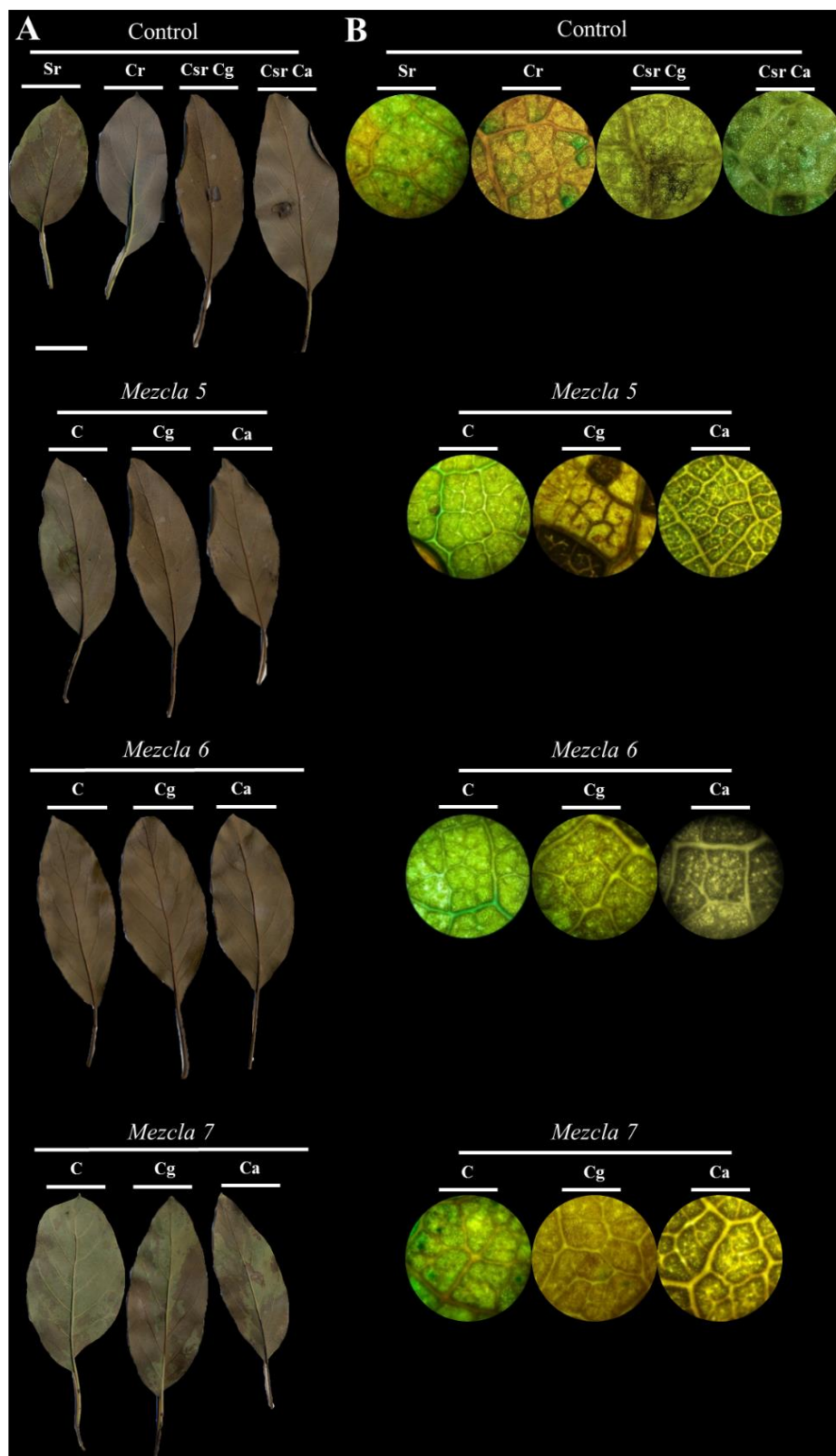


Fig. 17 **Análisis del efecto de las mezclas de los compuestos orgánicos ex vivo sobre las cepas de *Colletotrichum*.** A) Análisis del efecto de las mezclas 5, 6 y 7 sobre las especies de *Colletotrichum* en ensayos sobre hojas de aguacate. Se muestran fotografías representativas del envés de hojas de aguacate Hass a las que se les agregó la mezcla de compuestos

orgánicos y posteriormente fueron inoculadas con *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en donde se observaron cambios en la morfología de las hojas. **B)** Análisis del efecto microscópico de las mezclas 5, 6 y 7 sobre las especies de *Colletotrichum*. Se muestran micrografías representativas del tejido foliar de las hojas y el desarrollo fúngico de los fitopatógenos sobre estas, observadas a 40X

Después se evaluó la *mezcla* 5, donde se observó decoloración en la zona inoculación de ambos patógenos además de observar que la *mezcla* 5 tiene mejor efecto frente a *C. acutatum* al evitar la propagación del patógeno en el resto de la hoja (Fig. 18A). Al analizar microscópicamente las diferentes zonas de las hojas se puede apreciar daño por parte de *C. gloeosporioides* al encontrarse más zonas necrosadas, caso contrario con el patógeno *C. acutatum* (Fig. 18B).

