



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA  
“PRESIDENTE JUÁREZ”

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**MICROORGANISMOS AISLADOS DE ESPECIES SILVESTRES DE *Rubus* sp. CON  
POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA  
ECONÓMICA**

**TESIS DE MAESTRÍA**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

PRESENTA:

**ERWIN SAÚL NAVARRETE SALDAÑA**  
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

DIRECTOR DE TESIS:

**PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO**  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

URUAPAN, MICHOACÁN

MAYO de 2021

*“Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene una gran belleza”*

-Marie Curie

*Para Lupita, Migue y Fer, con amor.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi amigo y modelo a seguir, Pedro, gracias por todo.

A mi familia y amigos, los amo.

A mi *alma mater*, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A mi comité sinodal.

Al CONACyT.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
I. RESUMEN GENERAL.....	9
II. ABSTRACT .....	10
III. INTRODUCCIÓN.....	11
3.1 EL GÉNERO <i>RUBUS</i> : POTENCIAL DEL CULTIVO DE ZARZAMORA.....	11
3.2 LOS FITOPATÓGENOS MICROBIANOS COMO FACTOR LIMITANTE EN LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS.....	12
3.2.1 HONGOS Y OOMYCETES FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	13
3.2.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	13
3.2.1.2 <i>Cylindrocarpon liriodendri</i> .....	14
3.2.1.3 <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands .....	14
3.3 CONTROL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS.....	15
3.3.1.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.....	16
3.4 MICROBIOMA EN PLANTAS COMO RECURSO POTENCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL .....	19
3.5 METABOLISMO SECUNDARIO .....	20
3.5.1 RUTA POLICÉTIDA.....	21
3.5.2 RUTA DE LOS PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES .....	22
3.6 METABOLITOS SECUNDARIOS MICROBIANOS .....	24
3.6.1 POLICÉTIDOS .....	26
3.6.2 PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES .....	27
3.6.2.1 <i>SIDERÓFOROS</i> .....	28
3.6.3 ALCALOIDES.....	30
3.6.4 TERPENOIDES.....	31

3.6.5	COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES.....	31
3.7	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	33
3.7.1	EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE).....	33
3.7.2	MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).....	35
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	37
V.	HIPÓTESIS.....	37
VI.	OBJETIVOS.....	37
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	37
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
VII.	RESULTADOS.....	38
7.1	CAPITULO I. MICROBIOTA DE <i>Rubus</i> SPP. SILVESTRES: RECURSO POTENCIAL PARA EL CONTROL DE AGENTES FITOPATÓGENOS Y LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	38
7.1.1	RESUMEN.....	38
7.1.1.1	ABSTRACT.....	39
7.1.2	INTRODUCCIÓN.....	40
7.1.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.1.3.1	AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE AISLADOS CON POTENCIAL INHIBITORIO.....	42
7.1.3.2	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE BIOENSAYOS DE COCULTIVO <i>in vitro</i> .....	42
7.1.3.3	IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS.....	43
7.1.3.4	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS MICROBIANOS.....	43
7.1.3.5	BIOENSAYOS <i>in vitro</i> UTILIZANDO EXTRACTO MICROBIANO DE <i>Penicillium manginii</i> .....	44
7.1.3.6	EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS.....	45

7.1.3.7	BIOENSAYOS <i>in vitro</i> PARA EVALUAR LA PRESENCIA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS .....	45
7.1.3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	46
7.1.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
7.1.4.1	OBTENCIÓN DE LA MICROBIOTA DE <i>Rubus</i> SPP. E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS MICROBIANOS.....	46
7.1.4.2	ACTIVIDAD INHIBITORIA <i>in vitro</i> DE AISLADOS MICROBIANOS .....	47
7.1.4.3	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS .....	50
7.1.4.4	PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS .....	52
7.1.4.5	COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS (VOC <sub>m</sub> ).....	55
7.1.4.6	EFFECTO DE VOC <sub>m</sub> SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Lactuca sativa</i> .....	57
7.1.5	CONCLUSIONES .....	59
7.1.6	LITERATURA CITADA.....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> EFECTO INHIBITORIO <i>in vitro</i> DE LOS AISLADOS MICROBIANOS DE <i>Rubus</i> sp. SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL (mm) DE <i>P. cinnamoni</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> Y <i>Cylindrocarpon liriodendri</i> EN CONFRONTACIÓN DIRECTA E INDIRECTA. ....	49
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> BIOENSAYOS DE COCULTIVO ENTRE <i>Fusarium oxysporum</i> Y ESPECIES DE <i>Trichoderma</i> .....	17
<b>FIGURA 2.</b> ILUSTRACIÓN DE FUNGISTASIS.....	18
<b>FIGURA 3.</b> “APLICAR TÉCNICAS DE CULTIVO A LA MEDIDA DE LOS MICROORGANISMOS DE LAS PLANTAS”.....	20
<b>FIGURA 4.</b> RUTA POLICÉTIDA.....	21
<b>FIGURA 5.</b> FORMACIÓN DE PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES .....	23
<b>FIGURA 6.</b> SIDERÓFOROS SECRETADOS POR BACTERIAS .....	29
<b>FIGURA 7.</b> SIDERÓFOROS (HIDROXAMATOS) SECRETADOS POR HONGOS.....	30
<b>FIGURA 8.</b> MICROGRAFÍAS DE <i>Phytophthora infestans</i> CON PRESENCIA Y AUSENCIA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOC) DE <i>Trichoderma atroviridae</i> .....	32
<b>FIGURA 9.</b> ESQUEMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO. ....	34
<b>FIGURA 10.</b> ESQUEMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DE CULTIVO LÍQUIDO DE MICROORGANISMOS.....	35
<b>FIGURA 11.</b> ESQUEMAS DE LAS CUATRO TÉCNICAS DE ANÁLISIS <i>HEADSPACE</i>	36

<b>FIGURA 12.</b> PROCESO DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS.....	44
<b>FIGURA 13.</b> CRECIMIENTO DE CEPAS MICROBIANAS DE <i>Rubus</i> spp. Y FITOPATÓGENOS EN PDA.....	47
<b>FIGURA 14.</b> EFECTO DE AISLADOS MICROBIANOS DE <i>Rubus</i> spp. SILVESTRES SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE FITOPATÓGENOS.....	50
<b>FIGURA 15.</b> EFECTO DE TRES DOSIS DEL EXTRACTO CRUDO DE <i>Penicillium manginii</i> SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE FITOPATÓGENOS.....	51
<b>FIGURA 16.</b> DETERMINACIÓN DE SIDERÓFOROS DE AISLADOS MICROBIANOS Y FITOPATÓGENOS EN MEDIO CROMO AZUROL S (CAS). .....	53
<b>FIGURA 17.</b> PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS DE AISLADOS MICROBIANOS Y FITOPATÓGENOS EN MEDIO CROMO AZUROL S (CAS) A LAS 24 h. ....	54
<b>FIGURA 18.</b> PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS DE AISLADOS MICROBIANOS Y FITOPATÓGENOS EN MEDIO CROMO AZUROL S (CAS) A LOS SIETE DÍAS.....	54
<b>FIGURA 19.</b> EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS (VOCm) DE AISLADOS MICROBIANOS SOBRE FITOPATÓGENOS	56
<b>FIGURA 20.</b> GRÁFICA DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS (VOCm) DE AISLADOS MICROBIANOS SOBRE FITOPATÓGENOS .....	57
<b>FIGURA 21.</b> GRÁFICA DEL EFECTO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS (VOCm) EN EL CRECIMIENTO RADICULAR DE <i>Lactuca sativa</i> .....	58
<b>FIGURA 22.</b> EFECTO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES MICROBIANOS (VOCm) EN EL CRECIMIENTO RADICULAR DE <i>Lactuca sativa</i> . .....	59

## I. RESUMEN GENERAL

El uso desmedido de pesticidas en los cultivos ha generado resistencia de varios agentes fitopatológicos, afectado al ambiente y salud humana. Por ello, es necesario implementar sistemas amigables, como el microbioma de plantas como alternativa para el desarrollo de nuevas formas de control. Trabajos realizados en microbioma de plantas muestran el potencial de microorganismos antagonicos o los metabolitos secundarios derivados de éstos. Los hongos y bacterias habitan dentro o fuera de las plantas y gracias a sus aplicaciones biotecnológicas, en años recientes se han enfocado estudios en su aplicación en la agricultura para el control de enfermedades en plantas. Su capacidad para secretar metabolitos secundarios y compuestos orgánicos volátiles (VOCm, por sus siglas en inglés) que intervienen en procesos como la esporulación, la captación y almacenamiento de hierro (Fe), o en defensa o promoción del crecimiento vegetal han despertado gran interés para su estudio. Los metabolitos inciden positivamente en los microorganismos o en sus hospederos, por ello es necesario evaluar su potencial en cepas de nichos ecológicos nativos, como en el caso de *Rubus* spp. silvestres (i. e., zarzamoras y frambuesas), para extrapolar las herramientas biotecnológicas hacia plantas cultivadas que son afectadas por agentes fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue aislar el microbioma fungoso y bacteriano asociado a plantas silvestres de zarzamora para determinar su efecto antagonista sobre agentes fitopatógenos de importancia económica. El potencial antagonico microbiano y de extractos se evidenció en bioensayos de cocultivo y difusión en disco, respectivamente. Se utilizó el medio CAS para detección de sideróforos y bioensayos para evaluar VOCm. Se encontraron hongos y bacterias antagonistas de *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon liriodendri* y *Phytophthora cinnamomi* que presentaron la capacidad para secretar sideróforos y VOCm.

**Palabras clave:** Microbioma, antagonismo, metabolitos secundarios, sideróforos, COVm

## II. ABSTRACT

The excessive use of pesticides in crops has generated resistance of plant pathogens, that affect the environment and human health. Therefore, it is necessary to implement ecologically friendly systems, such as the use the plant microbiome as alternative for the development of new control forms. Studies carried out on the microbiome of plants show the potential of their antagonistic microorganisms or the secondary metabolites derived from them. Fungi and bacteria living inside or outside plants could be used for biotechnological applications. In recent years, studies have been focused on their application in agriculture for the control of plant diseases. Their ability to secrete secondary metabolites and volatile organic compounds (VOCm) that are involved in processes such as sporulation, Fe uptake and storage, or in defense or plant growth promotion have fomented great interest for study. Metabolites have a positive impact on microorganisms or their hosts. Therefore, it is necessary to evaluate their potential in strains obtained from native ecological niches, as in the case of wild *Rubus* spp. (i.e., blackberries and raspberries), for the use as biotechnological tools. The aim of this work was to isolate the fungal and bacterial microbiome associated with wild blackberry plants to determine their antagonist effect against economically important phytopathogens. The microbial and extracts antagonistic potential was evidenced in coculture and disk diffusion bioassays, respectively. The CAS medium was used for detection of siderophores and bioassays to evaluate VOCm. Antagonistic fungi and bacteria against *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon liriodendri* and *Phytophthora cinnamomi* that showed the capacity to secrete siderophores and VOCm, were found.

**Keywords:** Microbiome, antagonism, secondary metabolites, siderophores, VOCm

### III. INTRODUCCIÓN

Los agentes fitopatógenos miembros de Fungi y Oomycota representan un importante factor que limita la producción y genera pérdidas de cultivos agrícolas en todo el mundo, al causar enfermedades en campo o en poscosecha. En este escenario, los pesticidas juegan un papel primordial para el control de fitopatógenos, lo cual ha repercutido negativamente en la salud humana y en el medio ambiente por el mal uso de éstas herramientas.

En los últimos años, se ha aislado microbioma de diversos nichos ecológicos y ha sido detectada la producción de compuestos activos con capacidad de inhibir a otros microorganismos. Esta situación ha sido evidenciada por Chevrette *et al.* (2019) quienes aislaron especies de *Streptomyces* presentes en el microbioma asociado a insectos, suelo y plantas y determinaron su impacto sobre la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias de importancia ecológica y patogénica. Lo anterior marcó una pauta en los estudios de la actividad antimicrobial del género y proporcionó información sobre genes codificantes de compuestos con capacidades bioactivas y potencial biosintético sin caracterizar. Por su parte, Cortes-Patio *et al.* (2021) demostraron que el uso de consorcios microbianos a base de *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* incrementaron la biomasa de *Lolium perenne* L. en condiciones de déficit hídrico debido a la capacidad de las bacterias para producir fitohormonas e inducir tolerancia sistémica.

Lo anterior, aporta evidencia sobre las multifuncionalidades de los microorganismos y consolida la exploración en zonas que presentan nichos ecológicos sin alteraciones para realizar el aislamiento de especies microbianas en especies vegetales como la zarzamora silvestre con potencial uso como agentes de biocontrol o para la obtención de compuestos derivados del metabolismo microbiano con potencial biopesticida.

#### **3.1 El género *Rubus*: potencial del cultivo de zarzamora**

*Rubus* es un género diverso, pertenece a la familia Rosaceae, con más de 700 especies descritas (Foster *et al.* 2019). El origen se atribuye a China. Debido a su diversidad fenotípica las especies se encuentran distribuidas en todo el mundo (Foster *et al.* 2019), y abarcan desde zonas templadas hasta frías del hemisferio norte, pero también en zonas montañosas intertropicales,

como la zona de Michoacán, donde de han identificado 7 especies (Calderón y Rzedowski 2005).

La diversidad de especies silvestres garantiza la disponibilidad de germoplasma con variación para obtener nuevos recursos vegetales con resistencia potencial hacia plagas y enfermedades (Foster *et al.* 2019). Sin embargo, el estudio de los microorganismos asociados a *Rubus* es limitado. Por ello, la realización de estudios que demuestren el efecto y potencial del microbioma vegetal en el control de plagas y enfermedades resulta primordial, como el trabajo realizado por Santoyo *et al.* (2020) que reportaron el potencial del microbioma rizósferico de zarzamoras comerciales (*Rubus fruticosus*), específicamente el bacteriano, para codificar genes precursores de sideróforos (*phlD* y *hcnC*). Asimismo, mediante caracterización cultural con la utilización de medio Chromo Azurol S se demostró de una forma rápida y económica la capacidad para producción de sideróforos *in vitro*. Por otro lado, Contreras *et al.* (2016) reportaron la doble función de los metabolitos secundarios de bacterias endófitas de *R. fruticosus*; por una parte, estimularon el crecimiento vegetal con la producción de ácido indol acético y por otro, al confrontarlos con agentes fitopatógenos, mostraron una actividad antagónica en *Botrytis cinerea*. Lo anterior, demostró el potencial del microbioma de zarzamoras silvestres y su uso en cultivos comerciales.

### **3.2 Los fitopatógenos microbianos como factor limitante en la producción de cultivos**

La demanda de alimentos se acrecentará hasta en un 70 % más según estimaciones de la demografía para el año 2050 (Carbajal-Yepes *et al.* 2019).

La variedad de fitopatógenos microbianos es abundante y precisa un factor limitante para el desarrollo y productividad de los cultivos agrícolas. Los agentes fitopatógenos incluyen a los hongos y oomycetes, organismos capaces de afectar un amplio rango de especies de plantas y de generar impactos de índole social, económico y/o ecológico que varía en magnitud de acuerdo a la relación en pérdidas cualitativas y cuantitativas. La importancia de los oomycetes en la agricultura se ha marcado a través de los años. Ejemplos como el tizón tardío de la papa o el midiú de la vid resultaron en enfermedades destructivas que causaron deterioros en la economía de países europeos y la migración de millones de personas debido a la hambruna provocada, sobre todo, por grandes pérdidas en los cultivos de papa (Narayanasamy 2011). Los

hongos y oomycetes fitopatógenos han marcado al hombre a través de la historia; evidencias en escrituras antiguas establecen un antecedente en la aparición de enfermedades en cereales y de cultivos de vid, los cuales eran catalogados como elementos divinos o hechos sobrenaturales debido a las creencias de la época e influencias de la religión (Khan *et al.* 2020, Narayanasamy 2011).

### **3.2.1 Hongos y oomycetes fitopatógenos de importancia económica**

Dentro de los agentes bióticos que limitan el desarrollo y la producción de cultivos agrícolas, se encuentran hongos y oomycetes (Agrios, 2005). Una máxima eficacia en la selección de los patógenos de importancia se logra gracias al conocimiento en la extensión de los fitopatógenos, su prevalencia en los cultivos y la amenaza latente de padecer epidemias. En ocasiones, las enfermedades o los agentes causales de estas que no son consideradas importantes pueden desarrollarse en los cultivos y causar enormes pérdidas o inclusive hambruna. Además, es importante mencionar que muchas enfermedades son generadas a consecuencia de la actividad humana (Khan *et al.* 2020). Es el caso de *Fusarium* spp., patógeno ampliamente distribuido a nivel mundial que provoca el taponamiento de los conductos vasculares y pudriciones de raíces en diversos cultivos tropicales. Por su parte, síntomas de marchitamiento en frutales como la vid, manzanos y aguacates son ocasionados por pudrición radicular y se asocian a especies de *Phytophthora* spp. y *Cylindrocarpon* spp. (Agrios 2005; Ramírez *et al.* 2014, Téliz y Mora 2007).

#### **3.2.1.1 *Fusarium oxysporum***

Es un hongo de suelo con capacidad patogénica que pertenece al grupo de los ascomycetos. Afecta a gran diversidad de plantas al causar marchitamiento y es catalogado como agente causal del síndrome vascular letal en plantas. *Fusarium oxysporum* comprende más de 100 cepas con hospederos específicos conocidas como *formae speciales* distribuidas alrededor del mundo (Gordon 2017). Algunas *formae speciales* de *F. oxysporum* se encuentran ampliamente distribuidas en cultivos de importancia. Tal es el caso de *F. oxysporum* f. sp. *mori* que afecta a cultivos comerciales de zarzamoras o se encuentra latente en reservorios silvestres (Pastrana *et al.* 2020).

*F. oxysporum* forma estructuras reproductivas de carácter asexual conocidas como microconidios, macroconidio y de resistencia denominadas clamidosporas, además, presenta núcleos derivados de mitosis. En general, la fase sexual se encuentra ausente al menos en reportes oficiales. Hasta la fecha no se ha evidenciado la producción de peritecios, ascas y ascosporas por parte del organismo, lo cual resulta anormal en el grupo eukariota (Gordon 2017). Asimismo, por medio de análisis de genética poblacional se puede obtener evidencia indirecta de la capacidad de *F. oxysporum* para reproducirse sexualmente con lo cual se esperaría la generación de mayor diversidad genotípica en comparativa a la reproducción asexual. Pero este tipo de excepciones son infrecuentes. En general, la diversidad poblacional de especies locales de *F. oxysporum* es bastante limitada (Gordon 2017).

#### **3.2.1.2 *Cylindrocarpon liriodendri***

Es un hongo de suelo que causa la enfermedad destructiva de raíces conocida como “pie negro” en cultivos de importancia económica como *Vitis vinifera* y *Actinidia chinensis* (Dann *et al.* 2012, Erper *et al.* 2013, Probst *et al.* 2019). El papel de *Cylindrocarpon liriodendri* en la patogenicidad de cultivos de aguacate (*Persea americana*) en Italia, Australia y California no se ha comprobado a pesar del aislamiento recurrente en plantas con síntomas (Dann *et al.* 2012, Parkinson *et al.* 2017, Vitale *et al.* 2012), pero esto no elimina el potencial patogénico del hongo para presentar potencial patogénesis en raíces de aguacate en asociación con patógenos más agresivos como *Phytophthora cinnamomi* (Parkinson 2017). En un estudio filogenético realizado por Lawrence *et al.* (2019) utilizaron oligos ITS (Internal transcriber spacer, por sus siglas en inglés) en combinación con  $\beta$  tubulina (TUB2) más factor de elongación (TEF1) y revelaron nuevas asociaciones putativas del grupo “Cylindro” en California, Estados Unidos lo cual potencializa amenazas emergentes por parte de este grupo de fitopatógenos.

#### **3.2.1.3 *Phytophthora cinnamomi* Rands**

Es uno de los fitopatógenos más importantes a nivel mundial que causa pudrición de raíz y/o cancro de tallo en cerca de cinco mil especies vegetales, incluidas muchas de importancia agrícola, silvícola y hortícola. Además, es causante de desastrosas consecuencias en los ecosistemas naturales y en su biodiversidad (Hardham y Blackman 2018). Por ello, es

catalogado entre los 10 oomycetes más importantes a nivel global, debido a sus características de supervivencia, propagación y diseminación (Kamoun *et al.* 2015).