En segundo lugar, se evaluó la *mezcla* 6, donde se observó decoloración en la zona de inoculación, así pues, no se pueden observar diferencias significativas en los tratamientos respecto al control (Fig. 18A). Sin embargo, al analizar microscópicamente, se nota una disminución en la necrosis del tejido de las hojas que fueron inoculadas con *C. gloeosporioides* (Fig. 18B).

En tercer lugar, se analizó la *mezcla* 7, en donde el control a diferencia de los controles de las otras mezclas se observó disminución en el marchitamiento de la hoja, esto fue de manera similar en las hojas inoculadas con los patógenos comparados con las otras mezclas (Fig. 18A). Al analizar microscópicamente para *C. gloeosporioides* se observa un tejido sin alteraciones o pigmentación oscuras, por su parte en el tratamiento con *C. acutatum* se observa necrosis del tejido, pero delimitadas en pequeñas áreas (Fig. 18B). Estos datos sugieren que los compuestos orgánicos disminuyen el proceso de infección de los patógenos

7. Discusión

7.1 Evaluación de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

El aguacate se ha convertido en un producto de interés en el mercado mundial debido a sus características nutritivas y nutraceuticas, en relación con esto, México se posiciona como el productor número uno del mundo, ya que tan solo en el año 2020 se reportó una producción de 1,026 t cifra que representa el 40% de la producción mundial (SIAP, 2019).

A pesar de las diferentes medidas sanitarias que se tienen para que el producto tenga la mejor calidad al ser comercializado, éste puede presentar los síntomas de enfermedades ocasionadas por patógenos poscosecha como *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* agentes causales de la antracnosis.

Dicha enfermedad ocasiona daños tanto en el fruto como en las hojas y ramas, además las esporas de *Colletotrichum* tienen la capacidad de permanecer en estado de quiescencia hasta que el fruto madura, lo que lo convierte un problema severo al momento de la comercialización del fruto (Gonzalez *et al.*, 2020).

En la actualidad hay diversos productos químicos para controlar la antracnosis como: azoxystrobin, hidróxido cúprico y tiabendazol (Cedeño & Monagas, 2007). Sin embargo, éstos presentan desventajas tanto para el agricultor como para el medio ambiente, como contaminación de cuerpos de agua, toxicidad dérmica y la resistencia que desarrollan los patógenos a estos productos (del Puerto *et al.*, 2014).

De ahí que el control biológico nace como una alternativa para afrontar esta problemática, ya que mediante la aplicación de diferentes mecanismos se evita la generación de resistencia del patógeno (Landero-Valenzuela *et al.*, 2017).

Existe una gran variedad de agentes de control biológico, dentro de los cuales se encuentra *Trichoderma*, el cual es considerado un hongo cosmopolita, este microorganismo emplea mecanismos como el micoparasitismo, la competencia por espacio y nutrientes así como la antibiosis para combatir patógenos como *Alternaria porri*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* (Abo-

Elyousr *et al.*, 2014; Dubey *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2017). Además de *Trichoderma*, *Bacillus* es un BCA que produce metabolitos secundarios que poseen la capacidad de controlar diversos patógenos como *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Sphaerothecamacularis* y *Aspergillus niger* (Hassan *et al.*, 2019; Villarreal *et al.*, 2018).

La antibiosis es regulada por las interacciones entre los microorganismos, por lo que la producción de compuestos orgánicos difusibles o volátiles va a diferenciarse por el género y especie de los organismos empleados (Monfil & Casas, 2014). La presente investigación se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de los compuestos orgánicos identificados producidos durante la interacción de *Trichoderma* sp./ *B. subtilis*/ *C. gloeosporioides* sobre los agentes causantes de la antracnosis (*C. gloeosporioides* y *C. acutatum*).

En este sentido se llevó a cabo la evaluación de los compuestos: butirato de etilo, el 2-Butoxietanol, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico, ácido acético, ácido esteárico y ácido palmítico sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*.

Al realizar los ensayos en caja Petri frente a *C. gloeosporioides* no se observaron cambios significativos en el diámetro de las colonias. Sin embargo, al examinar la morfología microscópica de las colonias expuestas a dichos compuestos se observó que el acetato de butilo a 0.1 y 0.01 μM , el 2-Butoxietanol a 0.01 μM , el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 0.1 y 100 μM y el ácido palmítico a 100 μM ocasionaron crecimiento dentro del medio, disminuyeron la producción de melanina, que es relevante para el proceso de infección de los patógenos del género *Colletotrichum*, ya que los apresorios se melanizan por completo (excepto en el poro donde el hongo está en contacto directo con la célula de la planta hospedera), esto permite la turgencia para que así puedan adherirse exitosamente a la superficie de las hojas y comenzar el proceso de infección (Sharma & Kulshrestha, 2015).

Con base en estos resultados se infiere que estos compuestos orgánicos podrían interferir con la expresión de genes que le confieren patogenicidad, efectuada mediante agentes oxidantes (Urán & Cano, 2008). Además, el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μM ocasiona el 8.05% de inhibición del crecimiento diametral de la colonia. Sin embargo, este efecto se alcanza después de 10 días de incubación lo que sugiere que el efecto se alcanza una vez que se internaliza el compuesto a una concentración dada.

Otro posible blanco de acción de este compuesto es la regulación de genes involucrados en el crecimiento micelial, como el gen *CgNPG1*, reportado por Liang *et al.*, (2021), los cuales generaron mutantes de sobreexpresión y eliminación de genes de *CgNPG1* en *C. gloeosporioides*, el análisis de fenotipo mostró que la eliminación de *CgNPG1* condujo a cambios en la morfología de los conidios, disminución del crecimiento micelial, conidiación, tasa de germinación de conidios, tasa de formación de apresorios y patogenicidad de *C. gloeosporioides*, concordando con lo observado en el tratamiento con el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico y probablemente siendo esta clase de genes los blancos de acción de este compuesto .

Por su parte al analizar el efecto de los compuestos orgánicos sobre *C. acutatum*, no se observaron cambios sobre el crecimiento diametral de las colonias. Sin embargo, al analizar la morfología de las colonias expuestas al acetato de butilo a 0.1 μ M, el 2-Butoxietanol a todas las concentraciones y el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 10 μ M, inhibieron la formación de hifas áreas en el centro de las colonias.

Estos datos concuerdan con lo reportado por He *et al.* (2017), quienes reportaron que la ausencia del mitógeno CgMK1, reduce notablemente el crecimiento de hifas áreas de *C. gloeosporioides*, además de que el mitógeno CgMK1 es fundamental para la producción de melanina, la cual contribuye a la rigidez de las hifas y a la melanización del apresorio, que es vital para generar la alta presión de turgencia necesaria para penetrar la epidermis del fruto. Además, se observó que el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 μ M ocasionó reducción en el crecimiento diametral de la colonia, esto puede sugerir que el compuesto 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico puede estar afectando otro blanco de acción relacionado con el crecimiento micelial.

Posteriormente en el análisis microscópico de las colonias de *C. gloeosporioides* expuestas a los compuestos orgánicos, se observó la formación de vesículas para los seis compuestos, el butirato de etilo, el 2-Butoxietanol a 0.01 μ M y el ácido esteárico a 100 μ M, estos datos son semejantes con lo reportado por Yap Chin Ann, 2012, en este estudio se aislaron y se seleccionaron bacterias del género *Bacillus* del suelo autóctonas capaces de desarrollar múltiples mecanismos de acción relacionados con el biocontrol de hongos fitopatógenos que afectan enredaderas de pimiento (*Piper nigrum*). Todos los aislados bacterianos obtenidos

resultaron efectivos para el control *in vitro* del crecimiento de hongos fitopatógenos, donde los mecanismos de control utilizados por las bacterias involucraron la secreción de la enzima proteasa y celulasa que son responsables de la malformación de la hifas se produjo en todos los casos.

La observación microscópica de la zona de inhibición permitió detectar una fuga citoplasmática que se pudo observar hasta el septo de las hifas, lo que provocó la deformación de las hifas miceliales y se formaron vacuolas en comparación con las hifas del control, con esto se puede hipotetizar que el butirato de etilo, el 2-Butoxietanol y el ácido esteárico, afectan la permeabilidad o estabilidad de pared celular.

Además se presentó enrollamiento de hifas en respuesta al butirato de etilo y 2-Butoxietanol a 0.01 μM así como en respuesta al 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico y al ácido esteárico a 100 μM , este efecto puede estar relacionado con alteraciones en el citoesqueleto de actina del patógeno.

Lo anterior dado que, se han realizado experimentos para interrumpir la función de la F-actina con citocalasina D y latrunculina A, confirmando que es necesario un citoesqueleto de actina polimerizada para el crecimiento apical normal, así como para la conservación de la forma de la punta de las hifas y la secreción polarizada de enzimas en diferentes organismos fúngicos. La F-actina se localiza en sitios de morfogénesis celular y de polarización en yemas de levadura y ápices de hifas en crecimiento y tubos germinativos (Wang & Shaw, 2016), por lo que es probable que el 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico y el ácido esteárico, puedan afectar la actividad de proteínas relacionadas con el citoesqueleto.

Al analizar el efecto de los compuestos orgánicos a nivel microscópico sobre *C. acutatum* se observó la distorsión de hifas en los tratamientos de butirato de etilo a 10 μM y 2-Butoxietanol, ácido acético, 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico y ácido esteárico a 100 μM , estos datos concuerdan con lo mostrado por Khan *et al.*, (2018), en donde se llevó a cabo un análisis de los atributos promotores del crecimiento vegetal (PGP) y de biocontrol de cuatro bacilos (*Bacillus simplex* 30N-5, *B. simplex* 11, *B. simplex* 237 y *B. subtilis* 30VD-1). Se estudió la producción de celulasa, xilanasas, pectinasas y quitinasas en ensayos funcionales. De todos los bacilos incluidos en este estudio, *B. subtilis* 30VD-1 (30VD-1)

demostró ser el BCA más eficaz contra *Fusarium* spp. en condiciones *in vitro*. Además, 100 µg/ml del extracto crudo de 1-butanol del filtrado de cultivo libre de células de 30VD-1 causaron aproximadamente un 40% de inhibición en el crecimiento radial de *Fusarium* spp.