De acuerdo al estudio de distribución de *Phytophthora cinnamomi* realizado por Burgess *et al.* (2016), la combinación de huéspedes susceptibles, suelos propicios y clima ideal han favorecido la expresión del patógeno y potencializado su incidencia en zonas específicas de diversos continentes. *Phytophthora cinnamomi* pertenece al reino Stramenopila, phylum Oomycota, clase Peronosporimycetes, orden Peronosporales y familia Peronosporaceae. Se caracteriza por producir zoosporas biflageladas que propician alta diseminación, sus hifas son cenocíticas, puede reproducirse sexualmente y formar un talo diploide mediante meiosis a través del desarrollo de gametangios; el contacto gametangial produce una oospora sexual de paredes gruesas. Desde el punto de vista químico, las paredes se constituyen de glucanos, pequeñas cantidades de hidroxiprolina y de celulosa (Agrios 2005). El manejo del patógeno requiere comprensión integral del organismo (Hardham y Blackman 2018), Sánchez-González *et al.* (2019) propusieron el uso de genotipos vegetales resistentes, mientras que el Centro de Ciencia y Manejo de *Phytophthora* (CPSM) recomendó el uso de fosfitos (formas aniónicas del ácido fosfónico (HPO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) para la inducción de resistencia. Por otro lado, Lu *et al.* (2019) evidenciaron el efecto de nanopartículas de sílice con ácido salicílico para la restricción de lesiones y estimulación en el crecimiento de raíces de piña, *Ananas comosus*.

### 3.3 Control de enfermedades en plantas

Las enfermedades merman un alto porcentaje de la producción de cultivos alrededor del mundo. Por ello, es necesario conocer y aplicar manejo integrado (MIP), mismo que implica el uso de diferentes métodos como los controles químico, legal, cultural, mecánico, además de resistencia genética y el control biológico. En éstos intervienen el uso de moléculas pesticidas, la regulación fitosanitaria, el uso de organismos transgénicos, nuevas variedades y el uso de organismos o de sus compuestos activos capaces de inhibir el efecto de fitopatógenos (Agrios 2005; Khan *et al.* 2020; Ul *et al.* 2020).

El control biológico consiste en el uso de (micro-) organismos benéficos para la supresión de poblaciones de patógenos. En algunos casos, el uso de los metabolitos secretados por dichos organismos entran en esta categoría según las disposiciones legales aplicables al país

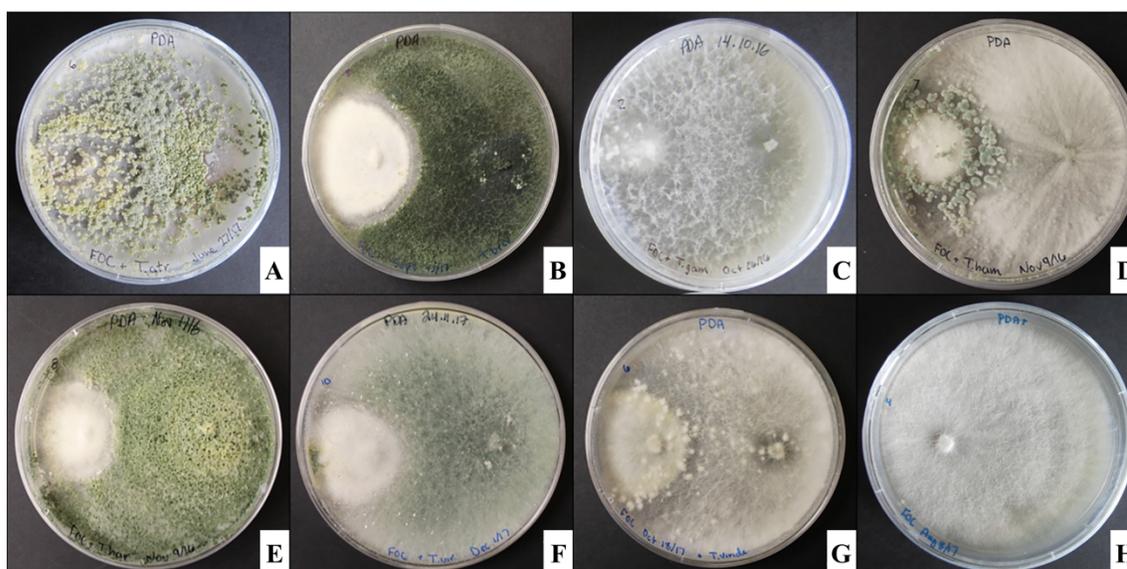
en cuestión, es el caso de Estados Unidos (EEUU), cuya normativa cataloga a los metabolitos dentro del control químico (Köhl *et al.* 2019). Es importante resaltar que los mecanismos de control dependerán de las interacciones que se establecen entre el antagonista y el patógeno, modificándose en función de la variación en densidad y relaciones específicas (Tilocca *et al.* 2020). Se han estudiado organismos capaces de detener el crecimiento y ataque de agentes patógenos al ejercer diversos mecanismos antagónicos (Sánchez *et al.* 2013). Un ejemplo de esto, son los trabajos realizados por Chowdhary y Kaushik (2005) quienes reportaron a *Macrophomina phaseolina* aislado de *Ocimum sanctum*, que mostró actividad inhibitoria en contra de *Sclerotinia sclerotiorum*. Para fines de esta revisión se enfocará en los mecanismos generados por microorganismos para controlar el desarrollo de patógenos.

### **3.3.1.1 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas**

Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico permiten la selección de cepas eficientes que controlen el efecto de los agentes fitopatógenos. La antibiosis, el micoparasitismo, la fungistasis, la competencia por espacio o nutrientes y la inducción de resistencia, están involucrados en el control de enfermedades en plantas (Bunbury-Blachette y Walker 2019; Contreras-Cornejo *et al.* 2016; de-Bashan *et al.* 2007; Garbeva *et al.* 2011; Kubicek *et al.* 2011; Tilocca *et al.* 2020; Vadamalai *et al.* 2020).

El antagonismo es la capacidad de un organismo de inhibir el desarrollo de otro donde se establece por lo menos un mecanismo de acción y resulta del uso de uno o de la combinación de varios microorganismos determinantes para ejercer control, el cual se subdivide en directo e indirecto de acuerdo al contacto entre organismos. El antagonismo directo está mediado por la alta afinidad entre los organismos fitopatógenos y antagónicos, expresándose en mecanismos como el micoparasitismo (hiperparasitismo) o la predación, cuyos efectos en la supresión están influenciados por el contacto físico entre ambos organismos y en el cual se exhibe beneficio exclusivamente hacia el antagonista (Tilocca *et al.* 2020). “El micoparasitismo, un estilo de vida en el que un hongo es parásito de otro hongo, tiene especial relevancia cuando la presa es un patógeno vegetal” (Kubicek *et al.* 2011), como lo demostraron Bunbury-Blachette y Walker (2019) en sus ensayos *in vitro* (Figura 1) y los resultados positivos obtenidos en invernadero

con la utilización de cuatro especies de *Trichoderma* que redujeron los síntomas de pudrición de cebolla ocasionados por *F. oxysporum*.



**Figura 1.** Bioensayos de cocultivo entre *Fusarium oxysporum* y especies de *Trichoderma*. *Trichoderma atroviridae* (A); *T. brevicompactum* (B); *T. gamsii* (C); *T. hamatum* (D); *T. harzianum* (E); *T. koningiopsis* (F); *T. viride* y *F. oxysporum* (H), (Bunbury-Blanchette y Walker 2019).

Por su parte, el antagonismo indirecto se caracteriza por la ausencia de contacto entre organismos. Principalmente, el efecto supresor se origina por la intervención de compuestos o metabolitos con efecto antimicrobiano o promotor. Como ejemplos se mencionan la competición por nutrientes o espacio y la inducción de resistencia (Tilocca *et al.* 2020).

El control biológico de fitopatógenos se asocia en gran medida a la producción de compuestos que generan mecanismos de antibiosis que involucran la secreción de enzimas, metabolitos y toxinas que actúan en cantidades mínimas (Bashan *et al.* 1996; de-Bashan *et al.* 2007). En el caso de *Trichoderma* spp., se ha encontrado que la antibiosis principalmene esta influenciada por la capacidad para secretar sustancias con actividad antibiótica como las gliotoxinas, compuestos orgánicos volátiles de naturaleza mono y sesquiterpénica o enzimas hidrolíticas (Contreras-Cornejo *et al.* 2016).

Otro mecanismo es la fungistasis, misma que se plantea como la inactivación de un organismo debido a condiciones desfavorables. Un ejemplo es la inhibición de la germinación de esporas o del crecimiento de las hifas (Figura 2), o bien, cuando los propágulos microbianos

viables, que no están sujetos a latencia endógena o constitutiva, no germinan en el suelo en condiciones favorables de temperatura y humedad (Garbeva *et al.* 2011).



**Figura 2.** Ilustración de fungistasis. La germinación de esporas de hongos y la extensión de hifas a partir de una fuente de nutrientes proceden mejor en ambientes artificiales libres de nutrientes en comparativa al crecimiento en suelo, (Garbeva *et al.* 2011).

Por otro lado, existen mecanismos presentes en nichos con limitación nutrimental. Tal es el caso de la competencia por espacio. En algunos casos, la competencia entre microorganismos presenta ventajas hacia algunos microbios debido a la capacidad de estos para producir compuestos particulares. Un ejemplo es la producción de sideróforos, que generan la quelación del Fe, lo cual resulta en inanición del microorganismo que tiene limitación para adquirirlo (Contreras-Cornejo *et al.* 2016).

Las rizobacterias y los hongos participan en la activación del mecanismo de defensa de las plantas contra especies patógenas conocida como resistencia sistémica inducida (o ISR, por sus siglas en inglés). Ésta es la capacidad mejorada de defensa en plantas cuya función implica la disminución de la expresión de síntomas aunque exista proliferación del patógeno en éstas. La ISR es elicitada principalmente por bacterias promotoras del crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés) a través de la ruta del ácido jasmónico y el etileno (ET). Sin embargo, en algunos géneros como *Serratia* o *Pseudomonas* interviene la ruta del ácido salicílico (AS). Es importante resaltar que la respuesta de ISR del hospedero está regulada por la interacción específica entre PGPR-hospedero y que ésta compatibilidad no siempre puede extrapolarse hacia otro hospedero (Vadamalai *et al.* 2020).

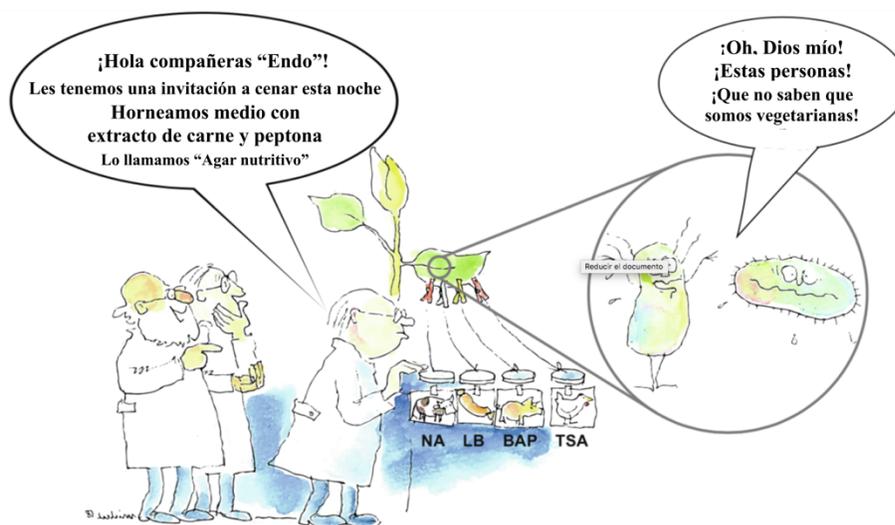
### **3.4 Microbioma en plantas como recurso potencial para la obtención de agentes de biocontrol**

El microbioma en plantas es el conjunto de microorganismos y su genoma asociados a la planta que pueden vivir, prosperar e interactuar dentro o fuera de raíces, tallos, hojas, flores o semillas. Además, tienen uso potencial en la promoción del crecimiento vegetal y el biocontrol de agentes fitopatógenos. Cabe destacar que la ingeniería del microbioma se presenta como una opción amigable con el ambiente coadyuvante en la resolución de problemas agrícolas (Orozco-Mosqueda *et al.* 2018). En un estudio realizado por Orlovic *et al.* (2020) se aislaron 68 taxas fúngicas y se compararon las asociaciones de estos sobre tres categorías de sanidad basadas en defoliación de la corona de *Fraxinus angustifolia* con síntomas de marchitez ceniza y de plantas visualmente sanas: se logró evidenciar que patógenos como *Fusarium solani* e *Hymenoscyphus fraxinus* estaban presentes en la categoría de sanidad con mayor porcentaje de defoliación, mientras que *Cladosporium cladosporioides* y *Talaromyces ohioensis* se habían aislado en mayor cantidad en la categoría de árboles con menos de 25 % de defoliación. De acuerdo a los autores, esta situación podría referir a que estos últimos se encuentran como endófitos y ejercen mecanismos de biocontrol referidos a la inducción de resistencia.

Se ha elucidado el papel de los microbiomas asociados a diversos nichos y comprobada la disponibilidad de microorganismos presentes en ellos con potenciales multifuncionalidades. Como ejemplo se describe lo realizado por Chevrette *et al.* (2019) quienes determinaron la asociación de especies de *Streptomyces* sobre insectos en muestreos que comprendieron la recolección de 2,561 insectos representados por 15 órdenes, con una totalidad de 10,178 aislamientos individuales que incluían a los órdenes Hymenoptera (2,934), Diptera (2,920), Lepidóptera (1,139) y Coleóptera (1,139), además de la obtención de aislamientos de otros microbiomas, incluidos suelo (833) y plantas (980). Un aspecto importante, relacionado con las cepas asociadas a insectos y plantas, fue que presentaron mayor bioactividad en comparación a las cepas de actinomicetos aislados de suelo. Dicha actividad, sugiere que estos microbiomas están mejor equipados para defenderse de grupos de patógenos específicos.

Es importante destacar que para la obtención de una amplia gama de microorganismos que habitan de forma nativa en entornos naturales y/o en las plantas, es requisito comprender las interacciones planta-microbiota y sus funciones en estos sistemas tan complejos. Además, se debe avanzar en los procedimientos de cultivo de la microbiota vegetal en función de los medios

de cultivo a base de plantas y selección en su competencia. Actualmente, está establecido que los medios de cultivo diseñados para el cultivo *in vitro* de microorganismos deben proporcionar condiciones ambientales y nutricionales que se asemejen lo más posible a sus hábitats naturales (Figura 3) (Sarhan *et al.* 2019).



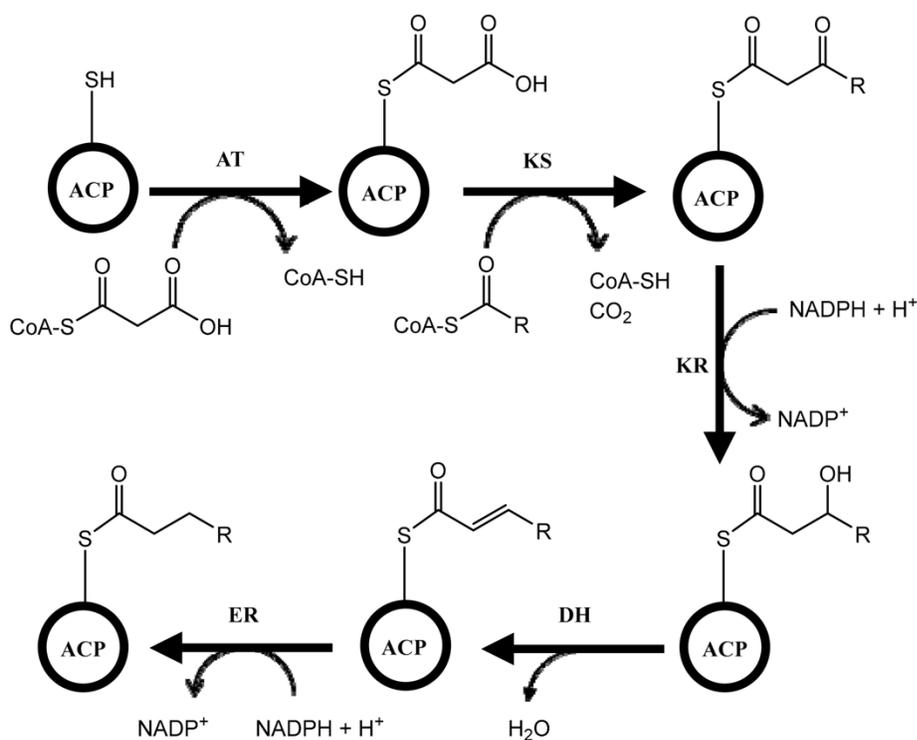
**Figura 3.** Caricatura que ironiza la necesidad de “Aplicar técnicas de cultivo a la medida de los microorganismos de las plantas” (Sarhan *et al.* 2019)

### 3.5 Metabolismo secundario

El metabolismo secundario, es un complejo de interacciones químicas (rutas metabólicas) mediado por diversas enzimas especializadas para la generación de moléculas que si bien, no desempeñan un papel en el desarrollo, crecimiento y reproducción microbiana, sí generan beneficios o ventajas a los organismos que los producen, como la regulación de crecimiento hacia otros microorganismos que benefician al organismo secretor o la supresión de organismos dañinos para estos. A estas moléculas se les ha denominado como metabolitos secundarios (Pyne *et al.* 2019). Para fines de esta revisión se hablará de manera general de las rutas metabólicas microbianas, particularmente de la ruta del acetato y malonato (o ruta policétida) que repercute en la síntesis de policétidos y ácidos grasos, además de la ruta que sintetiza péptidos no ribosomales.

### 3.5.1 Ruta policétida

La ruta policétida implica diversas reacciones químicas con intervención de la enzima aciltransferasa (AT), que cataliza la unión del sustrato (por ejemplo, acetilo o malonilo) a la proteína transportadora de acilo (ACP) y la cetosintasa (KS), que cataliza la condensación de sustratos adheridos en ACP. Después de la condensación de los sustratos, la reacción continúa incorporando la enzima ceto-reductasa (KR), que reduce al cetoéster, la deshidratasa (DH), que deshidrata el compuesto, y la enoil-reductasa (ER), que reduce el doble enlace carbono-carbono en la formación de molécula policétida (Figura 4). La catalización por KR, DH y ER es opcional en las PKS (policétido sintasas), lo cual puede generar diversas estructuras de policétidos con grupos ceto, hidroxilo y/o dobles enlaces en diferentes ubicaciones de la molécula. En la ruta biosintética pueden intervenir tres tipos de enzimas (I, II, III), algunos organismos, como plantas, utilizan únicamente una vía enzimática, mientras que otros, como es el caso de algunas actinobacterias (*Streptomyces*) actúan los tres tipos (Risidian *et al.* 2019).

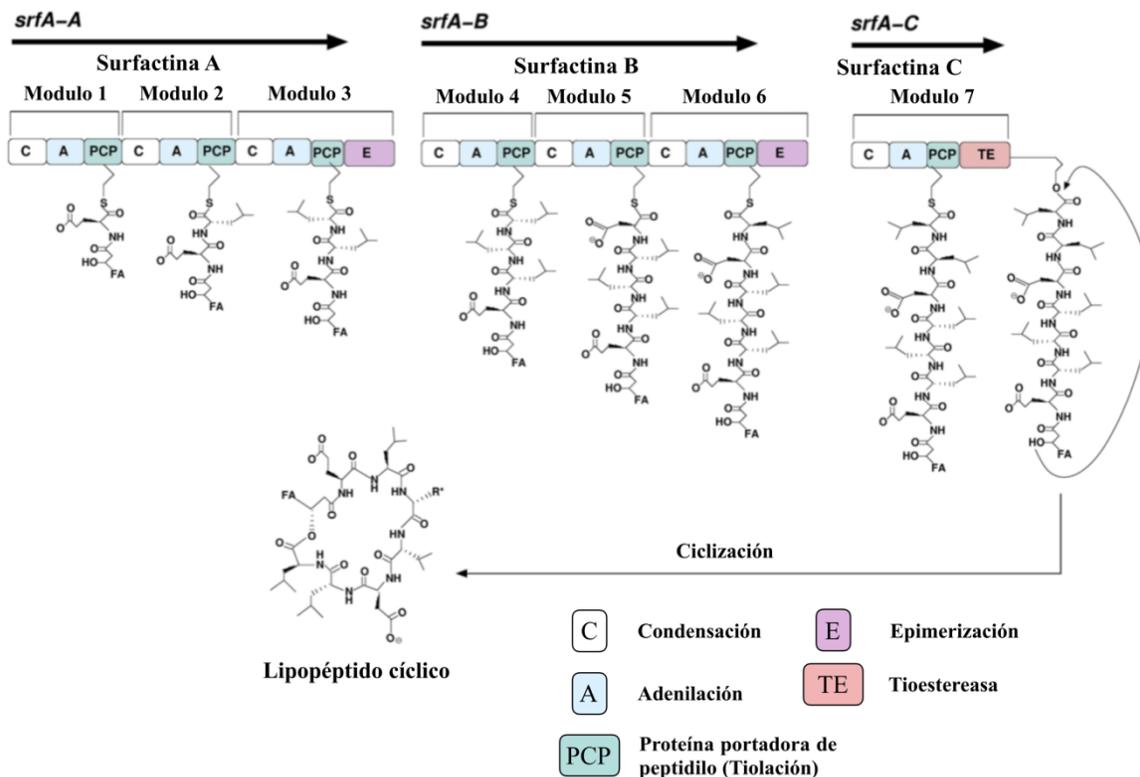


**Figura 4.** Ejemplificación de la ruta policétida en la que intervienen diversos procesos químicos y enzimáticos, el esquema presenta las reacciones que ocurren con las policétido sintasas (Risidian *et al.* 2019).