La microscopía de contraste de fase demostró distorsiones e hinchazones anormales en las hifas de *F. oxysporum* en el co-cultivo con 30VD-1. Los resultados sugieren un modo multivariado de antagonismo de 30VD-1 contra *Fusarium* spp., al producir quitinasa, volátiles y otras moléculas antifúngicas.

De manera similar a lo observado en *C. gloeosporioides*, en *C. acutatum* se presentó enrollamiento de las hifas en el tratamiento con butirato de etilo a 10 µM, 2-Butoxietanol, y 3,5-Di-*tert*-butilo-4-alcoholhidroxibencílico a 100 µM, por lo que pueden tener el mismo blanco de acción.

Al realizar el análisis de los efectos más notorios ocasionados por los compuestos orgánicos sobre las especies de *Colletotrichum* por microscopia electrónica de barrido, se observó tanto para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, el enrollamiento, distorsión, aplanamiento y la formación de arrugas en las hifas, dichos efectos sugieren que hay afectaciones a nivel molecular, tal como lo reporta Bae *et al.*, 2016 quienes probaron y analizaron mediante FE-SEM, los extractos obtenidos por acetato de etilo de *Trichoderma* sobre aislados de *Phytophthora*. Éstos provocaron importantes cambios en las hifas de *Phytophthora*, que incluía la hinchazón, nudos, arrugas, aplastamientos, arruga, roturas y necrosis.

Estos cambios pueden deberse a la pérdida de integridad de la pared celular debido a la interferencia con la biosíntesis de la pared celular y/o degradación de la pared celular, ya que *Trichoderma* spp. produce diversos metabolitos secundarios que interfieren con la síntesis de la pared celular directa o indirectamente, dando lugar a cambios morfológicos drásticos, como los observados en este ensayo.

Aunado a lo anterior también se observó adelgazamiento de las hifas de ambos patógenos causado por el ácido acético a 100 µM que fue estadísticamente menor en la zona media y final de la colonia para ambos patógenos, estos datos, infieren que hay afectaciones a nivel celular, como lo reportado por Kang *et al.*, 2003, donde probaron ácido acético, oxálico, málico y cítrico, los cuales inhibieron significativamente el crecimiento de *C.*

gloeosporioides, el ácido acético mostró la inhibición más fuerte a 50 mM inhibiendo el crecimiento del hongo.

La inhibición del crecimiento por estos ácidos orgánicos estuvo estrechamente relacionada con la inhibición de la respiración, como se probó usando tres especies, *C. gloeosporioides*, *C. coccodes* y *C. dematium*. A pesar de la inhibición del crecimiento por el ácido acético, el hongo pudo crecer en un medio normal cuando se eliminó el ácido acético, lo que implica que la inhibición del crecimiento puede deberse a una inhibición de la respiración mediada por ácido acético más que a un daño estructural de la célula.

7.2 Evaluación de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Para mejorar el control de los patógenos de la antracnosis se han buscado mezclas sintéticas que puedan disminuir su presencia en la etapa de maduración del fruto, se sabe que los compuestos orgánicos producidos como metabolitos secundarios por BCAs, éstos son conocidos por sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antitumorales y antinematicidas (Mishra & Arora, 2017).

En este sentido, se llevaron a cabo mezclas de los compuestos orgánicos previamente evaluados de manera individual sobre el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

Para *C. gloeosporioides* la mezcla 1, 4, 5 y 6 provocaron disminución en el diámetro de las colonias de manera significativa, además de provocar una coloración blanquecina en las colonias tratadas. Además, la mezcla 4 provocó deformación en el micelio de la colonia en forma de fisuras.

Las mezclas 2, 4, 5, 6 y 7 ocasionaron reducción en el diámetro de las colonias de *C. acutatum*, las colonias presentaron coloración blanquecina, además las mezclas 2 y 5 causaron deformación del micelio en forma de huecos en el micelio, estos datos sugieren que los compuestos orgánicos afectan diferentes blancos de acción en ambos hongos.

Resultados similares fueron reportados por Zhang *et al.*, (2021), quienes evaluaron el efecto de Sub3 (un péptido antimicrobiano corto de 12 aminoácidos con carga positiva a pH 7) contra *Aspergillus flavus*, los resultados experimentales indicaron que las esporas de *A. flavus* no pudieron germinar en medio de cultivo de caldo de papa dextrosa, cuando la concentración de Sub3 excedió 0.15 g L⁻¹.

Al analizar la morfología por citometría de flujo y microscopía electrónica de barrido se observó que las esporas se encogieron y deformaron después de la exposición a Sub3. Además, la capacidad de colonización en el maní se redujo significativamente y el número de esporas en las semillas tratadas con Sub3 se redujo en un 26.86% (0.1 g L⁻¹) y un 77.74% (0.15 g L⁻¹) en comparación con el grupo de control. Estos efectos se contrastan con los observados en el presente trabajo en las colonias de *C. gloeosporioides*, por lo que se podría pensar que estaría sufriendo una afectación en la tasa de respiración y la viabilidad de la membrana.

Además al tener las colonias una coloración blanquecina se debe estar afectado la producción de melanina como lo reportado por Wang *et al.*, (2021) quienes aislaron genes que codifican un factor de transcripción CgCmr1 y una policétido sintasa CgPks1 ortólogos a Pig1 y Pks1 de *Magnaporthe oryzae*, respectivamente. La delección de *CgCmr1* o *CgPks1* dio como resultado una colonia fúngica deficiente en melanina, asimismo no mostró acumulación de melanina en los apresorios, también resultó en la melanización retardada y disminuida en apresorios.

En conjunto, estos resultados sugieren que *CgCmr1* y *CgPks1* juegan un papel importante en la biosíntesis de melanina DHN, pudiendo estos factores de transcripción ser afectados por los compuestos orgánicos analizados.

Al analizar el daño microscópico de las hifas de los patógenos, se apreció un aumento en la deformación de las hifas comparado con los tratamientos individuales, tal es el caso de las mezclas 1, 2, 3 y 4 contra *C. gloeosporioides* donde se observó adelgazamiento, enrollamiento y distorsión de las hifas. Así pues las mezclas 5, 6 y 7 fueron las que tuvieron más efecto sobre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, ya que para *C. gloeosporioides* se

observaron vesículas, enrollamiento y adelgazamiento de hifas, estos efectos se presentaron en todas las mezclas cuádruples.

Estos datos sugieren alteraciones en la pared celular, como lo mostrado en el trabajo de Wei *et al.*, (2016), en donde, un gen MAPK relacionado con Fus3/Kss1, *ChMK1*, de *Colletotrichum higginsianum* fue analizado, este gen juega un papel importante en la integridad de la pared celular.

La delección dirigida de *ChMK1* dio como resultado, hipersensibilidad a los inhibidores de la pared celular, reducción de la conidiación y colonias albinas, además, el mutante de delección tampoco pudo formar un apresorio melanizado, por lo tanto, la mutante pierde patogenicidad. Lo anterior puede relacionar los cambios estructurales de la pared celular de los patógenos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

Los efectos antes mencionados fueron similares para *C. acutatum*, sin embargo, predominó la formación de vesículas en respuesta a las mezclas 5, 6 y 7, lo cual como se mencionó puede ser debido a alteraciones de la pared celular, o bien, a cambios en la presión y tensión de la pared celular.

Estos efectos han sido reportados en metabolitos secundarios aislados de agentes de biocontrol, como lo reportado por Li *et al.*, (2021), en el cual evaluaron la actividad antifúngica de la dihidromaltofilina (factor antifúngico termoestable [HSAF]), contra *C. fructicola* *in vitro* e *in vivo* para determinar su eficacia para el control de la antracnosis.

Para lo que HSAF exhibió actividad antifúngica *in vitro* contra *C. fructicola*, con una concentración de inhibición media de 0.43 mg L⁻¹, microscópicamente, las hifas tratadas con HSAF mostraron defectos como hiperramificación, hinchazón y crecimiento despolarizado. Además, la prueba *in vivo* confirmó que 50 mg L⁻¹ de HSAF redujeron significativamente el desarrollo de la antracnosis en la pera causada por *C. fructicola*. Se ha sugerido que el tratamiento con HSAF interrumpe múltiples redes de señalización y metabolismos celulares esenciales, incluida la vía de señalización de AMPK, el metabolismo de los esfingolípidos y la vía de señalización, el ciclo del TCA (ácido tricarboxílico) y la síntesis de la pared celular. Estos datos pueden sugerir que las mezclas 5, 6 y 7 afectan alguno de los blancos de acción antes mencionadas dadas las alteraciones microscópicas observadas.

7.3. Evaluación *ex vivo* de las mezclas de los compuestos orgánicos puros sobre el crecimiento y desarrollo de las especies de *Colletotrichum*

Basados en los resultados observados *in vitro* se planteó un posible efecto protector de las mezclas de los compuestos orgánicos en tejidos frente a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, por lo que se realizó el análisis *ex vivo* en hojas de aguacate Hass con las mezclas cuádruples (mezclas 5, 6 y 7).

De forma macroscópica, en las hojas tratadas con el recubrimiento suplementado con las mezclas de compuestos orgánicos no se observó daño aparente por parte de los patógenos evaluados (con respecto al control). Esto puede deberse a la reducción en la producción de melanina, ya que como se observó en los análisis *in vitro*, las mezclas de los compuestos orgánicos producen colonias albinas, aunado a esto los compuestos orgánicos podrían disminuir la producción de pectinasas en ambos patógenos inhibiendo el proceso de infección.

Resultados similares fueron reportados por Lakshmesha *et al.*, (2005), los cuales obtuvieron cepas atenuadas de *C. capsici* mediante tratamiento con radiación UV. El tratamiento con UV generó una reducción del 42.86% de la actividad de celulasa y 40% de pectinasa. La reducción de la actividad de estas enzimas provocó un retraso de 3-5 días en la manifestación de la enfermedad de la antracnosis y también redujo la tasa de propagación de la enfermedad, al reducir un 40% del crecimiento vegetativo de hongos y un 10% de disminución en la producción de número de conidios.