Las PKS del tipo I involucran la formación de policétidos macrocíclicos (macrólidos); las PKS II la formación de policétidos aromáticos, mientras que las PKS III utilizan el acil-CoA directamente, sin requerir del ACP como punto de anclaje para la producción de policétidos (Risidian *et al.* 2019).

### **3.5.2 Ruta de los péptidos no ribosomales**

Por otro lado, la biosíntesis de péptidos no ribosomales se realiza mediante péptido sintetetas no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés), complejos multienzimáticos, organizados modularmente que sirven como plantillas y maquinaria biosintética mediante un mecanismo independiente de los ribosomas. Un módulo se define como una sección de la NRPS específica que se incorpora a un aminoácido en la estructura del péptido y, a su vez, los módulos pueden dividirse en dominios, que catalizan los pasos individuales de la síntesis de péptidos no ribosomales. Cada módulo puede formarse mediante combinaciones de los tres dominios, es decir: dominio de adenilación (A), proteína portadora de peptidilo (PCP) o dominio de tiolación (T) y de condensación (C). El orden de los módulos suele ser colineal y la síntesis avanza en una dirección N- a C- terminal, lo cual resulta en péptidos de 3-15 aminoácidos que pueden ser lineales, cíclicos o cíclicos ramificados (Martínez-Nuñez y López. 2019) (Figura 5).



**Figura 5.** Formación de péptidos no ribosomales, se ejemplifica la síntesis de tres tipos de surfactinas la cuales derivan a un lipopéptido cíclico (Martínez-Nuñez y López 2019).

El dominio A consta de ~ 550 aminoácidos y tiene diez residuos de aminoácidos que pueden considerarse como los "codones" de las enzimas NRPS. Éstos son importantes para la especificidad del sustrato. Los sustratos reconocidos por el dominio A pueden incluir las formas D y L de los 20 aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas ribosomales, así como aminoácidos no proteínogénicos (e.g., ornitina, iminoácidos e hidroxiácidos como como ácidos  $\alpha$ -aminoadípico y  $\beta$ -butírico). La reacción del dominio A actúa en el paso inicial de la síntesis de proteínas impulsada por ribosomas, posteriormente, el dominio PCP (~ 80 aminoácidos) transfiere el sustrato activado y une el alargamiento intermedio con el dominio C. Finalmente, el dominio C (~ 450 aminoácidos) cataliza la formación de enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo del péptido naciente y el aminoácido transportado por el módulo flanqueante, lo que permite la translocación de la cadena en crecimiento al siguiente módulo. Después de la condensación, el péptido intermedio lineal se libera con la ayuda del dominio tioesterasa (TE)

por hidrólisis o ciclación interna (sobre todo en bacterias), el cual es poco frecuente en NRPS de hongos (Martínez-Nuñez y López. 2019; Miller y Gulick 2016).

El metabolismo secundario microbiano ha generado interés en los investigadores debido a que las moléculas derivadas presentan esqueletos químicos únicos y propiedades bioactivas diversificadas (Kumar 2018).

### **3.6 Metabolitos secundarios microbianos**

En la actualidad, diversos compuestos químicos son utilizados para controlar plagas y enfermedades en plantas. Éstos son potencialmente peligrosos para animales y humanos y pueden acumularse en los ecosistemas naturales; además, su uso indiscriminado ha favorecido la disminución en la efectividad biológica así como el incremento en la resistencia en los agentes patológicos. De esta manera, es deseable reemplazar dichos compuestos con sistemas biológicos más “amigables” al ambiente y hacia la salud (Bashan *et al.* 1996; de-Bashan *et al.* 2007). Lo anterior ha generado interés para la formulación de biopesticidas con la utilización de microorganismos o de sus metabolitos secundarios (Jha 2019).

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario y su distinción esta basada de acuerdo a su función y distribución en la naturaleza. La definición clásica los cataloga como compuestos que no son esenciales para el crecimiento o supervivencia de los organismos que los secretan. Contrario a ello, la función esencial de los metabolitos secundarios es contextual, al ser indispensables para la supervivencia de los organismos en la naturaleza (Bills y Gloer 2019).

Estos compuestos pueden ser sintetizados por plantas, sin embargo, la necesidad de nuevas moléculas ha desencadenado la búsqueda en otros nichos; tal es el caso del bioma microbiano. Dicho interés ha sido generado en gran medida debido a la bioprospección de los microorganismos para secretar metabolitos con modalidades bioactivas únicas (e.g., actividad antimicrobiana, antioxidante e inmunosupresiva) y a la variabilidad que presentan (e.g., quinolonas, flavonoides, esteroides, fenoles, xantonas y terpenoides) (Jha 2019; Keswani *et al.* 2020; Pan *et al.* 2019).

Algunos autores refieren a que el suelo es un recurso fundamental para el aislamiento de microorganismos con capacidad de secretar metabolitos secundarios bioactivos (Kumar 2018), sin embargo, esta situación ha favorecido al redescubrimiento de microorganismos y de sus metabolitos. Por ello, estudios recientes refieren a que nichos ajenos al suelo como son los insectos o las plantas, que representa una fuente prolífica de metabolitos. Un claro ejemplo fue el aislamiento de la cyfomicina, molécula antifúngica, obtenida de una cepa de *Streptomyces* asociada al microbioma de la hormiga *Cyphomyrmex* sp. (Chevrette *et al.* 2019)

En la actualidad, el potencial génico para la secreción de metabolitos secundarios microbianos puede ser elucidado con los estudios metabolómicos. Esta situación ha atraído a diversos investigadores a nivel global (Keller 2019). Como en el trabajo de Chevrette *et al.* (2019) que determinaron el potencial genómico de *Streptomyces* spp. para producir nuevos productos naturales a partir del estudio filogenético del genoma central de 120 cepas, lo cual mostró la separación por millones de años de linajes asociados a insectos de los linajes obtenidos de suelo. Lo anterior sugirió que estos últimos ocupaban un espacio evolutivo para la biosíntesis de nuevos productos naturales.

Wicaksono *et al.* (2018) determinaron la presencia de genes codificantes para antibióticos como fenazina y cianidas nitrogenadas en bacterias endófitas de *Leptospermum scoparium*. Además, mostraron capacidad en la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* pv. actinidiae. y reducción en la severidad de la enfermedad en *Actinidia chinensis* provocada por el patógeno.

Los hongos, particularmente los endófitos de plantas, producen metabolitos bioactivos con diversas características estructurales debido al entorno ecológico en el que se desarrollan (Liu y Liu 2018). *Trichoderma* es uno de los géneros más estudiados a nivel global. los metabolitos secretados incluyen sesquiterpenoides (trichodermina), pironas, compuestos fenólicos, octacétidos, compuestos orgánicos volátiles, metabolitos derivados de los polipéptidos lineales (e.g., peptaibol), que han demostrado su eficacia sobre bacterias Gram positivas y hongos fitopatógenos, e inclusive la capacidad de inducir respuestas de resistencia en plantas (Mathivanan *et al.* 2008).

El hongo endofítico *Pestalotiopsis fici* aislado de *Camellia sinensis* produce 88 metabolitos secundarios. Al combinar 74 grupos de metabolitos secundarios revelados por el

análisis de secuenciación del genoma, se ha elucidado su potencial para utilizarse como modelo para el análisis técnicas de extracción (Liu y Liu 2018).

Por otro lado, Yaish (2017) evidenció la capacidad de la bacteria endófitra *Bacillus aryabhatai* (SQU-R12) en la promoción del crecimiento de plántulas de *Phoenix dactylifera* debido a la síntesis de ácido indol-3-acético.

La biosíntesis de metabolitos secundarios a menudo depende de diversos factores que no están presentes en el laboratorio, como las señales ambientales, por lo que los metabolitos de ciertos entornos pueden no producirse en condiciones *in vitro* (Chevrette *et al.* 2019).

Lo anterior demuestra el potencial bioactivo de los metabolitos secundarios presentes en microorganismos, debido al papel fundamental en las interacciones ecológicas, intervienen en mecanismos de protección (antibióticos), biorremediación, promoción de crecimiento o de comunicación (e.g., feromonas en insectos) (Kramer *et al.* 2020; Risdian *et al.* 2019).

Dichas sustancias se han clasificado de acuerdo a su estructura química y vías biosintéticas. Los metabolitos secundarios se dividen principalmente en cuatro grupos, que incluyen policétidos, péptidos no ribosomales, alcaloides y terpenoides (Memariani *et al.* 2020; Rajendran y Marahiel 1999; Risdian *et al.* 2019). Las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios son las PKS que biosintetizan policétidos a partir de Acyl-CoAs, las NRPS que utilizan como sustratos a los amino ácidos y derivan en péptidos no ribosomales o las terpeno sintasas y terpeno ciclasas (TS y TC) que generan terpenos a partir de unidades de isopreno (Keller 2019).

### **3.6.1 Policétidos**

Los policétidos son metabolitos secundarios que varían en estructura y funcionalidad. Pueden derivar de animales, plantas, hongos y bacterias; sus funciones son variables y abarcan desde la actividad antibiótica (e.g., eritromicina), pasando por actividad antitumoral (e.g., antraciclina, epotilona), antifúngica (e.g., griseofulvina) hasta los utilizados contra parásitos (e.g., avermectina). Como ya se mencionó, los policétidos son sintetizados por PKS mediante la condensación de moléculas de acil-CoA y de malonil-CoA y se clasifican en: péptidos multifuncionales iterativos y modulares (tipo I), encontrados en bacterias y hongos; proteínas

monofuncionales (tipo II), producidos en bacterias y de tipo III, principalmente encontrados en plantas (Nivina *et al.* 2019; Wang *et al.* 2020).

Kallscheuer *et al.* (2019) demostraron el potencial de *Corynebacterium glutamicum* para ser utilizado como huésped heterólogo para la producción de ácido 6-metilsalicílico derivado de PKS tipo I. Con la utilización de la sintetasa ChlB1 de *Streptomyces antibioticus*, demostraron que la ChlB1Sa podía ser activada en ausencia de una PPTasa heteróloga. Esta situación marcó la pauta para discernir en la presencia de una PPTasa endógena (PptACg) en *C. glutamicum*, lo cual garantizó niveles elevados de acetyl-CoA y malonil-CoA, lo que garantizó la acumulación de ácido 6-metilsalicílico en cantidades elevadas (41 mg/L) a las 48 h de cultivo.

El phylum Actinobacteria es uno de los grupos bacterianos que se reporta con mayor potencial para la producción de antibióticos. Particularmente el género *Streptomyces* se ha catalogado con capacidad para sintetizar policétidos con la utilización de los tres tipos de maquinaria enzimática, la síntesis de macrólidos (e.g., rapamicina, avermectina) mediada por las sintetisas de tipo I, mientras que las de tipo II intervienen en la producción de policétidos aromáticos (e.g., tetraciclinas) y finalmente las de tipo III, en el cual el ciclo es más simple debido a que la utilización del acyl-CoA es directa (e.g., gemicidina) (Risidian *et al.* 2019).

### 3.6.2 Péptidos no ribosomales

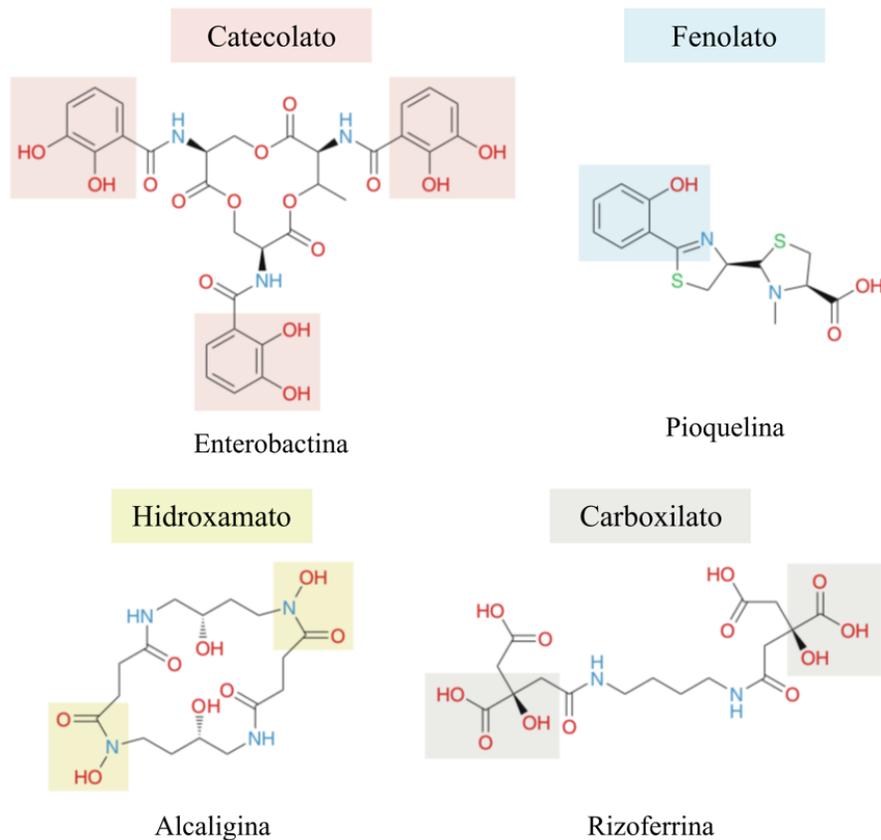
Son péptidos sintetizados por enzimas péptido sintetisas no ribosomales (NRPS) a partir de aminoácidos residuales. Estos metabolitos se caracterizan por ser sintetizados sin la utilización de maquinaria ribosomal y de RNA mensajero. Generalmente son secretados por bacterias y hongos, y representan un amplio rango de bioactividades. Por ejemplo, mientras algunos muestran actividad antibiótica como la actinomicina, penicilina o cefalosporina, otros se caracterizan por ser pigmentos, como la indigodina, o fitotoxinas (Soltani 2016). Algunos de los péptidos mayormente caracterizados son la surfactina, derivado de *Bacillus subtilis* y la enterobactina, sideróforo de tipo catecol, sintetizada por *Escherichia coli* (Rajendran y Marahiel 1999).

Zhao *et al.* (2019) recopilaron información sobre 186 hongos capaces de secretar diversos ciclopéptidos con actividad antibiótica, enfocándose en el grupo de las 2-5 dicetopiperazinas, que son compuestos obtenidos de la condensación de por lo menos dos aminoácidos. La conformación de su estructura básica está conformada por un núcleo de

piperazina de seis miembros, clasificándose como: tiodicetopiperazinas, con presencia de grupos S-metilo y/o puentes polisulfuros transanulares (e.g. epipolítiodioxopiperazinas) y dicetopiperazinas sin azufre, mediante la biosíntesis de NRPS, con reportes de seis dicetopiperazinas denominadas albonoursina, mycociclosina, ácido pulcherriminico, bicyclomycina, drimentinas y nocazina XR334 y E.

### 3.6.2.1 Sideróforos

Los sideróforos (del griego *sideros phoros*, que significa “portadores de hierro”) son metabolitos secundarios generalmente de naturaleza peptídica, secretados por bacterias (Figura 6), hongos (Figura 7), levaduras y plantas. En microorganismos, son sintetizados por NRPS o PK, presentan bajo peso molecular (0.5-1.0 kDa) y tienen la capacidad de quelación de ciertos iones de hierro. En el caso del ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) favorece su absorción en condiciones de déficit o en otros, donde los micronutrientes como el níquel representan un riesgo, se establece una situación de bloqueo (Dimkpa *et al.* 2008). Además, en sistemas de competencia, los sideróforos pueden ser absorbidos por los organismos que los secretan debido a la presencia de receptores específicos o por organismos no productores cuando se establecen mecanismos de cooperación. Cabe destacar que estos metabolitos son fundamentales en procesos celulares y en la protección hacia especies reactivas de oxígeno (Kramer *et al.* 2020). En la década de 1980-1990 se mostró su rol en el control biológico gracias al estudio de compuestos fluorescentes (e.g., pioverdinas y pseudobactinas) secretados por *Pseudomonas* (Loper y Buyer 1991). Las interacciones entre los fitopatógenos y microorganismos asociados a las raíces se rigen en gran medida por la disponibilidad nutrimental, como es el caso del Fe. Gu *et al.* (2020) sugieren que una guía para el diseño de consorcios microbianos biocontroladores es la selección de organismos productores de sideróforos debido a las interacciones metabólicas específicas que en la mayoría de casos benefician únicamente a los miembros del consorcio, por lo cual es

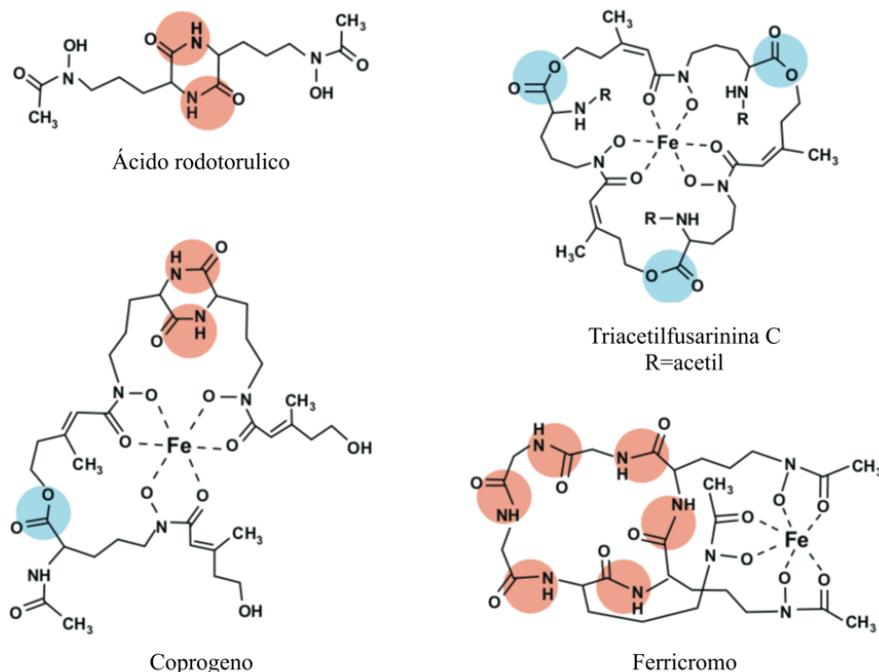


**Figura 6.** Principales grupos químicos de sideróforos. Ejemplos representativos de sideróforos secretados por bacterias: la enterobactina (producida por *Escherichia coli*); pioquelina (*Pseudomonas aeruginosa*), que incluye la tiazolina, un anillo de heterociclo; alcaligina (*Bordetella pertussis*) y rizoferrina (*Ralstonia pickettii*) (Kramer *et al.* 2020).

necesario comprender a profundidad las interacciones ecológicas y las subyacentes entre el patógeno y el agente de biocontrol.

Los sideróforos pueden alterar la ecología microbiana, al promover o limitar el crecimiento de los miembros de la comunidad (Saha *et al.* 2016). Sus aplicaciones son variadas, ya que pueden utilizarse desde la biorremediación de suelos, al destoxificar de metales pesados o como biosensores. Además, algunas bacterias tienen la capacidad de combinar sus sideróforos con antibióticos y utilizar la “estrategia troyana”, que consiste en la encapsulación del antibiótico por el sideróforo, permitiéndole entrar a través de los receptores de la bacteria resistente.

Asimismo, intervienen en la reducción de la disponibilidad nutrimental de Fe, lo cual facilita la supresión de los fitopatógenos (Saha *et al.* 2016).



**Figura 7.** Ejemplos representativos de sideróforos (hidroxamatos) secretados por hongos: Ácido rodotorulico (*Rhodotorula*, Basidiomycota); Triacetilfusarinina (*Aspergillus fumigatus*, Ascomycota); Coprogeno (*Cochliobolus heterostrophus*, Ascomycota) y ferricromo (*Schizosaccharomyces pombe*, Ascomycota; *Ustilago maydis*, Basidiomycota) (Haas *et al.* 2008).

### 3.6.3 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos biológicamente activos, de naturaleza orgánica, que contienen átomos de nitrógeno y cuya estructura es altamente variable (Memariani *et al.* 2020). Algunos alcaloides del tipo ergot son micotoxinas derivadas del triptofano, producidos por diversos hongos del género *Claviceps* y *Aspergillus*, con bioactividad que incluye efectos alucinógeno e insecticida (Panaccione 2005). Lozano *et al.* (2019) mostraron que una molécula alcaloide análoga de plantas denominada korenceina, una tetrahidropiridona antibiótica, secretada por *Pseudomonas korensis* modificaba la composición de la comunidad rizosférica bacteriana en el cultivo de soya debido a la competición con *Flavobacterium johnsoniae*. Cabe mencionar, que la síntesis microbiana mediada por la ingeniería metabólica microbiana surge debido a la

necesidad de la obtención de moléculas en tiempos reducidos y de la posibilidad de escalar el proceso a nivel industrial, lo cual resulta en una gran ventaja en comparativa a la producción por plantas (Bradley *et al.* 2020)

#### **3.6.4 Terpenoides**

Los terpenoides comprenden más de 80,000 compuestos cuya clasificación esta basada en la cantidad de unidades de isopreno (Memariani *et al.* 2020). Éstos exhiben funciones importantes en las áreas biotecnológica y agrícola debido a sus propiedades, incluidas diversas bioactividades contra patógenos. Hilgers *et al.* (2021) utilizaron como huésped heterólogo a *Rhodobacter capsulatus* para la producción de  $\beta$ -cariofileno, un compuesto sesquiterpeno y su derivado oxigenado, que mostraron actividad inhibitoria sobre *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum*. Por otro lado, Bitas *et al.* (2015) mostraron el efecto de los sesquiterpenos y diterpenos en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y evidenciaron que este variaba en función de la cantidad y la variación de los compuestos emitidos por las cepas *F. oxysporum*. El papel de los VOC en las interacciones biológicas y su potencial para ser usados en el ámbito práctico es variable, como en el caso de la molécula denominada 10-epi- $\beta$ -acoradieno que mostró potencial como biomarcador para la identificación de granos contaminados con toxinas de *F. graminearum* (Girotti *et al.* 2010).

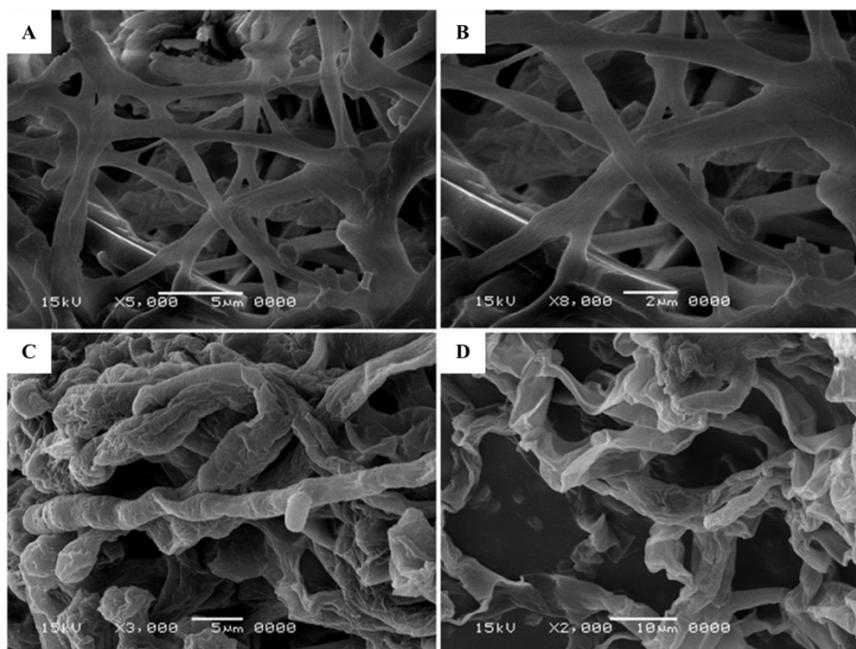
#### **3.6.5 Compuestos orgánicos volátiles**

Los compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm) generalmente presentan bajo peso molecular (300 Da) e incluyen diversos grupos químicos (Tilocca *et al.* 2020). La mayoría de VOCm con características agradables para los humanos se encuentran en cervezas, vinos o alimentos fermentados y se asocian a las levaduras, mientras que otros, de carácter negativo, a los aromas de edificios afectados por la humedad o sitios en decaimiento. En particular, los VOCm emitidos por hongos se pueden encontrar en infinidad de sitios, o ser producto de diversas interacciones. Un ejemplo es la geosmina, secretada por cianobacterias en asociación con hongos o el 1-octen-3-ol conocido como “alcohol de hongos” que deriva del rompimiento del ácido linoléico. Además, algunos VOCm se asocian a aromas característicos; tal es el caso

del 4-(4-hidroxifenil)-butan-2-ona secretado por *Niduralia* sp., con particular aroma a frambuesa, o el 6-pentil- $\alpha$ -pirona emitido por *Trichoderma* sp., con aroma a coco.

El interés en el estudio de los VOCm se ha acrecentado en años recientes debido a la influencia de dichos compuestos en las interacciones antagónicas microbianas como la ocasionada por los VOCm de *Muscodor albus* cuyos efectos toxigénicos son provocados por disrupción de la membrana celular y daño al DNA (Hutchings *et al.* 2017; Inamdar *et al.* 2020) o de beneficio promotor e inductor de resistencia en las plantas (Tilocca *et al.* 2020).

En ensayos realizados por Elsherbiny *et al.* (2020) se encontró un efecto positivo de los VOC de *Trichoderma atroviridae*, principalmente por la interacción al 3-metil-1-butanol y 2-pentil-1-propanol, sobre tubérculos de papa tratados con éstos, ya que se observó disminución de las lesiones de *Phytophthora infestans* conforme los tubérculos eran expuestos gradualmente a los volátiles. Además, demostraron que el crecimiento microscópico de *P. infestans* se afectaba negativamente, presentándose deformación hifal (Figuras 8C y 8D), mientras que las cepas no tratadas presentaron crecimiento normal, hifas delgadas, elongadas y homogéneas (Figuras 8A y 8B).



**Figura 8.** Micrografías mediante microscopía electrónica de barrido de *Phytophthora infestans* crecido en medio de cultivo V8 con presencia y ausencia de compuestos orgánicos volátiles (VOC) de *Trichoderma atroviridae*. Micelio sano (A y B); efecto de VOC en morfología de hifas (C y D), (Elsherbiny *et al.* 2020).

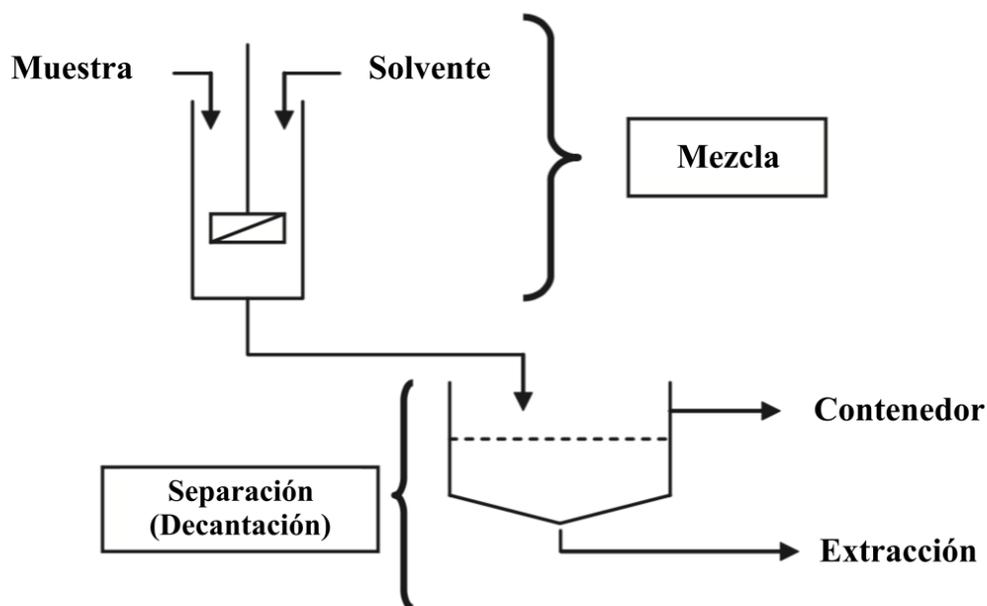
Es importante resaltar que diversos VOCm son resultantes de la ¿degradación? Macromolecular. Por ejemplo, de la biotransformación de aminoácidos, ácidos grasos o de productos enzimáticos derivados de sustratos exógenos por lo que la incorporación de los VOCm dentro de la clasificación de metabolitos secundarios resulta poco esclarecida debido a la falta de información que asocie a estos compuestos con sus respectivas rutas metabólicas y/o del conocimiento de sus complejos multienzimáticos (Inamdar *et al.* 2020).

### **3.7 Técnicas de extracción de metabolitos secundarios**

La extracción puede definirse como la transferencia de una sustancia (X) desde una fase (A) a otra fase (B), inmisible con la anterior. Dentro de las extracciones, se utilizan distintos métodos para la obtención de compuestos, los cuales pueden o no utilizar disolventes orgánicos; entre los métodos de extracción se encuentran los líquido-líquido, las columnas de extracción en fase sólida o la microextracción en fase sólida (SPME), cuya selección se determinará en función del tipo (difusible o volátil) y de la naturaleza química del compuesto en cuestión (Inamdar *et al.*, 2020; Liu y Liu 2019).

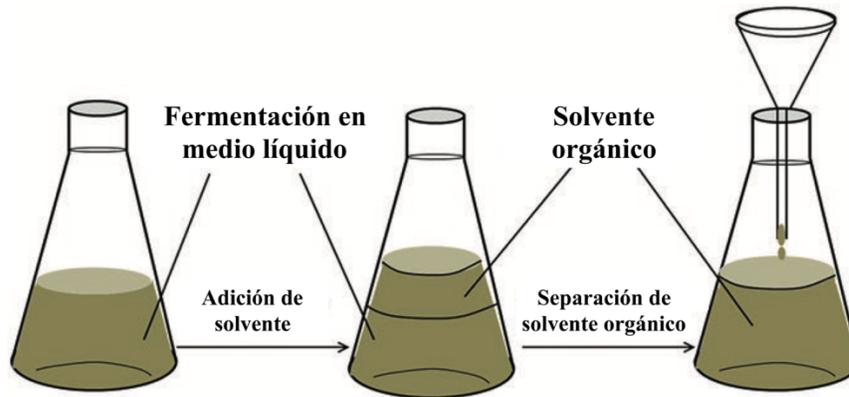
#### **3.7.1 Extracción líquido-líquido (LLE)**

Es un método para extraer un soluto de una solución en un solvente determinado (e.g., fase acuosa), por otro solvente (fase orgánica) los cuales son separados mediante decantación (Figura 9). La extracción líquido-líquido, también conocida como partición, es común en procesos comerciales. Se utiliza con frecuencia en las industrias química y minera, en la recuperación posterior de productos de fermentación (e.g., antibióticos, aminoácidos, esteroides), mientras que sus aplicaciones a la alimentación se restringen a casos aislados, como la transferencia de pigmentos carotenoides de disolventes orgánicos a aceites comestibles o la producción de aceite cítrico esencial "sin terpenos" mediante la extracción de compuestos oxigenados del aceite esencial con etanol acuoso (Berk 2018).



**Figura 9.** Esquema del proceso de extracción líquido-líquido para metabolitos secundarios (Berk 2018).

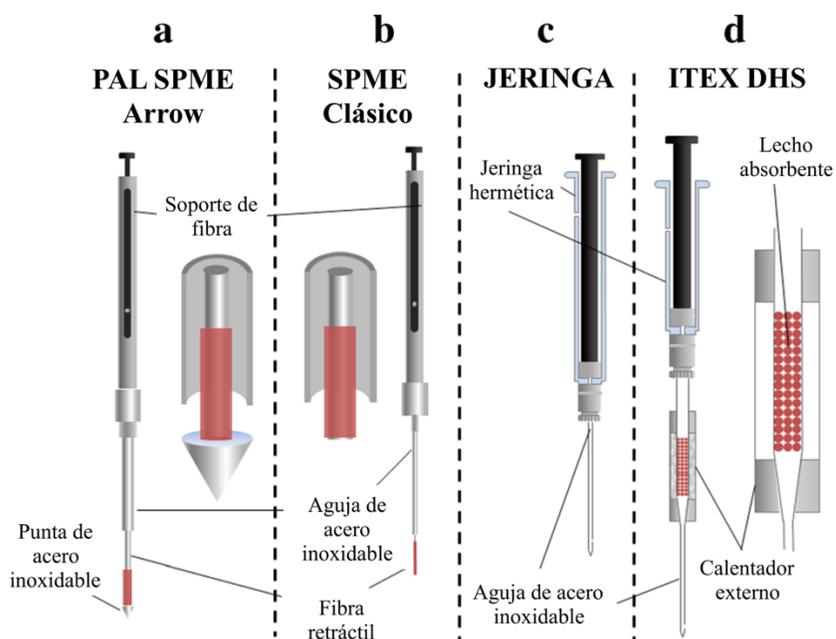
Existen distintos solventes orgánicos para realizar la extracción de compuestos, cuya variación en su utilización deriva en función de la polaridad del compuesto de interés. Un ejemplo es la utilización de disolventes hidrófilos para la extracción de grasas, en la cual la partición líquido-líquido entre el extracto y el disolvente apolar, como hexano, isooctano y ciclohexano, se ha utilizado eficazmente (Valle-Algarra *et al.* 2014). Por otro lado, el acetato de etilo, el diclorometano y sus mezclas se encuentran entre los disolventes de extracción preferidos en LLE para el aislamiento de herbicidas, especialmente a partir de muestras de agua y fluidos biológicos. (Vasilescu y Medvedovici 2005). Algunos autores han propuesto procesos para realizar la extracción a pequeña (Figura 10) y gran escala con acetato de etilo como solvente principal en la extracción de metabolitos de *Pestalotiopsis*, las cuales podrían adoptarse para otros hongos (Liu y Liu 2018).



**Figura 10.** Esquema del proceso de extracción líquido-líquido de metabolitos secundarios a partir de cultivo líquido de microorganismos (Liu y Liu 2018).

### 3.7.2 Microextracción en fase sólida (SPME)

La micro extracción de fase sólida o *Solid Phase Micro Extraction* (SPME) es una técnica simple, rápida y económica en la cual no se requiere la utilización de solventes orgánicos. Es ampliamente usada en el análisis de alimentos y de compuestos volátiles (VOCs), y consiste en la concentración de los VOCs en una fibra (Figuras 11A y 11B), que son transportados al propio inyector del cromatógrafo de gases donde se produce su desorción para identificarse subsiguientemente por su tiempo de retención y mediante espectrometría de masas. Otras formas de análisis incluyen la inyección al *headspace*, en el cual, los VOCs pueden ser recolectados e inyectados directamente con una jeringa térmica (Figura 11C) o bien, ser absorbidos con diversos biopolímeros y finalmente, extraídos por desorción térmica (Figura 11D) (Inamdar *et al.* 2020; Kremser *et al.* 2016).



**Figura 11.** Esquemas de las cuatro técnicas de análisis del headspace automatizadas para un muestreador de preparación de solución y carga (PAL, por sus siglas en inglés): PAL con microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) en forma de flecha (Arrow) (a); Fibra SPME clásica (b); Jeringa (c); Extracción en tubo (ITEX, por sus siglas en inglés) del espacio de cabeza dinámico (DHS, por sus siglas en inglés). Para las tres técnicas de enriquecimiento, las fases de extracción correspondientes están resaltadas en rojo (Kremser *et al.* 2016).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Considerar el estudio del microbioma de especies vegetales silvestres de *Rubus* como una fuente potencial de antagonistas nativos para su extrapolación en cultivos de zarzamoras comerciales favorecería la disminución del uso de agroquímicos y con ello, el deterioro ambiental, además de evitar la generación de resistencia de los fitopatógenos. Por lo anterior, resulta importante el estudio del microbioma en especies silvestres de *Rubus* presentes en la región, con el fin de coadyuvar en el manejo de enfermedades en zarzamoras.

#### V. HIPÓTESIS

Existen microorganismos en el microbioma de las zarzamoras silvestres (*Rubus* spp.) con potencial inhibitorio de hongos fitopatógenos.

#### VI. OBJETIVOS

##### 6.1 Objetivo general

- Aislar y evaluar el potencial antagónico de microorganismos aislados de zarzamoras silvestres (*Rubus* spp.) sobre *Phytophthora cinamomi*, *Cylindrocarpon liriodendri* y *Fusarium oxysporum*.

##### 6.2 Objetivos específicos

- Aislar microorganismos presentes en el tejido vegetal de zarzamoras silvestres (*Rubus* spp.).
- Determinar el potencial antagónico *in vitro* de los aislados microbianos sobre el crecimiento de agentes fitopatógenos.
- Evaluar el potencial inhibitorio de extractos microbianos obtenidos los aislados más prometedores sobre el crecimiento de agentes fitopatógenos.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 CAPITULO I. Microbiota de *Rubus* spp. silvestres: recurso potencial para el control de agentes fitopatógenos y la obtención de metabolitos secundarios

#### 7.1.1 RESUMEN

*Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Cylindrocarpon liriodendri* son agentes fitopatógenos devastadores en la agricultura a nivel mundial al afectar múltiples hospederos de importancia económica, agrícola y ecológica. El control químico de las enfermedades que causan es limitado en su eficacia debido a la resistencia que han adquirido los agentes fitopatógenos hacia este, por lo cual, la microbiota de diferentes nichos ecológicos así como distintas moléculas microbianas con actividad antagónica han recibido creciente atención como alternativa para el control de diversas enfermedades. En este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de la microbiota asociada a especies silvestres de *Rubus* sobre *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Cylindrocarpon liriodendri* y se determinó el efecto biocontrolador de extractos crudos microbianos y de los compuestos orgánicos volátiles (VOC). Además, se evaluó la secreción de sideróforos. Como resultado de un escrutinio de la microbiota asociada a *Rubus*, se obtuvieron 130 microorganismos. Entre éstos, *Penicillium manginii* (H8) y *Cladosporium* sp. (H14) se identificaron mediante PCR por amplificación de la región 5.8S del rARN, mientras que *Penicillium* sp. (H3) y actinobacterias (B27) fueron descritos morfológicamente, los cuales evidenciaron potencial inhibitorio sobre *P. cinnamomi*, *F. oxysporum* y *C. liriodendri*. En bioensayos de cocultivo indirectos, *Cladosporium* sp. y *P. manginii* inhibieron a *P. cinnamomi* un 95 % y 57 %, respectivamente. El extracto crudo de *P. manginii* con acetato de etilo redujo el 40 % del crecimiento de *P. cinnamomi* a una dosis de 2 mg por disco. Se sabe que los aislados microbianos también emiten VOCm que inhiben fitopatógenos y capacidad para secretar sideróforos. Este trabajo evidencia la capacidad de *P. manginii* y *Cladosporium* sp. como biocontroladores de estos fitopatógenos.