Además, al analizar microscópicamente el tejido de la zona de contacto entre los propágulos y las hojas se apreció (comparado con el control) reducción en el daño estructural de las hojas, además de que en los campos analizados no se aprecian hifas, es probable que esto ocurra por la ausencia o deformación de apresorios, los cuales tiene un papel clave en el proceso de infección.

Por lo que los compuestos orgánicos podrían afectar la distribución de la actina en los patógenos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, ya que estudios *in planta* muestran que las

fibras de actina podrían tener un papel esencial en el desarrollo del apresorio, ya que la actina se ensambla también en hifas invasivas, posterior a la penetración de la epidermis (Wang & Shaw, 2016), esto puede sugerir uno de los blanco de acción de las mezclas de los compuestos orgánicos.

Conclusión

Los compuestos orgánicos identificados en la co-inoculación de *Trichoderma* sp./*Bacillus subtilis*/ *Colletotrichum gloeosporioides*, macroscópicamente provocaron colonias albinas, crecimiento irregular, reducción en el crecimiento diametral, mientras que microscópicamente se presentó la formación de vesículas, adelgazamiento, distorsión y enrollamiento de hifas, esto sobre *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, los cuales al ser mezclados aumentan las deformaciones en los patógenos, además éstos pueden tener la capacidad proteger a las hojas de aguacate, lo cual fundamenta la aplicación de metabolitos secundarios en entornos de interés agrícola.

7. Bibliografía

- Abo-Elyousr, K. A. M., Abdel-Hafez, S. I. I., & Abdel-Rahim, I. R. (2014). Isolation of *Trichoderma* and Evaluation of their Antagonistic Potential against *Alternaria porri*. *Journal of Phytopathology*, 162(9), 567–574. <https://doi.org/10.1111/jph.12228>
- Agroasemex, S. (2019). *Las plagas producen pérdidas de hasta un 40 por ciento en la producción agrícola, revela estudio de la FAO*. 1–4.
<https://www.gob.mx/agroasemex/articulos/las-plagas-producen-perdidas-de-hasta-un-40-por-ciento-en-la-produccion-agricola-revela-estudio-de-la-fao?idiom=es>
- Ali, A. A., El-Kader, A. E. S. A., & Ghoneem, K. M. (2017). Two *Trichoderma* species and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Rhizoctonia* disease and their influence on potato productivity. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 95(2), 527–541.
- Amichot, M., Joly, P., Martin-Laurent, F., Siaussat, D., & Lavoit, A. V. (2018). Biocontrol, new questions for Ecotoxicology? *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34), 33895–33900. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3356-5>
- Bae, S. J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S. B., Seo, H., Bae, D. W., Bae, I., Kim, J. J., & Bae, H. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Bosse, R. J., Bower, J. P., & Bertling, I. (2011). Pre- and post-harvest treatments on ‘Fuerte’ avocados to control anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) during ripening. *South African Avocado Grower’s Association Yearbook, South Africa*, 65–69.
- Cedeño, M., & Monagas, E. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha. 19(1), 19–25.
- CEDRSSA. (2017). *Reporte caso de exportación: El Aguacate*. 29.
- Cerdas, M., A., Calderón, M. M., & Cordero, E. D. (2006). Manual de manejo pre y poscosecha de aguacate. *Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación*

y *Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica*.

- CMDRS, C. M. para el D. R. S. (2019). *Situación de las exportaciones de aguacate de Jalisco y Michoacán*, 2019.
- Dane, D. A. N. (2016). Cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill; *Persea nubigena* var. *Guatemalensis* x *Persea americana* var. *drymifolia*), plagas y enfermedades durante la temporada de lluvias. *Boletín Mensual Insumos y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria.*, 17, 1–64. <http://www.lapatria.com/>
- Daneel, M. S., Sippel, A., & Mlimi, J. (2017). Prochloraz a look into factors affecting the variability of residue levels on avocado fruit. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 40, 72–77.
- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. J. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372–387.
- Dubey, S. C., Suresh, M., & Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>
- FAO. (2001). El Estado Mundial De La Agricultura Y La Alimentación. In *Organizacion De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentacion*.
- FAO, & WHO. (2019). *codexalimentarius, Normas Oficiales*. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/es/>
- FAOSTAT, F. and A. O. C. S. D. (2018). *Agricultural avocado statistics: area harvested, yield and production quantity*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

- Gonzalez, J. A. H., Baños, S. B., Garcia, S. S., & Gutierrez Martinez, P. (2020). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate Hass para exportación en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1647–1660. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2402>
- González, M. S., Diego Diamont, P., & Gutiérrez, B. (2011). Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante. *Bioagro*, 23(1), 65–68.
- He, P., Wang, Y., Wang, X., Zhang, X., & Tian, C. (2017). The mitogen-activated protein kinase CgMK1 governs appressorium formation, melanin synthesis, and plant infection of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02216>
- Hernández, A. F., Amparo Gómez, M., Pérez, V., García-Lario, J. V., Pena, G., Gil, F., López, O., Rodrigo, L., Pino, G., & Pla, A. (2006). Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environmental Research*, 102(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.03.002>
- Hernández, I. H. (2013). Determinación de la actividad de las enzimas endo- β -1,3-glucanasa y endo- β -1,4-glucanasa de *Trichoderma* spp. en el proceso de biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* en presencia de *Bacillus subtilis* in vitro. *Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo*, 2013.
- Hinarejos, E., Castellano, M., Rodrigo, I., Bellés, J. M., Conejero, V., López-Gresa, M. P., & Lisón, P. (2016). *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a potential biological control agent. *European Journal of Plant Pathology*, 146(3), 597–608. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0945-3>
- Huang, Y., Wu, Z., He, Y., Ye, B. C., & Li, C. (2017). Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*capsicum annum*). *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9397619>

- Hubballi, M., Maheshwarappa, H., Siddappa, R., & Chandrashekar, G. (2019). Biological Control Agents for the Management of Basal Stem Rot Disease in Coconut. *JMycol Pl Pathol*, 49(1), 89–97.
- Joshi, D., Singh, P., Singh, A. K., Lal, R. J., & Tripathi, N. (2016). Antifungal Potential of Metabolites from *Trichoderma* sp. Against *Colletotrichum falcatum* Went Causing Red Rot of Sugarcane. *Sugar Tech*, 18(5), 529–536. <https://doi.org/10.1007/s12355-015-0421-y>
- Kang, H. C., Park, Y. H., & Go, S. J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiological Research*, 158(4), 321–326. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00211>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5344-5>
- Kevan, P., & Shipp, L. (2011). Biological Control and Biotechnological Amelioration in Managed Ecosystems. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 4, Issue January). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00473-6>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of bacillus species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Kim, P. I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., & Chi, Y. T. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 942–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x>

- Kole, R. K., Roy, K., Panja, B. N., Sankarganesh, E., Manda, T., & Worede, R. E. (2019). Use of pesticides in agriculture and emergence of resistant pests. *Indian Journal of Animal Health*, 58(2-SPL), 53. <https://doi.org/10.36062/ijah.58.2spl.2019.53-70>
- Küçük, Ç., & Kivanç, M. (2003). Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. *Turkish Journal of Biology*, 27(4), 247–253.
- Lakshmesha, K. K., Lakshmidhevi, N., & Mallikarjuna Aradhya, S. (2005). Changes in pectinase and cellulase activity of *Colletotrichum capsici* mutants and their effect on Anthracnose disease on capsicum fruit. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(4), 267–279. <https://doi.org/10.1080/03235400500094100>
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A., & Aguado Rodríguez, G. J. (2017). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189–1198. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.245>
- Lee, B. M., Kwon, S., Cho, Y. M., Kim, K. B., Seo, K., Min, C. S., & Kim, K. (2019). Perspectives on trace chemical safety and chemophobia: risk communication and risk management. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 82(3), 186–199. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1575625>
- Lehotay, S. J. (2018). Food safety analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5329–5330. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1129-0>
- Li, C., Tang, B., Cao, S., Bao, Y., Sun, W., Zhao, Y., & Liu, F. (2021). Biocontrol ability and action mechanism of dihydromaltophilin against. *Ciencia Del Manejo de Plagas*, 2(77), 1061–1069. <https://doi.org/10.1002/ps.6122>
- Liang, C., Zhang, B., Zhou, Y., Yin, H., An, B., Lin, D., & He, C. (2021). *CgNPG1* as a Novel Pathogenic Gene of *Colletotrichum gloeosporioides* From *Hevea brasiliensis* in Mycelial Growth , *Conidiation* , and the Invasive Structures Development. 12(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629387>
- Liu, S., Dai, H., Heering, C., Janiak, C., Lin, W., Liu, Z., & Proksch, P. (2017). Inducing

- new secondary metabolites through co-cultivation of the fungus *Pestalotiopsis* sp. with the bacterium *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron Letters*, 58(3), 257–261.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.12.026>
- Maldonado Zuñiga, E., Becerril Merrlos, J. ., Correa Sánchez, B., Pérez Pérez, R., & M.N, C. A. (2019). Evaluación de metabolitos antifúngicos obtenidos en medio PD mediante el cultivo y co-cultivo de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. *Seguridad Alimentaria: Aprovechamiento Integral y Calidad Microbiológica de Alimentos*, March, 7–15.
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M. R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Napolitano, M., Lombardi, N., Lorito, M., & Woo, S. L. (2018). Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966>
- Marcelino, A. F., Wachtel, C. C., & Ghisi, N. de C. (2019). Are our farm workers in danger? Genetic damage in farmers exposed to pesticides. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3).
<https://doi.org/10.3390/ijerph16030358>
- Marican, A., & Durán-Lara, E. F. (2018). A review on pesticide removal through different processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3), 2051–2064.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0796-2>
- Medina, E. Q. A., Oliveira, A. S., Medina, H. R., & Rangel, D. E. N. (2020). Serendipity in the wrestle between *Trichoderma* and *Metarhizium*. *Fungal Biology*, 124(5), 418–426.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.01.002>
- Mishra, J., & Arora, N. K. (2017). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, May, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>
- Monfil, V. O., & Casas-Flores, S. (2014). Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. In *Biotechnology and*