**Palabras clave:** Biocontrol, extractos crudos microbianos, compuestos orgánicos volátiles microbianos.

### 7.1.1.1 ABSTRACT

*Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocarpon liriodendri* are devastating plant pathogens in agriculture worldwide, affecting multiple hosts of economic, agricultural and ecological importance. The chemical control of the diseases they cause is limited in its efficacy. Therefore, the microbiota of different ecological niches as well as different microbial molecules with antagonistic activity have received increasing attention as an alternative for the control of various plant pathogens. In this work, the inhibitory activity of the microbiota of wild *Rubus* species against *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Cylindrocarpon liriodendri* was evaluated and the biocontrol effect of microbial crude extracts and volatile organic compounds (VOCs) was determined. In addition, the secretion of siderophores was evaluated. As the result of a scrutiny of the microbiota associated with *Rubus*, 130 microorganisms were obtained. Among these, *Penicillium manginii* (H8) and *Cladosporium* sp. (H14) were identified by amplification of the 5.8S region of the rRNA gene using PCR. Others, such as *Penicillium* sp. (H3) and actinobacteria (B27) were described morphologically. They all showed inhibitory potential on *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocarpon liriodendri*. In indirect coculture bioassays, *Cladosporium* sp. and *P. manginii* inhibited growth of *P. cinnamomi* by 95% and 57%, respectively. An ethyl acetate extract of *P. manginii* reduced the growth of *P. cinnamomi* by 40% at a dose of 2 mg per disk. The isolated microbes were also found to emit VOCm able to inhibit phytopathogens growth and had the ability to secrete siderophores. This work shows the biocontrol capacity of *P. manginii* and *Cladosporium* sp. against these phytopathogens.

**Key words:** Biocontrol, microbial crude extracts, microbial volatile organic compounds, .

### 7.1.2 INTRODUCCIÓN

*Phytophthora cinnamomi* es responsable de grandes pérdidas económicas en la agricultura, silvicultura y ecosistemas naturales de todo el mundo, al causar pudriciones de raíz y cancro en el tronco en diversas especies vegetales (Belisle *et al.* 2019; Hardham y Blackman 2018), lo que lo posiciona como el séptimo oomycete fitopatógeno de importancia científica y económica (Kamoun *et al.* 2015). Por su parte *Fusarium oxysporum*, que comprende más de 100 *formae speciales*, es detrimental en los sistemas agrícolas a causa de las pudriciones radiculares y taponamiento de haces vasculares que provocan colapso e inducen la muerte del hospedero (Gordon 2017; Koike y Gordon 2015; Pastrana *et al.* 2017; Ploetz 2015). En modo similar *Cylindrocarpon liriodendri*, hongo de suelo, causa la enfermedad destructiva de raíces conocida como “pie negro” que provoca pérdidas significativas en la producción. Además, limita el establecimiento y crecimiento de los cultivares (Dann *et al.* 2012; Erper *et al.* 2013; Probst *et al.* 2019). Por lo anterior, trabajos recientes que han elucidado el potencial de los microbiomas aislados de diversos nichos ecológicos refieren a la selectividad y eficacia de éstos sobre microorganismos patógenos dependiendo del hospedero, situación que abre un área de oportunidad extensa para la obtención de microbiota nativa con potencial antimicrobiano (Chevrette *et al.* 2019). Diversos microorganismos, incluidos bacterias, hongos y actinomicetos, producen moléculas con capacidad antibiótica (Dhanasekaran *et al.* 2016). Un ejemplo clásico es la valinomicina, un ciclodepsipéptido producido por *Streptomyces*, que disminuyó el crecimiento de *P. cinnamomi* a una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de 16 µg/ml. Se encontró que el efecto observado por el compuesto se debía a la inhibición del ionóforo de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa de la membrana interna mitocondrial, lo que aumentaba la permeabilidad al potasio (Zhang *et al.* 2015).

El Fe es un microelemento esencial en todos los organismos. Su déficit interfiere negativamente en los procesos microbianos. Por ello, sideróforos como la ferricrocina son esenciales en el transporte trans e intercelular de este elemento (Wallner *et al.* 2009). Existen diversidad de microorganismos, como hongos, bacterias o actinomicetos, con capacidad de secretar metabolitos secundarios con múltiples funcionalidades. Entre éstos se encuentran algunos que tienen la facultad de producir sideróforos en condiciones de déficit de Fe en el medio que se desarrollan, ya sea por ausencia del elemento o por el exceso de este (que causa el bloqueo de

su disponibilidad); en algunos casos, los sideróforos intracelulares, como la ferricrocina, son esenciales en la esporulación (Winkelmann 2007). De modo que los sideróforos son moléculas orgánicas producidas por microorganismos en condiciones limitantes de Fe. En la agricultura, algunos sideróforos tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas o en la inhibición de fitopatógenos. A su vez, otros pueden ser utilizados en procesos de biorremediación, e inclusive, estos compuestos pueden intervenir en la denominada “estrategia troyana” relacionada con la formación de complejos con antibióticos para el manejo de bacterias resistentes (Saha *et al.* 2015).

Una parte fundamental del estudio de los VOCm son las interacciones específicas que se establecen entre miembros de una comunidad microbiana y/o con sus hospederos. Dichas señalizaciones forman parte en la regulación de las relaciones sinérgicas (Contreras-Cornejo *et al.* 2016). Diversos microorganismos que habitan el suelo emiten VOC que generan cambios en el crecimiento y vitalidad de las plantas. Asimismo, las mezclas de VOC específicos tienen un rol clave en la respuesta de inducción de las plantas hacia estrés biótico o abiótico, mientras que otros tienen la capacidad de modulación de la bioactividad microbiana; por ejemplo, en la formación de biopelículas o la secreción de antibióticos (Raza *et al.* 2020)

Los microorganismos ejercen diferentes mecanismos antagónicos al interactuar entre sí. Por ello es necesario comprender el papel de éstos en su entorno para establecer su uso potencial en el control de enfermedades de plantas (Lawrence *et al.* 2017). La utilización de recursos microbianos y de sus productos naturales son una forma alternativa de control biológico al ser una fuente prolífica para el desarrollo de moléculas bioactivas con aplicaciones en diversos campos, incluida la agricultura (Pham *et al.* 2019).

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar el potencial antimicrobiano de la microbiota aislada de *Rubus* spp. silvestres y el efecto *in vitro* de extractos crudos microbianos sobre el crecimiento de agentes fitopatógenos de importancia económica.

### 7.1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 7.1.3.1 Aislamiento y selección de aislados con potencial inhibitorio

Muestras de ecotipos de zarzamoras silvestres (*Rubus* spp.) libres de síntomas y daño físico, se colectaron en el “Cerro de La Cruz” en Uruapan, Michoacán, México. Las muestras de tejido (hojas, tallos y raíces) se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético y llevaron al laboratorio para su procesamiento. Bajo condiciones asépticas, los tejidos vegetales se cortaron en trozos; luego, se pesaron 3 g por muestra y se depositaron en tubos Falcon de 50 ml que contenían 30 ml de agua estéril (1:10 p/v). Los tubos se agitaron por 1 min en vórtex. La solución sobrenadante (solución madre) fue depositada en tubos Eppendorf de 2 ml y almacenada a 4 °C hasta su posterior utilización. Para la siembra se diluyeron las soluciones madre hasta la concentración de  $10^{-6}$ . Posteriormente, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l de la dilución  $10^{-3}$ , la cual se colocó en cajas Petri con 15 ml de medio agar, papa y dextrosa (PDA, BD Bioxon) y PDA adicionado con 2.5 mg/l de antibiótico (amikacina); la solución se disgregó con una asa Digiralsky para cubrir toda la superficie del medio de cultivo. Las cajas Petri se sellaron con plástico adherible y se dejaron en incubación a 28 °C durante cuatro semanas. Se revisaron cada 24 h para monitorear la aparición de nuevas colonias microbianas. Cada morfotipo microbiano observado, se inoculó individualmente en una caja Petri con PDA para su purificación. Discos de 10 mm de la zona de crecimiento activo de cultivos puros se depositaron en tubos Eppendorf de 2 ml con glicerol al 10 % y se almacenaron en ultracongelador a - 80 °C para su posterior utilización.

#### 7.1.3.2 Ensayos de actividad antimicrobiana mediante bioensayos de cocultivo *in vitro*

Se realizó una preselección con los aislados microbianos de *Rubus* mediante bioensayos de cocultivo (Bunbury-Blanchette y Walker 2019) sobre las cepas de *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon liriodendri* y *Phytophthora cinnamomi* utilizadas para evaluar la potencial actividad antagonica de los extractos microbianos, mismas que fueron proporcionadas por el Laboratorio Agrícola Diagnosis. Posteriormente, se seleccionaron 4 aislados de *Rubus* (H3, H8, H14 y B27) que mostraron actividad inhibitoria sobre estos fitopatógenos. Se utilizaron dos criterios de evaluación para determinar la capacidad antagonica de los aislados de *Rubus*: i)

confrontación directa a la inoculación simultánea de un aislado de *Rubus* y un fitopatógeno colocados en lados opuestos de la caja Petri, y ii) confrontación indirecta a la inoculación de un aislado con 10 días previos a la inoculación de un fitopatógeno. En ambos casos se utilizaron microorganismos con crecimiento de siete días. El crecimiento radial de los fitopatógenos se midió con un calibrador digital Vernier (Vinca, DCLA0805) cada 24 h durante 12 días. Todos los tratamientos tuvieron seis repeticiones.

#### **7.1.3.3 Identificación de aislados microbianos**

Los aislados fungosos (H14 y H8) con la mayor actividad antimicrobial y los fitopatógenos modelo fueron enviados al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Colegio de Posgraduados de Texcoco, México, para realizar la extracción de DNA genómico. La región 5.8S rDNA del DNA aislado se amplificó con los oligos ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS 5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.* 1990). Los productos de la PCR se enviaron a Macrogen, Rockville, EEUU para realizar la secuenciación correspondiente. Las secuencias obtenidas se editaron para realizar el análisis comparativo de identidad en la base de datos de secuencias del banco de genes (GenBank) con la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST). Los aislados H3 y B27 se identificaron con claves morfológicas (Barnett y Hunter 1998; Li *et al.* 2016; Visagie *et al.* 2014).

#### **7.1.3.4 Obtención de los extractos microbianos**

Se realizó la extracción de compuestos microbianos de los organismos que presentaron antagonismo en los bioensayos de cocultivo. Las extracciones derivaron del cultivo de microorganismos en medios líquidos (Liu y Liu 2018). Se utilizaron hexano, cloroformo y acetato de etilo. Todos los solventes se obtuvieron de Meyer. Se determinó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco de papel (Dhingra y Sinclair 1995) y seleccionó el extracto con actividad antagónica sobre los fitopatógenos para su evaluación a diferentes dosis.

El extracto microbiano derivado del cultivo líquido de *Penicillium manginii* se realizó mediante el protocolo de extracción líquido-líquido (Liu y Liu 2018) con algunas modificaciones (Figura 12). *Penicillium manginii* se incubó en cajas Petri con PDA durante siete días a 28 °C, bajo condiciones asépticas. A continuación, se cortaron discos de 10 mm de diámetro de la zona de

crecimiento activo de la cepa; tres discos se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de caldo papa dextrosa (PD) y se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm durante 10 días a 28 °C. Se adicionaron 30 ml de acetato de etilo (EtOAc) y se colocó en baño ultrasónico (Branson, modelo 8800) durante 30 min, con posterior reposo de 24 h para separar las fases acuosa y orgánica. La fase orgánica se colectó y depositó en un matraz para evaporar hasta sequedad a  $39 \pm 1$  °C en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4000) acoplado a un baño de circulación refrigerante (MRC, BL20) El rendimiento de material seco se estimó mediante diferencia entre el peso del matraz y el rendimiento del compuesto seco (en mg). El material seco se resuspendió en 1 ml de dimetilsulfóxido al 99.5 % (Sigma).



**Figura 12.** Proceso de extracción de metabolitos microbianos de microorganismos aislado del microbioma de *Rubus* spp.

#### 7.1.3.5 Bioensayos *in vitro* utilizando extracto microbiano de *Penicillium manginii*

El método de difusión en disco (Dhingra y Sinclair 1995) con algunas modificaciones. Se utilizó para comparar tres dosis del extracto microbiano sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos modelo. En cajas Petri de 90 mm de diámetro se vertió una alícuota de 15 ml de PDA. Sobre el medio, en el centro de la caja Petri, se colocó un disco de 17 mm de diámetro de papel filtro estéril Whatman No. 4. El extracto microbiano se aplicó a una concentración de 17 mg/ml. Para realizar la inoculación del extracto a la dosis determinada, se aplicaron las alícuotas de extracto de 59  $\mu$ l (1 mg), 89  $\mu$ l (1.5 mg) ó 118  $\mu$ l (2 mg). Discos de 10 mm de diámetro, cortados de la zona activa (con siete días de crecimiento), se colocaron sobre el papel filtro embebido en el extracto. Las cajas se mantuvieron en incubación a 28 °C y el crecimiento

micelial radial se midió cada 24 h. Cada tratamiento consistió en la combinación de una dosis de extracto con un fitopatógeno y tuvo seis repeticiones.

#### **7.1.3.6 Evaluación de producción de sideróforos**

La determinación de sideróforos se realizó con la utilización del medio Cromo Azurol S (CAS) acorde a la metodología propuesta por Louden *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se realizó el cambio de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , conservándose la concentración de 1 mM de Fe por cada 10 mM de HCl. Además, se sustituyó  $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$  por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una proporción de 39 g/500 ml<sup>-1</sup> (p/v). Para identificar los tipos de sideróforos se utilizaron las claves colorimétricas de Pérez-Miranda *et al.* (2007). En cajas Petri con 15 ml de medio CAS se colocaron de forma equidistante tres discos con micelio de cepas con siete días de crecimiento. Cada tratamiento consistió en un microorganismo y tuvo cuatro repeticiones. Además, se incluyeron controles en medio CAS sin inoculación microbiana.

#### **7.1.3.7 Bioensayos *in vitro* para evaluar la presencia de compuestos orgánicos volátiles microbianos**

El montaje de los bioensayos se realizó de acuerdo al protocolo de detección de compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm) de Li *et al.* (2018), con algunas modificaciones. En cajas Petri con 15 ml de PDA se colocó al centro una sección de 2 mm de micelio de la zona de crecimiento activo de un aislado microbiano que se incubó siete días. Al término de este periodo, en cajas Petri con la misma cantidad de PDA marcadas con líneas perpendiculares se inoculó una sección del fitopatógeno modelo tomado de manera similar a la del aislado microbiano. Después, se empalmaron ambas cajas contraponiéndose entre sí, se sellaron con plástico adherible para fijarlas y se incubaron durante siete días midiendo cada 24 h el crecimiento radial. Al concluir el tiempo establecido, se fotografiaron las cajas que contenían a los fitopatógenos para contrastar cambios morfológicos macroscópicos. Cada tratamiento consistió en seis repeticiones y se incluyeron controles de los fitopatógenos sin interacción con aislados microbianos.

Para evaluar el efecto de los VOCm sobre el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa*) se montaron bioensayos con la utilización de cajas Petri divididas (I) con la metodología descrita por Gutiérrez-Luna *et al.* (2010) con algunas modificaciones. En uno de los lados de la caja se

colocó medio PDA a concentración normal (39 g/L<sup>-1</sup>, BD Bioxon) y en la otra parte, PDA diluido (23.4 g/L<sup>-1</sup>, BD Bioxon). Se desinfectaron las semillas de *L. sativa* con hipoclorito de sodio al 2 % (diluido de la concentración comercial, al 6 %). Posteriormente, se enjuagó abundantemente con agua estéril y se dejaron secar en papel estéril. En el lado con PDA se colocó un segmento de 2 mm con crecimiento microbiano de siete días, mientras que en el PDA diluido se colocaron tres semillas de *L. sativa* previamente desinfectadas. Las cajas se colocaron en un ángulo de 65 ° para favorecer la orientación en el crecimiento de las raíces. La longitud radicular de *L. sativa* se midió con un vernier digital a los 7 días posteriores a la siembra. Cada tratamiento consistió en la interacción de un microorganismo con las plantas de *L. sativa* y de seis repeticiones. Además, se incluyó un control de plantas sin interacción microbiana.

#### **7.1.3.8 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza, para un diseño completamente al azar y la separación de medias de Tukey (0.05). Los análisis se realizaron con el programa R versión 3.5.1 (R Core Team 2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>, la interfaz R Studio versión 1.1.463 (Rstudio Team 2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com> y se empleó la librería Agricolae (agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>) (Mendiburu 2015).

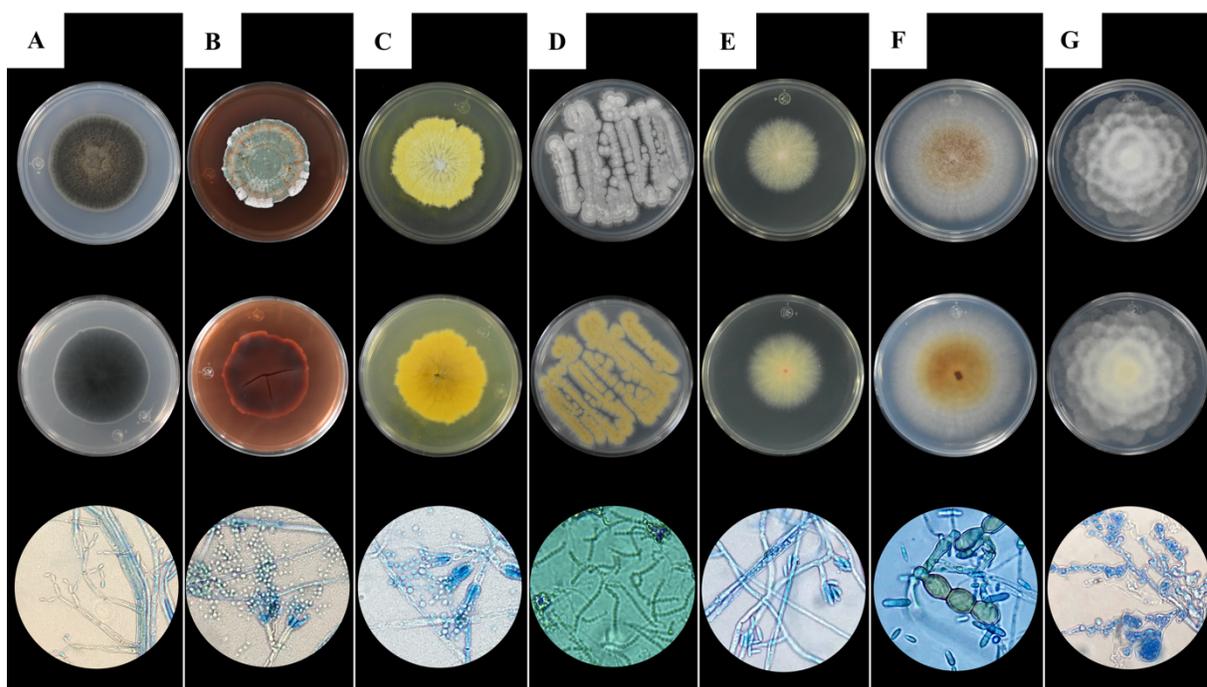
### **7.1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **7.1.4.1 Obtención de la microbiota de *Rubus* spp. e identificación de los aislados microbianos**

El escrutinio de microorganismos asociados a *Rubus* spp. silvestres alcanzó un total de 130 microorganismos. De éstos, 45 aislados microbianos, tanto de bacterias como de hongos, fueron evaluados en ensayos de cocultivo para identificar su potencial antagónico. La microbiota representa una colección de microorganismos y de sus metabolitos con posibles actividades

biológicas como el biocontrol. Estas observaciones han sido previamente referidas en microbiomas de plantas estudiadas en el continente americano (Chevrette *et al.* 2019).

La evaluación de los 45 microorganismos, i.e., 27 bacterias y 18 hongos, en bioensayos preliminares de cocultivo permitió la selección de cuatro aislados microbianos con potencial inhibitorio en los fitopatógenos. Los aislados H14 y H8 se identificaron morfológica y molecularmente como *Cladosporium* sp. y *Penicillium manginii*, respectivamente (Figuras 13A y 13C), mientras que H3 y B27 se asociaron por claves morfológicas a *Penicillium* sp. y a una actinobacteria, respectivamente (Figuras 13B y 13D).



**Figura 13.** Crecimiento de cepas microbianas aisladas de *Rubus* así como de los fitopatógenos analizados en este estudio, en PDA. En la fila I se muestran los anversos de *Cladosporium* sp. (A); *Penicillium* sp. (B); *Penicillium manginii* (C); Actinobacteria (D), *Fusarium oxysporum* con 3 días (E); *Cylindrocarpon liriodendri* de 15 días (F) y *Phytophthora cinnamomi* con 10 días de crecimiento (G). En la fila II se observan los reversos. Las imágenes microscópicas, en la fila III, derivan de observaciones en microscopía óptica; los incisos A, B, C, E, F y G se muestran con un aumento de 40 ×, mientras que el inciso D tiene un aumento de 100 ×.