Biology of Trichoderma. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1>

Muirhead, I. F., Fitzell, R. D., Davis, R. D., & Peterson, R. A. (1982). Post-harvest control of anthracnose and stem-end rots of fuerte avocados with prochloraz and other fungicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 22(119), 441–446. <https://doi.org/10.1071/EA9820441>

Nagórska, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495–508. https://doi.org/10.18388/abp.2007_3224

Obianom, C., Romanazzi, G., & Sivakumar, D. (2019). Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 147(October 2018), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.004>

Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44, 33–43. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0046-0>

Ramírez, E. V., Peña, C. A. U., Macías, L. I. R., Reyes, H. de la C., & Chávez, M. N. A. (2020). In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate , a compound produced during the co - culture of *Trichoderma* sp . and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>

Reim, M., & Lopes, B. (2018). *Gliotoxin and Bis-methyl-gliotoxin production by Trichoderma spp . as biocontrol agents*.

Restrepo, J. C., Sánchez, R., Beltrán, J. F., Beltrán, T., Soto, C. A., & Nieto, F. J. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass. *Linea Agrícola*.

Rodríguez-Romero, V. M., Villanueva-Arce, R., Trejo-Raya, A. B., & Bautista-Baños, S. (2019). Quitosano y extractos de *Pseudomonas fluorescens* para el control de

- Alternaria alternata* en jitomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2), 1–18.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1812-2>
- SAGARPA. (2011). Monografía de cultivos: Aguacate. *Subsecretaría de Fomento a Los Agronegocios*.
- Saint-Vincent, P. M. B., Ridout, M., Engle, N. L., Lawrence, T. J., Yeary, M. L., Tschaplinski, T. J., Newcombe, G., & Pelletier, D. A. (2020). Isolation, characterization, and pathogenicity of two *Pseudomonas syringae* pathovars from populus trichocarpa seeds. *Microorganisms*, 8(8), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081137>
- Sánchez, F. (2019). La resistencia de las plagas y enfermedades ante el control convencional y la búsqueda de alternativas de biocontrol. *Tierra Infinita*, 5(1), 249.
<https://doi.org/10.32645/26028131.856>
- Sánchez, S., Mijares, P., López, L., & Barrientos, A. (2001). Historia del aguacate en México. *Memoria 1998-2001. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX S. C.*, 171–187. http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1998-2001/CICTAMEX_1998-2001_PG_171-187.pdf
- SEGRADO, S. de D. A. (2019). *Manejo integrado de plagas y enfermedades en el cultivo del aguacate*. 01(722).
- Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: An Anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233–1246. <https://doi.org/10.13005/bbra/1776>
- Sharma, V., Salwan, R., Sharma, P. N., & Kanwar, S. S. (2017). Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.042>
- SIAP, S. de I. A. y P. (2019). Boletín Mensual de producción de aguacate. *Avance de Siembras y Cosechas, Resumen Nacional Por Cultivo*, 1.

https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/Bol_Insumos_oct_2015.pdf
https://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/01/PROEC_IC_06_60.pdf

Smith, G. H., Roberts, J. M., & Pope, T. W. (2018). Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection*, 110(January), 125–130.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.011>

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 1–25. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

[illegible]

Ul Hassan, Z., Al Thani, R., Alnaimi, H., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2019). Investigation and Application of *Bacillus licheniformis* Volatile Compounds for the Biological Control of Toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp. *ACS Omega*, 4(17), 17186–17193. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01638>

Urán, M. E., & Cano, L. E. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Melanina: Implicaciones En La Patogénesis de Algunas Enfermedades y Su Capacidad de Evadir La Respuesta Inmune Del Hospedero* *Melanin: Implications in Some Disease Pathogenesis and Its Capacity to Evade the Host Immune Response*, 12(2), 128–148.

Villarreal M. F., Villa E. D., Cira L. A., Estrada M. I., Parra F. I., & De los Santos S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la

- bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, C. L., & Shaw, B. D. (2016). F-actin localization dynamics during appressorium formation in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, 108(3), 506–514. <https://doi.org/10.3852/15-068>
- Wang, X., Lu, D., & Tian, C. (2021). Analysis of melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Biology*, 125(9), 679–692. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.04.004>
- Wei, W., Xiong, Y., Zhu, W., Wang, N., Yang, G., & Peng, F. (2016). *Colletotrichum higginsianum* mitogen-activated protein kinase ChMK1: Role in growth, cell wall integrity, colony melanization, and pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01212>
- Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environmental Science and Engineering*, 6(03), 140–158. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.803.224>
- Yap Chin Ann. (2012). Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research*, 6(19), 4185–4193. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.583>
- Zapata, E. J., Ochoa, S. A., Ceja, J. E., Gómez, F. A. V., & Ríos, A. F. M. (2014). *Manual técnico poscosecha del aguacate Hass (Persea americana Mill)*.
- Zhang, W., Lv, Y., Lv, A., Wei, S., Zhang, S., Li, C., & Hu, Y. (2021). Sub3 inhibits *Aspergillus flavus* growth by disrupting mitochondrial energy metabolism, and has potential biocontrol during peanut storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 486–496. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10657>