#### 7.1.4.2 Actividad inhibitoria *in vitro* de aislados microbianos

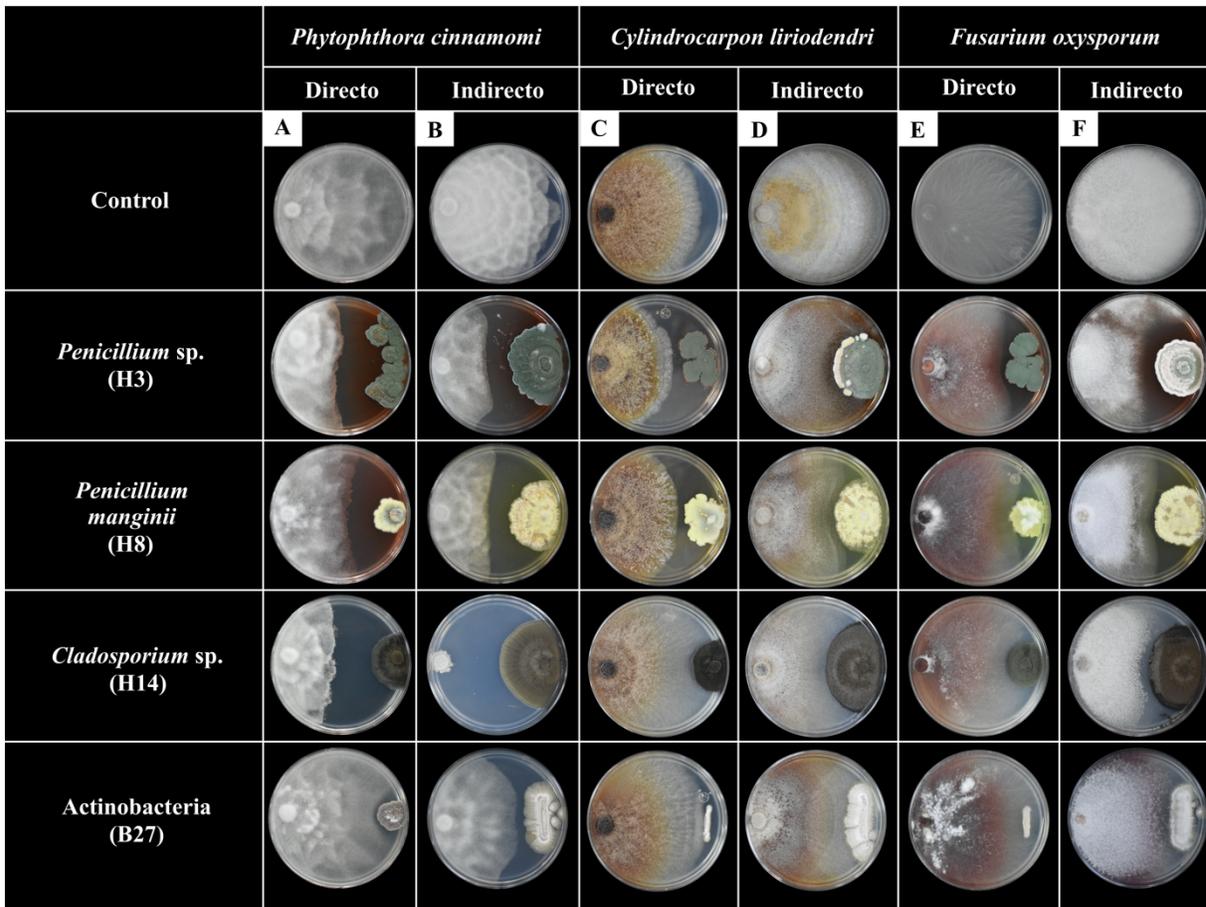
El potencial inhibitorio de aislados microbianos de *Rubus* spp. sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos se elucidó mediante los bioensayos de cocultivo *in vitro* (Cuadro 1 y Figura

12). En los bioensayos directos, *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. redujeron el crecimiento micelial radial de *Phytophthora cinnamomi* a  $21.77 \pm 10.65$  mm (62 %) y  $23.44 \pm 1.81$  mm (60 %) de inhibición, respectivamente. Esta reducción fue significativa en comparación al testigo, con crecimiento promedio de  $58.77 \pm 1.20$  mm (Cuadro 1 y Figura 12A?) fue menor a la obtenida en bioensayos indirectos, ya que *Cladosporium* sp. y *Penicillium manginii* ejercieron actividad inhibitoria sobre *P. cinnamomi* disminuyendo notoriamente su crecimiento ( $2.62 \pm 1.13$  mm y  $24.76 \pm 1.83$  mm, respectivamente) en comparación al testigo ( $58.20 \pm 2.61$  mm), lo que representa 95 % y 65 % de disminución en el crecimiento micelial del fitopatógeno, respectivamente (Cuadro 1 y Figura 12B?). Contrario a lo referido por Abro *et al.* (2019) quienes reportan la reducción del 66.4 % del crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* por efecto de *Penicillium* sp. obtenido de *L. esculentum*, en el presente trabajo en bioensayos directos se observó una disminución significativa en el crecimiento de *F. oxysporum* ( $P < 0.05$ ) al interactuar con *Penicillium* sp., *P. manginii* y *Cladosporium* sp. ( $34.35 \pm 6.46$ ;  $36.81 \pm 0.90$  y  $38.05 \pm 0.64$  mm, respectivamente) al compararlos con el testigo (Cuadro 1 y Figura 14E). En los bioensayos indirectos se observaron porcentajes de inhibición en *F. oxysporum* de 42, 44 y 48 % por parte de *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. y *P. manginii*, respectivamente, lo que demostró la capacidad inhibitoria de los aislamientos (Cuadro 1 y Figura 14F). Por su parte, *P. manginii* redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) el crecimiento micelial de *Cylindrocarpon liriodendri* en un rango de 24-25 % en los bioensayos directos e indirectos al compararlos con el testigo (Cuadro 1 y Figuras 14C y 14D). La variación en la capacidad inhibitoria de los aislamientos se da de acuerdo al fitopatógeno en cuestión como quedó evidenciado en la actividad antagónica de *Aspergillus flavipes* sobre hongos y oomicetes fitopatógenos (El-Sayed y Ali 2020). Por ello, es necesario realizar el escrutinio del efecto antagonista sobre diversos grupos de patógenos, para comparar los rangos de actividad antimicrobiana y establecer su uso potencial como agentes de biocontrol.

**Cuadro 1.** Efecto inhibitorio *in vitro* de los aislados microbianos de *Rubus* spp. sobre el crecimiento radial (mm) de *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Cylindrocarpon liriodendri* en confrontación directa e indirecta.

TRATAMIENTOS	<i>Phytophthora</i> <i>cinnamomi</i> (Phy)	% Inhibición Phy	<i>Cylindrocarpon</i> <i>liriodendri</i> (Cyl)	% Inhibición Cyl	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> (Fus)	% Inhibición Fus
<b>Bioensayo directo</b>						
Control	58.77 ± 1.20 <sup>a</sup>	0	59.22 ± 0.97 <sup>a</sup>	0	59.33 ± 0.86 <sup>a</sup>	0
<i>Penicillium</i> sp. (H3)	21.77 ± 10.65 <sup>d</sup>	62.94	40.25 ± 5.65 <sup>d</sup>	32.03	43.62 ± 1.40 <sup>c</sup>	26.47
<i>Penicillium manginii</i> (H8)	35.00 ± 8.90 <sup>c</sup>	40.45	44.71 ± 3.09 <sup>c</sup>	24.49	44.50 ± 5.89 <sup>c</sup>	24.99
<i>Cladosporium</i> sp. (H14)	23.44 ± 1.81 <sup>d</sup>	60.11	50.00 ± 0.75 <sup>b</sup>	15.57	50.66 ± 0.51 <sup>b</sup>	14.60
Actinobacteria (B27)	50.11 ± 3.01 <sup>b</sup>	14.74	58.77 ± 1.30 <sup>a</sup>	0.75	59.71 ± 0.48 <sup>a</sup>	0
R <sup>2</sup>	0.8379	-	0.8725	-	0.8896	-
<b>Bioensayo indirecto</b>						
Controles	58.20 ± 2.61 <sup>a</sup>	0	41.85 ± 0.97 <sup>a</sup>	0	66.32 ± 1.14 <sup>a</sup>	0
<i>Penicillium</i> sp. (H3)	27.02 ± 5.70 <sup>c</sup>	53.57	32.48 ± 6.21 <sup>bc</sup>	22.38	34.35 ± 6.46 <sup>c</sup>	48.20
<i>Penicillium manginii</i> (H8)	24.76 ± 1.83 <sup>c</sup>	57.45	31.23 ± 1.46 <sup>c</sup>	25.37	36.81 ± 0.90 <sup>c</sup>	44.49
<i>Cladosporium</i> sp. (H14)	2.62 ± 1.13 <sup>d</sup>	95.49	37.56 ± 0.88 <sup>ab</sup>	10.25	38.05 ± 0.64 <sup>c</sup>	42.62
Actinobacteria (B27)	38.55 ± 1.43 <sup>b</sup>	33.76	42.96 ± 3.33 <sup>a</sup>	0	52.40 ± 0.82 <sup>b</sup>	20.98
R <sup>2</sup>	0.9776	-	0.7164	-	0.9515	-

Promedios con letras distintas indican diferencias significativas entre filas (Tukey,  $P < 0.05$ ).



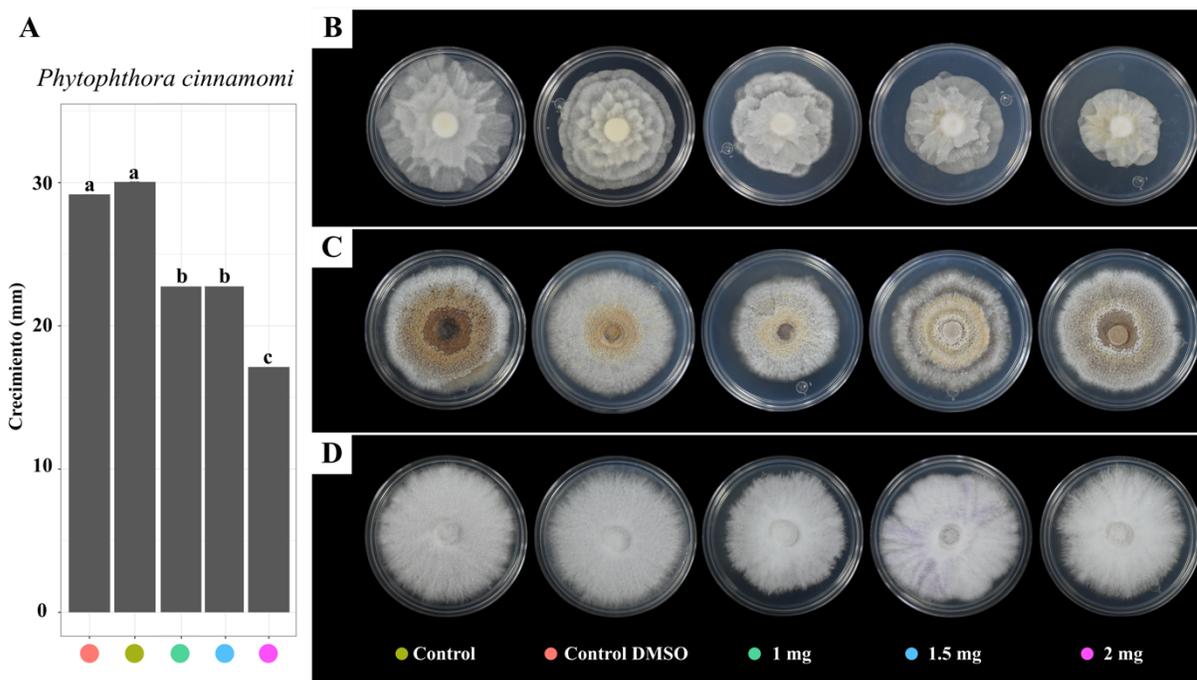
**Figura 14.** Efecto de aislados microbianos de *Rubus* spp. silvestres: *Penicillium* sp. (H3); *Penicillium manginii* (H8); *Cladosporium* sp. (H14); Actinobacteria (DB27) sobre el crecimiento radial de *Phytophthora cinnamomi* (A, B), *Cylindrocarpon liriodendri* (C, D) y *Fusarium oxysporum* (E, F) en bioensayos de cocultivo directo e indirecto.

#### 7.1.4.3 Actividad antimicrobiana de los extractos

Se obtuvieron 12 extractos crudos del cultivo líquido de los microorganismos que se sometieron a pruebas preliminares en difusión de disco de papel para evaluar su bioactividad. Aunque los extractos clorofórmicos y hexánicos no evidenciaron actividad antagónica, el extracto de *Penicillium manginii* con acetato de etilo presentó inhibición sobre *P. cinnamomi*, mientras que en *Fusarium oxysporum* y *Cylindrocarpon liriodendri* la actividad inhibitoria resultó discreta. La presencia de una zona de inhibición de crecimiento propició la evaluación de diferentes dosis: 1, 1.5 y 2 mg.

El extracto de *P. manginii* ejerció diferentes efectos en cada fitopatógeno, como cambios en la morfología macroscópica (*C. liriodendri*, Figura 15C) ó disminución del crecimiento radial (*P.*

*cinnamomi*, Figura 15B), lo que sugiere que los metabolitos de *P. manginii* presentan actividad antimicrobiana y son una herramienta potencial en el manejo de estos patógenos. Algunos microorganismos necesitan un estímulo exógeno para producir moléculas bioactivas como se demostró en ensayos de cocultivo de *Penicillium citrinum* y *P. digitatum* que ejercían disminución en el porcentaje de síntomas en naranjas inoculadas con *P. digitatum* (Costa *et al.* 2019). En este trabajo, se mostró una reducción del 15 % en el crecimiento de *C. liriodendri* a una dosis de 1 mg, mientras que *P. cinnamomi* se vio afectado con todas las dosis evaluadas. Con 1 y 1.5 mg, el crecimiento se redujo 20 %, y al aumentar a 2 mg, en un 40 % (Figuras 15A y 15B). Por su parte, *F. oxysporum* evidenció un cambio en la coloración de la colonia al ser tratado con una dosis de 1.5 mg (Figura 15D). Algunos metabolitos producidas por *Penicillium* spp. generan la destrucción de la membrana y limitan el crecimiento de las hifas en fitopatógenos (Luo *et al.* 2019; Mapari *et al.* 2009; Tam *et al.* 2015), mientras que se encontró que *P. manginii* reduce la síntesis de ATP e inhibe la respiración mitocondrial (Cao *et al.* 2015). Esto podría explicar la disminución en el crecimiento de las colonias y su posible cambio de morfología.



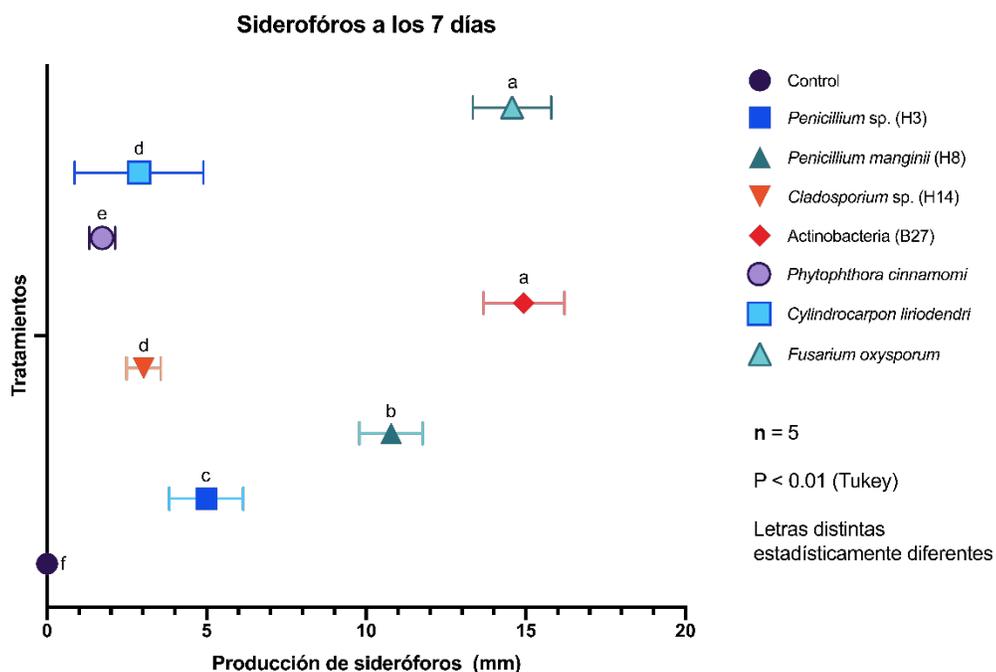
**Figura 15.** Efecto de tres dosis del extracto crudo de *Penicillium manginii* sobre el crecimiento radial de *Phytophthora cinnamomi* (A y B), *Cylindrocarpon liriodendri* (C), y *Fusarium oxysporum* (D). Análisis de separación de medias de Tukey de la variable crecimiento radial ( $P < 0.05$ ).

#### 7.1.4.4 Producción de sideróforos

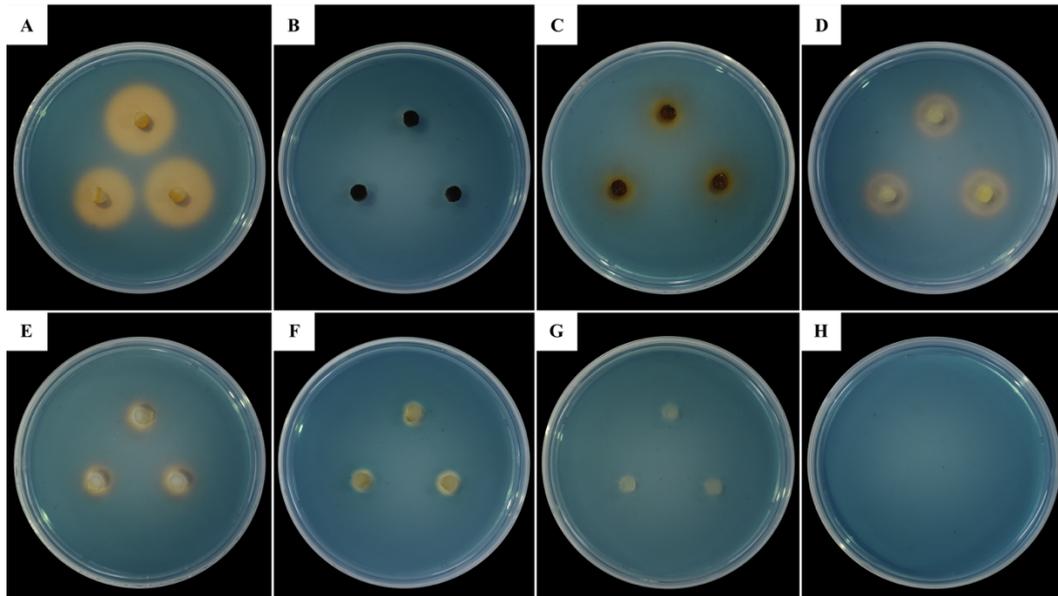
En los bioensayos con la utilización del medio CAS se identificó la secreción en diferentes cantidades (en relación al diámetro, en mm) y tipos de sideróforos. De modo que se detectaron sideróforos de tipo catecol, hidroxamatos y carboxilatos, que produjeron coloraciones amarillo-verde, naranja, morado en el medio, respectivamente. La detección de los sideróforos se observó tanto en los aislados microbianos como en los fitopatógenos. En el caso de las actinobacterias, se evidenció la producción del halo (en mm) significativamente mayor ( $19.94 \pm 1.27$  mm) en comparación a *Penicillium manginii*, *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. ( $10.78 \pm 0.99$ ,  $4.99 \pm 1.16$ ,  $3.03 \pm 0.54$  mm, respectivamente) a los 7 días de crecimiento en el medio CAS (Figuras 16 y 18A). Además, los sideróforos secretados a las 24 h y a los 7 días se asociaron al tipo hidroxamato debido a su coloración naranja (Figuras 17A y 18A) acorde a lo reportado por Pérez-Miranda *et al.* (2007). Lo anterior concuerda con Cruz-Morales *et al.* (2016) que elucidaron el potencial genómico de los genes codificantes para sideróforos de tipo hidroxamato (desferrioxaminas) en actinobacterias obtenidas de la zona de Cuatro Ciénegas, Chihuahua. A su vez, la caracterización fenotípica de los aislados de *Streptomyces* spp. (CC71, CC53 y CC77) mostró la capacidad de secreción de ferrioxaminas B y E, además de dos variantes, la propionil-ferrioxamina y aril-ferrioxamina, mientras que en *Micrococcus* spp. (CH3 y CH7) se evidenció la capacidad para producir aril-ferrioxaminas. Por su parte, Anwar *et al.* (2016) aislaron *Streptomyces* spp. De la rizósfera de *Triticum aestivum* y de *Solanum lycopersicum* y determinaron la capacidad de las cepas para secretar sideróforos y promover el crecimiento en *T. aestivum*. Es importante resaltar que la búsqueda de metabolitos secundarios del tipo sideróforo no se limita a la búsqueda en suelo o en la zona rizosférica, como lo demostraron Wu *et al.* (2018). Este grupo describió una nueva molécula denominada albisporaquelina, sideróforo del tipo hidroxamato, de la actinobacteria *Amycolatopsis albispora* WP1<sup>T</sup> obtenida de sedimentos marítimos, lo cual demuestra la factibilidad de descubrir estos compuestos en distintos nichos ecológicos.

En relación al aislado de *Penicillium manginii* se encontró la capacidad de secretar tres tipos de sideróforos. Los del tipo catecol e hidroxamato se presentaron a las 24 h de crecimiento, con denotación colorimétrica morada y naranja, respectivamente (Figura 17 D), mientras que los de tipo carboxilato se evidenciaron a los 7 días (Figura 18 D). Los sideróforos secretados los 7 días mostraron una longitud radial estadísticamente mayor ( $10.78 \pm 0.99$  mm) al compararse con

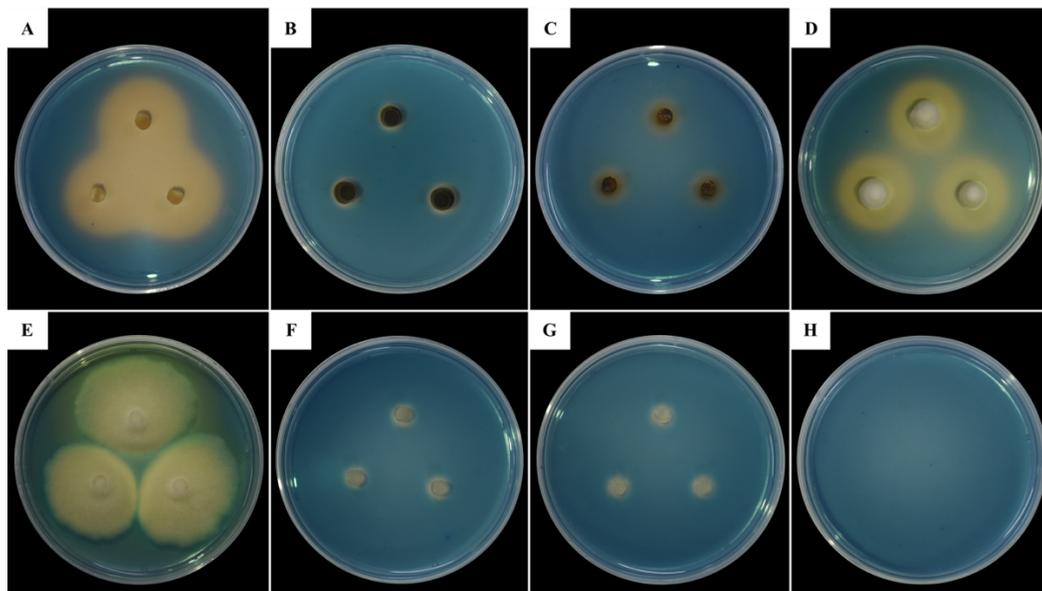
*Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. (Figuras 16, 18 C y 18 B). Los datos anteriores resultaron superiores a los registrados por Chowdappa *et al.* (2020) quienes evidenciaron que el diámetro de halo producido por *Penicillium citrinum* (aislado de raíces de *Cymbidium aloifolium*) presentó  $9.33 \pm 1.52$  mm. Lo anterior demostró la capacidad del aislado de *Penicillium manginii* para producir sideróforos de varios grupos químicos.



**Figura 16.** Determinación de sideróforos (mm) de aislados microbianos obtenidos de *Rubus* spp. y fitopatógenos (*Phytophthora cinnamomi*, *Cyllindrocarpon liriodendri* y *Fusarium oxysporum*) en medio cromo azulol S (CAS). Los diferentes símbolos representan a cada microorganismo. Tukey P < 0.01



**Figura 17.** Producción de sideróforos de aislados microbianos obtenidos de *Rubus* spp. y de fitopatógenos de importancia económica en medio cromo azul S (CAS) a las 24 h. Actinobacteria (A); *Cladosporium* sp. (B); *Penicillium* sp. (C); *Penicillium maniginii* (D); *Fusarium oxysporum* (E); *Cylindrocarpon liriodendri* (F); *Phytophthora cinnamomi* (G) y control medio CAS (H).



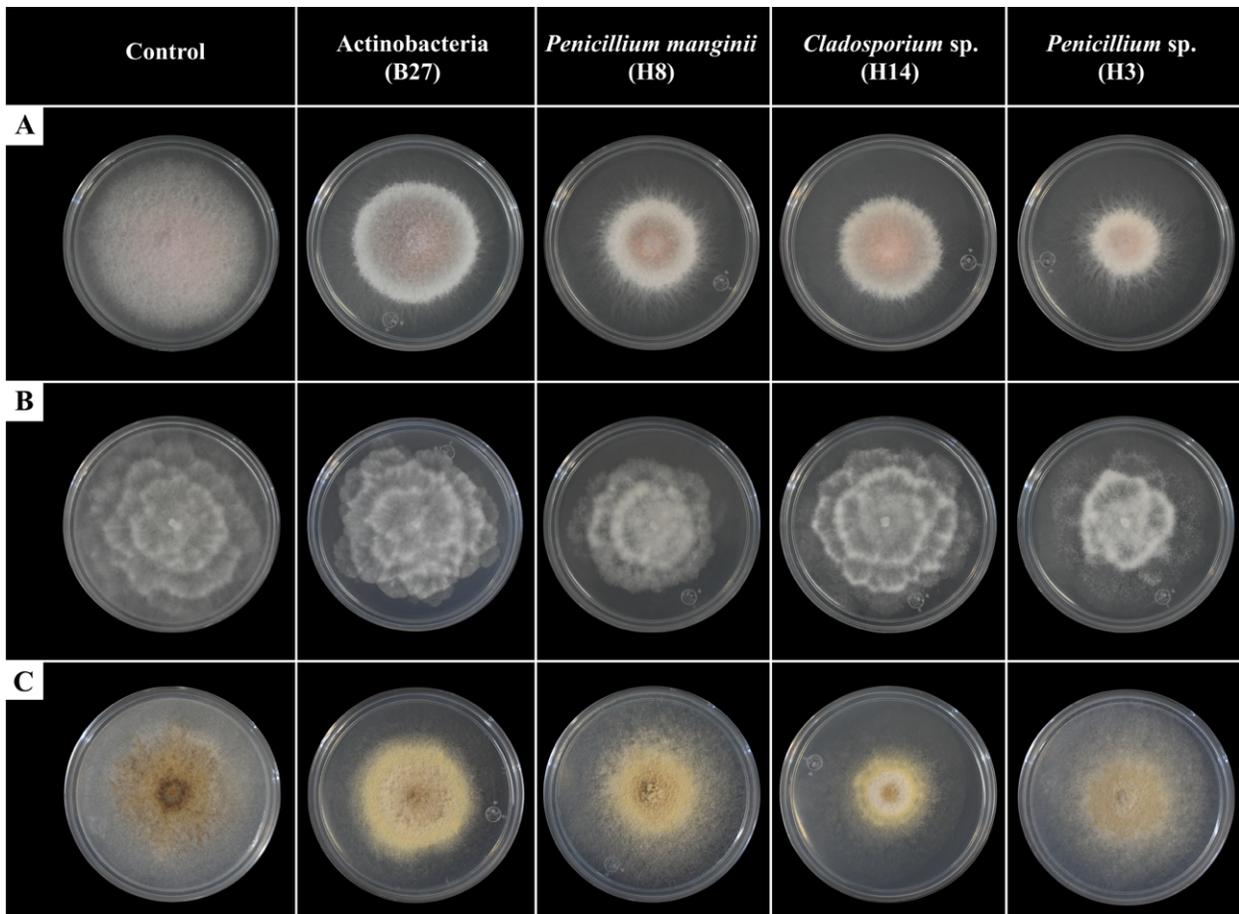
**Figura 18.** Producción de sideróforos de aislados microbianos obtenidos de *Rubus* spp. y de fitopatógenos de importancia económica en medio cromo azul S (CAS) a los siete días. Actinobacteria (A); *Cladosporium* sp. (B); *Penicillium* sp. (C); *Penicillium maniginii* (D); *Fusarium oxysporum* (E); *Cylindrocarpon liriodendri* (F); *Phytophthora cinnamomi* (G) y control medio CAS (H).

#### 7.1.4.5 Compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm)

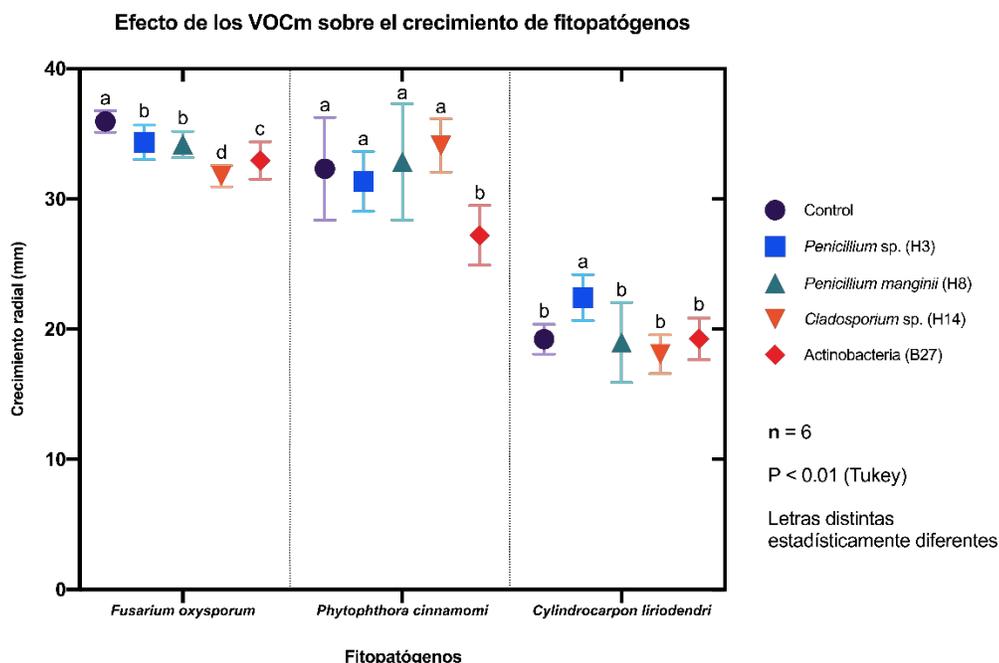
La técnica de contraposición en cajas Petri permitió determinar que el tipo de antagonismo que estaba afectando el crecimiento del patógeno era ocasionado por volátiles. La detección de compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVm) resultó favorable al evidenciar un efecto antagonista. En la interacción entre *Cladosporium* sp. y *F. oxysporum* se evidenció disminución del 18 % en el crecimiento micelial del patógeno y desarrollo escaso en el área perimetral de la colonia, respuesta que pudo deberse a la producción de moléculas volátiles, como los denominados COVm. Lo anterior debido a que a pesar de no existir contacto entre patógeno y antagonista sí hubo disminución en su crecimiento (Figura 19A). Los resultados en la acción de los COVm sobre la morfología de *Phytophthora cinnamomi* y *Cylindrocarpon liriodendri* fueron evidentes al compararse con los testigos, exhibiendo variación en el crecimiento y densidad micelial (Figuras 19B, 19C y 20).

Existe suficiente evidencia para determinar que los COVm son responsables de la respuesta inhibitoria hacia diversos microorganismos (Kanchiswamy *et al.* 2015; Schulz-Bohm *et al.* 2017; Thomas *et al.* 2020; Tirranen y Gitelson 2006.), tal como se observó en *F. oxysporum* CanR-46 que inhibió a 14 especies de hongos fitopatógenos, incluidas dos *formae speciales* de *F. oxysporum* y a *Verticillium dahliae*. Esto demostró la funcionalidad antagonica inclusive hacia otras especies del mismo género (Zhang *et al.* 2020). Lo anterior ha llevado a enlistar a los COVm emitidos con mayor frecuencia, como el  $\alpha$ -humuleno y el  $\beta$ -cariofileno, para profundizar en los mecanismos de biocontrol que presentan (Kanchiswamy *et al.* 2015; Piechulla *et al.* 2017).

Es importante mencionar que existe abundancia de microorganismos de diversos microbiomas que tienen capacidad de emitir COVm, como las rizobacterias encontradas en aguacate que secretan compuestos cetónicos, como la 2-nonanona, que exhibe alta actividad antifúngica sobre *Fusarium kuroshium* (69.88 %) y capacidad de adelgazar las hifas del patógeno debido a la vacuolización de la membrana citoplasmática (Guevara-Avendaño *et al.* 2020).



**Figura 19.** Efecto de los compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVm) de actinobacteria (B27), *P. manginii* (H8), *Cladosporium* sp. (H14), *Penicillium* sp. (H3) obtenidos de plantas silvestres de *Rubus* spp. sobre la morfología y crecimiento de *Fusarium oxysporum* (A), *Phytophthora cinnamomi* (B) y *Cylindrocarpon. liriodendri* (C) cultivados en PDA durante 7 días.

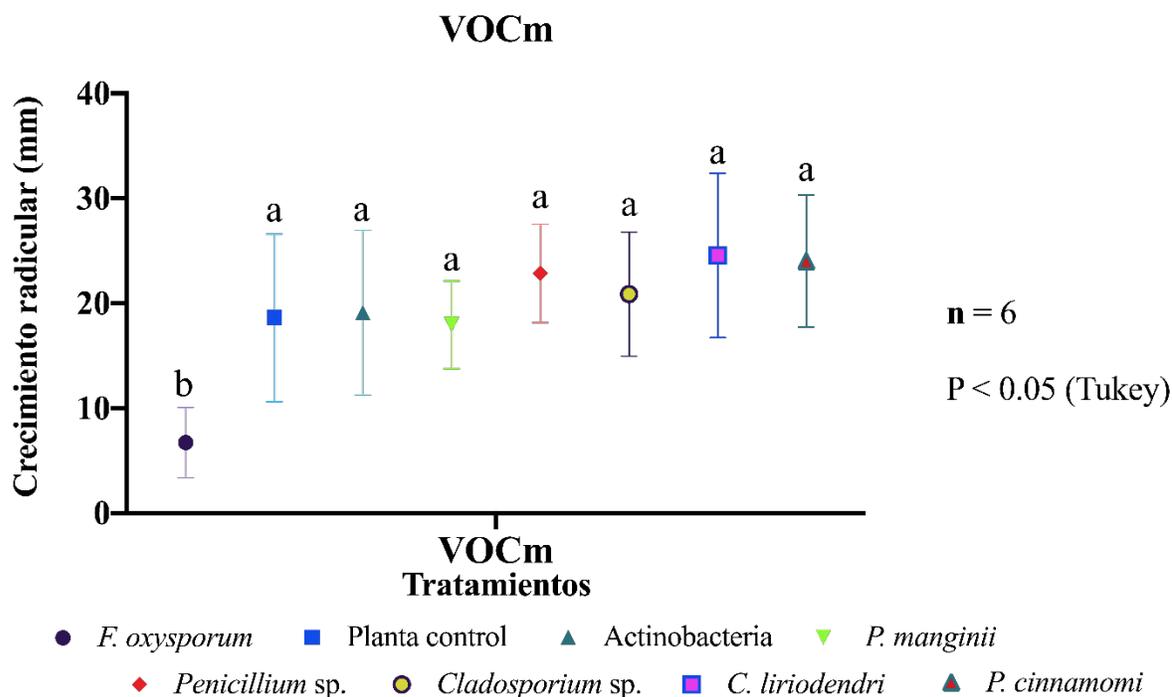


**Figura 20.** Gráfica del efecto de los compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVm) de actinobacteria (B27), *Penicillium manginii* (H8), *Cladosporium* sp. (H14), *Penicillium* sp. (H3) sobre el crecimiento micelial radial de *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Cylindrocarpon liriodendri* cultivados en PDA durante 7 días.

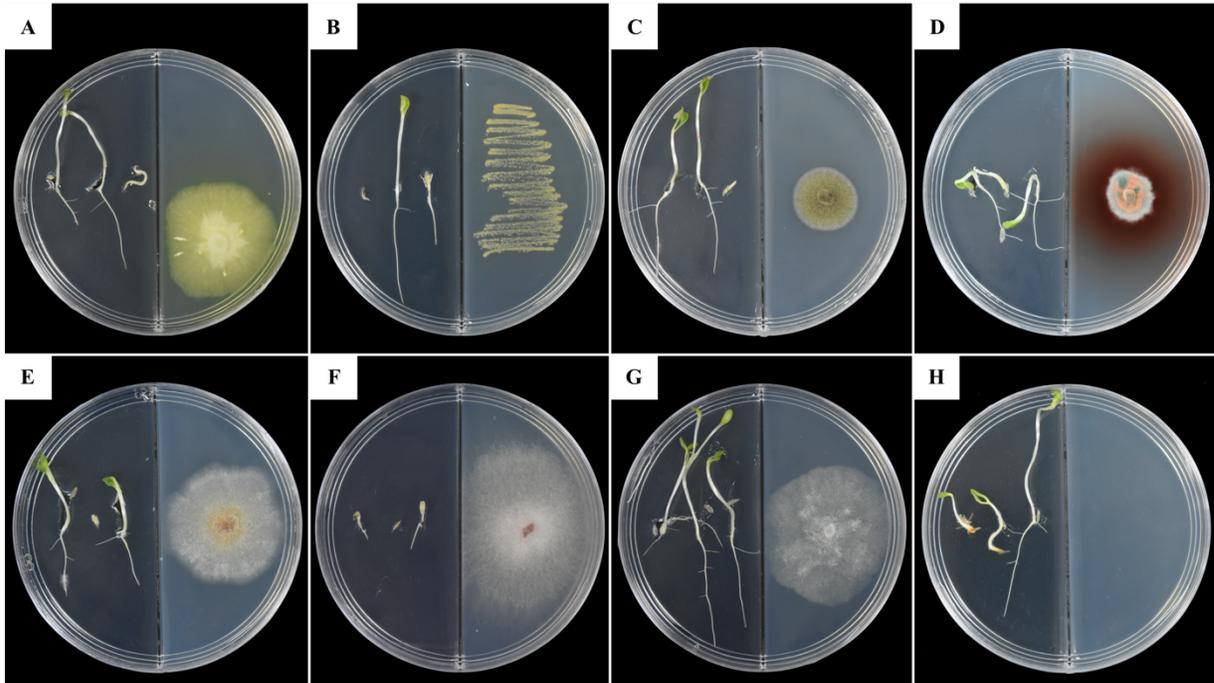
#### 7.1.4.6 Efecto de VOCm sobre el crecimiento de *Lactuca sativa*

Diversas plantas modelo se han utilizado para inferir el efecto de los compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm) y los compuestos orgánicos difusibles (DOCm) en condiciones *in vitro*. Lo anterior se ha demostrado, por ejemplo, en ensayos realizados por Gutiérrez-Luna *et al.* (2010) al utilizar plantas de *A. thaliana* para la evaluación de los VOCm bacterianos en la promoción del crecimiento, o en los ensayos realizados por Fincheira *et al.* (2016), quienes evaluaron la interacción de los VOCm emitidos por bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Staphylococcus* en la promoción de la longitud radicular de *L. sativa*. En ambos estudios se demostró un aumento tanto de su biomasa como de su tamaño. Este resultado alienta la evaluación del efecto de las emisiones de otros microorganismos sobre diferentes materiales vegetales. En esta investigación se encontró que la longitud de raíz en *L. sativa* se mantiene estadísticamente similar al interactuar con VOCm de los aislados microbianos. En relación al efecto de los VOCm de los fitopatógenos, se encontró que los compuestos secretados por *P. cinnamomi* y *C. liriodendri* no afectaron el crecimiento de las

raíces de *L. sativa*. Sin embargo, el efecto de los VOCm emitidos por *F. oxysporum* fue negativo, ya que disminuyó significativamente el crecimiento radicular (Figuras 21 y 22F). Particularmente, el crecimiento radicular de *L. sativa* se ve influenciado por el efecto quimiotrópico de los VOCm de *Penicillium* sp. Este hecho se evidenció debido a la tendencia de las raíces para crecer con dirección hacia el aislado microbiano (Figura 22D). En un estudio realizado por Bitas *et al.* (2015) se mostró el efecto de los VOCm emitidos por cepas de *Fusarium oxysporum* sobre el crecimiento de *A. thaliana*. Estos investigadores encontraron además que la mayor cantidad de VOCm fueron sesquiterpenos y diterpenos. En general, los VOCm promovieron el crecimiento de *A. thaliana*; sin embargo, algunos compuestos, identificados como 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-octen-3-ol y 3-octanona mostraron capacidad inhibitoria. Además, reportan que la variación en la estimulación o inhibición del crecimiento varió en función de las combinaciones entre los ecotipos de *A. thaliana* y las cepas de *F. oxysporum*. Esta situación podría explicar la inhibición del crecimiento radicular en *L. sativa* ocasionada por los VOCm de *F. oxysporum* (Figuras 21 y 22F) y sugerir la naturaleza química de los compuestos.



**Figura 21.** Efecto de compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm) de los microorganismos obtenidos de *Rubus* spp. y de los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *Cylindrocarpon liriodendri* en el crecimiento radicular de *Lactuca sativa* en medio de cultivo PDA.



**Figura 22.** Efecto de compuestos orgánicos volátiles microbianos (VOCm) en el crecimiento radicular de *Lactuca sativa* en medio de cultivo PDA. Los VOCm fueron emitidos por *Penicillium manginii* (A); Actinobacteria (B); *Cladosporium* sp. (C); *Penicillium* sp. (D); *Cylindrocarpon liriodendri* (E); *Fusarium oxysporum* (F); *Phytophthora cinnamomi* (G). Las plantas control se muestran en (H). Durante un tiempo de exposición hacia los VOCm de 7 días.

### 7.1.5 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación demuestran que los microorganismos asociados a plantas silvestres de *Rubus* son un recurso potencial para la obtención de microorganismos con actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon liriodendri* y *Phytophthora cinnamomi*.

La diversidad de organismos encontrados en las diferentes áreas de la planta (caulósfera, endosfera, rizósfera, etc.) generó un total de 130 morfotipos, entre bacterias y hongos, de los cuales hasta el momento sólo se ha demostrado actividad antagónica en 4 de ellos. Se han observado mecanismos antagónicos de fungistasis, competencia y antibiosis. En el caso de la

antibiosis se evidenció por la evaluación del extracto de *Penicillium manginii* sobre *P. cinnamomi*, exhibiendo inhibición del crecimiento micelial y alteración en la morfología hifal. La fungistasis se observó en los ensayos de cocultivo y de producción de VOCm, mostrando la delimitación del crecimiento de los fitopatógenos en interacción con *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium manginii* y actinobacterias. El antagonismo por el mecanismo de competencia se observó con los halos generados en el medio CAS, señal de que los aislados microbianos tienen la capacidad de secretar sideróforos.

Estos resultados sugieren la posibilidad de estudios futuros *in situ* para evaluar sus aplicaciones en la agricultura. Y otros estudios para definir la naturaleza de los VOC y otros posibles compuestos responsables de los efectos de inhibición del crecimiento observado en los fitopatógenos de zaramora comercial estudiados.

#### 7.1.6 LITERATURA CITADA

1. **Abro, M.A., Sun, X., Li, X., Jatoi, G.H., y Guo, L.D. (2019).** Biocontrol Potential of Fungal Endophytes against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Causing Wilt in Cucumber. The Plant Pathology Journal, 35(6), 598–608. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2019.0129>
2. **Agrios, George N. (2005).** Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida. 5th Edition, Elsevier Academic Press, 72 pp, 237 pp, 383 pp
3. **Anwar, S., Ali, B., y Sajid, I. (2016).** Screening of Rhizospheric Actinomycetes for Various In-vitro and In-vivo Plant Growth Promoting (PGP) Traits and for Agroactive Compounds. Frontiers in Microbiology, 7: 1334. doi:10.3389/fmicb.2016.01334
4. **Azerang, P., Khalaj, V., Kobarfard, F., Owlia, P., Sardari, S. y Shahidi, S. (2019)** Molecular Characterization of a Fungus Producing Membrane Active Metabolite and Analysis of the Produced Secondary Metabolite. Iranian Biomedical Journal 23 (2): 121-128. DOI: 10.29252/ibj.23.2.121
5. **Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1998).** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Edition, APS Press, St. Paul., Minnesota.
6. **Bashan, Y., Holguín G. y Ferrera-Cerrato, R. (1996)** Interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos. Terra, 14 (2):159-192

7. **Berk, Z. (2018).** Extraction. *Food Process Engineering and Technology*, 289–310. doi:10.1016/b978-0-12-812018-7.00011-7
8. **Belisle, R., McKee, B., Hao, W., Crowley, M., Arpaia, M.L., Miles, T.D., Adaskaveg, J.E. y Manosalva, P. (2019).** Phenotypic Characterization of Genetically Distinct *Phytophthora cinnamomi* Isolates From Avocado. *Phytopathology*, 109:384–394. doi:10.1094/phyto-09-17-0326-r
9. **Bills, G. F. y Gloer, J. E. (2019)** Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol Spectr*, 4(6):1-32. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.
10. **Bitas, V., McCartney, N., Li, N., Demers, J., Kim, J.-E., Kim, H.-S., Brown, K. M. y Kang, S. (2015).** *Fusarium oxysporum* Volatiles Enhance Plant Growth Via Affecting Auxin Transport and Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 6:1248. DOI=10.3389/fmicb.2015.01248
11. **Bunbury-Blanchette., A.L. y Walker, A.K. (2019).** *Trichoderma* Species Show Biocontrol Potential in Dual Culture and Greenhouse Bioassays Against *Fusarium* Basal Rot of Onion. *Biological Control*, 130: 127-135 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007>
12. **Burgess, T. I., Scott, J. K., Mcdougall, K. L., Stukely, M. J. C., Crane, C., Dunstan, W. A., Brigg, F., Andjic, V., White, D., Rudman, T., Arentz, F., Ota, N. y Hardy, G. E. S. J. (2016).** Current and Projected Global Distribution of *Phytophthora cinnamomi*, One of the World’s Worst Plant Pathogens. *Global Change Biology*, 23(4), 1661–1674. doi:10.1111/gcb.13492
13. **Bradley, S.A., Zhang, J., y Jensen, M. K. (2020).** Deploying Microbial Synthesis for Halogenating and Diversifying Medicinal Alkaloid Scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, [594126]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594126>.
14. **Cao, P., Yang, J., Miao, C.P., Yan, Y., Ma, Y.T., Li, X.N., Zhao, L.X. y Huang, S.X. (2015).** New Duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and Structure Revision of the Duclauxin Family. *Organic Letters*, 17(5), 1146–1149. doi:10.1021/acs.orglett.5b00081
15. **Carvajal-Yepes, M., Cardwell, K., Nelson, A., Garrett, K. A., Giovani, B., Saunders, D. G. O., Kamoun, S., Legg, J. P., Verdier, V., Lessel, J., Neher, R. A.,**

- Day, R., Pardey, P., Gullino, M. L., Records, A. R., Bextine, B., Leach, J. E., Staiger, S. y Tohme, J. (2019).** A Global Surveillance System for Crop Diseases. *Science*, 364(6447): 1237–1239. doi:10.1126/science.aaw1572
16. **Centre for *Phytophthora* Science & Management (2020)** *Phytophthora*. School of Veterinary and Life Sciences Murdoch University, Western Australia. Consultado el 13 de Enero del 2020 en WWW: <https://www.cpsm-phytophthora.org/phytophthora.php>
17. **Contreras, M., Loeza, P. D., Villegas, J., Farias, R., y Santoyo, G. (2016).** A Glimpse of the Endophytic Bacterial Diversity in Roots of Blackberry Plants (*Rubus fruticosus*). *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15(3), 10.4238/gmr.15038542. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038542>
18. **Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., y Larsen, J. (2016).** Ecological Functions of *Trichoderma* spp. and their Secondary Metabolites in the Rhizosphere: Interactions with Plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw036. doi:10.1093/femsec/fiw036
19. **Cortés-Patiño, S., Vargas, C., Álvarez-Flórez, F., Bonilla, R., Estrada-Bonilla, G. (2021).** Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* Consortium to Promote Growth of Perennial Ryegrass under Water Deficit. *Microorganisms*, 9(1):91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010091>
20. **Costa, J.H., Wassano, C.I., Angolini, C.F.F., Scherlach, K., Hertweck, C. y Pacheco-Fill, T. (2019).** Antifungal Potential of Secondary Metabolites Involved in the Interaction Between Citrus Pathogens. *Sci, Rep* 9, 18647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55204-9>
21. **Chevrette, M.G., Carlson, C.M., Ortega, H.E., Thomas, C., Barns, K.J., Book, A.J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W., Grubbs, K.J., Horn, H.A., Hoffmann, F.M., Klassen, J.L., Knack, J.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Muller, L., Melo, W.G.P., Pinto-Tomás, A., Schmitz, A., Wendt-Pienkowski, E., Wilman, S., Zhao, M., Zhang, F., Bugni, T.S., Andes, D.R., Pupo, M.T., y Currie, C.R (2019).** The Antimicrobial Potential of *Streptomyces* from Insect Microbiomes. *Nature Communications*, 10 (516):1-11 doi:10.1038/s41467-019-08438-0

22. **Chowdappa, S., Jagannath, S., Konappa, N., Udayashankar, A. C., & Jogaiah, S. (2020).** Detection and Characterization of Antibacterial Siderophores Secreted by Endophytic Fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules*, 10(10), 1412. doi:10.3390/biom10101412
23. **Chowdhary, K. and Kaushik, N. (2015).** Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS ONE* 10 (11): e0141444 DOI:10.1371/journal.pone.0141444
24. **Cruz-Morales, P., Ramos-Aboites, H. E., Licona-Cassani, C., Selem-Mójica, N., Mejía-Ponce, P. M., Souza-Saldívar, V., y Barona-Gómez, F. (2017).** Actinobacteria Phylogenomics, Selective Isolation from an Iron Oligotrophic Environment and Siderophore Functional Characterization, Unveil New Desferrioxamine Traits. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(9). doi:10.1093/femsec/fix086
25. **Dann, E.K., Cooke, A.W., Forsberg, L.I., Pegg, K.G., Tan, Y.P. y Shivas, R.G. (2012).** Pathogenicity Studies in Avocado with Three Nectriaceous Fungi, *Calonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriodendri*. *Plant Pathology*, 61:896-902. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02579.x
26. **De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. (2007)** Bacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas para Propósitos Agrícolas y Ambientales. In: *Microbiología Agrícola: Hongos, Bacterias, Micro y Macrofauna, Control Biológico, Planta-Microorganismo*. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
27. **Dimkpa, C., Svatoš, A., Merten, D., Büchel, G., y Kothe, E. (2008).** Hydroxamate Siderophores Produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 Bind Nickel and Promote Growth in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Under Nickel Stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(3), 163–172. doi:10.1139/w07-130
28. **Dhanasekaran, D., Thajuddin, N. y Panneerselvam, A. (2016).** *Antimicrobials: Synthetic and Natural Compounds*. Tiruchirapalli, Tamil Nadu, India: Bharathidasan University.
29. **Dhingra, O.D. y Sinclair, J.B (1995).** *Basic Plant Pathology Methods*. Second Edition. CRC Lewis Publishers, 217-218

30. **El-Sayed, A.S.A. y Ali, G.S. (2020).** *Aspergillus flavipes* is a Novel Efficient Biocontrol Agent of *Phytophthora parasitica*. *Biological Control*. 104072. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104072
31. **Elsherbiny, E.A., Amin, B.H., Aleem, B., Kingsley, K.L., y Bennett, J.W. (2020).** *Trichoderma* Volatile Organic Compounds as a Biofumigation Tool Against Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in Postharvest Potato Tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.0c03150
32. **Erper, I., Agustí-Brisach, C., Tunali, B. y Armengol, J. (2013).** Characterization of Root Rot Disease of Kiwi Fruit in the Black Sea Region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 291–300. DOI <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0163-6>
33. **Fincheira, P. y Quiroz, A. (2018).** Microbial Volatiles as Plant Growth Inducers. *Microbiological Research*, 208:63-75. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.002>.
34. **Fincheira, P., Venthur, H., Mutis, A., Parada, M. y Quiroz, A. (2016).** Growth Promotion of *Lactuca sativa* in Response to Volatile Organic Compounds Emitted from Diverse Bacterial Species. *Microbiological Research*, 193, 39–47. doi:10.1016/j.micres.2016.09.008
35. **Foster, T.M., Bassil, N.V., Dossett, M., Worthington, M.L. y Graham, J. (2019).** Genetic and Genomic Resources for *Rubus* Breeding: a Roadmap for the Future. *Horticultural Research*, 6, 116. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0199-2>
36. **Garbeva, P., Hol, W.H.G., Termorshuizen, A.J., Kowalchuk, G.A. y de Boer, W. (2011).** Fungistasis and General Soil Biostasis – A New Synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 469–477. doi:10.1016/j.soilbio.2010.11.020
37. **Gordon, T.R. (2017).** *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 23–39. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-095919
38. **Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K.R., Monribot-Villanueva, J.L., Kiel-Martínez, A.L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J.A., y Reverchon, F. (2020).** Diffusible and Volatile Organic Compounds Produced by Avocado Rhizobacteria Exhibit Antifungal Effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-020-00249-6
39. **Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., de la Cruz, H. R. y Macías-Rodríguez, L. (2010).** Plant Growth-

- Promoting Rhizobacteria Modulate Root-System Architecture in *Arabidopsis thaliana* Through Volatile Organic Compound Emission. *Symbiosis*, 51(1), 75–83. doi:10.1007/s13199-010-0066-2
40. **Haas, H., Eisendle, M., y Turgeon, B. G. (2008).** Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 149–187. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
41. **Hardham, A.R. y Blackman, L.M. (2018).** *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 260–285. doi:10.1111/mpp.12568
42. **Hilgers, F., Habash, S.S., Loeschke, A., Ackermann, Y.S., Neumann, S., Heck, A., Klaus, O., Hage-Hülsmann, J., Grundler, F.M.W., Jaeger, K.-E., Schleker, A.S.S. y Drepper, T. (2021).** Heterologous Production of  $\beta$ -Caryophyllene and Evaluation of Its Activity against Plant Pathogenic Fungi. *Microorganisms*. 9(1):168. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010168>
43. **Hutchings, M.L., Alpha-Cobb, C.J., Hiller, D.A., Berro, J., y Strobel, S. A. (2017).** Mycofumigation Through Production of the Volatile DNA-methylating agent N-methyl-N-nitrosoisobutyramide by Fungi in the Genus *Muscodor*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), 7358–7371. doi:10.1074/jbc.m117.779009
44. **Inamdar, A.A., Morath, S. y Bennett, J.W. (2020).** Fungal Volatile Organic Compounds: More Than Just a Funky Smell?. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 101–116. doi:10.1146/annurev-micro-012420-080428
45. **Jha, S. (Ed.). (2019).** Endophytes and Secondary Metabolites. *Reference Series in Phytochemistry*. doi:10.1007/978-3-319-90484-9
46. **Kallscheuer, N., Kage, H., Milke, L., Nett, M., & Marienhagen, J. (2019).** Microbial Synthesis of the type I Polyketide 6-methylsalicylate with *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-019-10121-9
47. **Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D.G., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J.D., Roy S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Mukhtar, M.S., Tomé, D.F., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W.E., Lindqvist-Kreuze, H., Meijer, H.J., Petre,**

- B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P.R. y Govers, F. (2015).** The Top 10 Oomycete Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*. 16 (4), 413–434. doi:10.1111/mpp.12190
48. **Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M. y Maffei, M.E. (2015).** Chemical Diversity of Microbial Volatiles and their Potential for Plant Growth and Productivity. *Frontiers in Plant Science*. 6. doi:10.3389/fpls.2015.00151
49. **Keller, N.P. (2019).** Fungal Secondary Metabolism-Regulation, Function and Drug Discovery. *Nature Reviews Microbiology*. doi-10.1038/s41579-018-0121-1
50. **Keswani, C., Singh, H. B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.-W., Mezaache-Aichour, S. Glare, T.R., Borris, R. y Sansinenea, E. (2020).** Antimicrobial Secondary Metabolites from Agriculturally Important Bacteria as Next-Generation Pesticides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-019-10300-8
51. **Koike, S. T. y Gordon, T. R. (2015).** Management of *Fusarium* Wilt of Strawberry. *Crop Protection*, 73, 67–72. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.003
52. **Köhl, J., Kolnaar, R., and Ravensberg, W.J. (2019).** Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00845
53. **Khan, A.H., Hassan, M. and Khan, M.N. (2020)** Conventional Plant Breeding Program for Disease Resistance. In: Ul Haq I., Ijaz S. (eds) *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches. Sustainability in Plant and Crop Protection*, vol 13. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_3)
54. **Kramer, J., Özkaya, Ö. y Kümmerli, R. (2020).** Bacterial Siderophores in Community and Host Interactions. *Nat Rev Microbiol*, 18:152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
55. **Kremser, A., Jochmann, M. A., & Schmidt, T. C. (2016).** Systematic Comparison of Static and Dynamic Headspace Sampling Techniques for Gas Chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(24), 6567–6579. doi:10.1007/s00216-016-9843-y

56. **Lawrence, S.A., Armstrong, C.B., Patrick, W.M. y Gerth, M.L. (2017).** High-Throughput Chemical Screening Identifies Compounds that Inhibit Different Stages of the *Phytophthora agathidicida* and *Phytophthora cinnamomi* Life Cycles. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01340
57. **Liu J. y Liu G. (2018).** Analysis of Secondary Metabolites from Plant Endophytic Fungi. In: Ma W., Wolpert T. (eds) *Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes. Methods in Molecular Biology*, vol 1848. Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-8724-5\_3.
58. **Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X. y Kang, S. (2018).** Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition Between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.*, 9:2614. doi: 10.3389/fmicb.2018.02614
59. **Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. y Jiang, C. (2016).** Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. doi:10.5772/61461
60. **Luo, H., Qing, Z., Deng, Y., Deng, Z., Tang, X., Feng, B. y Lin, W. (2019).** Two Polyketides Produced by Endophytic *Penicillium citrinum* DBR-9 From Medicinal Plant *Stephania kwangsiensis* and Their Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X1984679. doi:10.1177/1934578x19846795
61. **Louden, B. C., Haarmann, D. y Lynne, A. M. (2011).** Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51–53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
62. **Loper, J.E. y Buyer, J.S. (1991).** Siderophores in Microbial Interactions on Plant Surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(1):5-13. DOI: 10.1094/MPMI-4-005
63. **Lozano, G.L., Park, H.B., Bravo, J.I., Armstrong, E.A., Denu, J.M., Stabb, E.V., Broderick, N.A., Crawford, J.M., Handelsman, J. (2019).** Bacterial Analogs of Plant Tetrahydropyridine Alkaloids Mediate Microbial Interactions in a Rhizosphere Model System. *Appl Environ Microbiol* 85:e03058-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03058-18>.

64. **Lu, X., Sun, D., Rookes, J. E., Kong, L., Zhang, X. and Cahill, D. M. (2019)** Nanoapplication of a Resistance Inducer to Reduce *Phytophthora* Disease in Pineapple (*Ananas comosus* L.). *Front. Plant Sci.* 10:1238. doi: 10.3389/fpls.2019.01238
65. **Mapari, S.A., Meyer, A.S., Thrane, U. y Frisvad, J. C. (2009).** Identification of Potentially Safe Promising Fungal Cell Factories for the Production of Polyketide Natural Food Colorants Using Chemotaxonomic Rationale. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 24. doi:10.1186/1475-2859-8-24
66. **Martínez-Núñez, M.A. y López, V.E.L. (2016).** Nonribosomal Peptides Synthetases and their Applications in Industry. *Sustain Chem Process* 4, 13. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>
67. **Mathivanan, N., Prabavathy, V.R. and Vijayanandraj, V.R. (2008).** The Effect of Fungal Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens. In: Karlovsky P. (eds) *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology*, vol 14. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74543-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74543-3_7)
68. **Memariani, Z., Gorji, N., Moeini, R., y Farzaei, M. H. (2020).** Traditional Uses. *Phytonutrients in Food*, 23–66. doi:10.1016/b978-0-12-815354-3.00004-6
69. **Mendiburu, F.D. (2015).** *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.* R Package Version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
70. **Miller, B.R., y Gulick, A.M. (2016).** Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis*, 3–29. doi:10.1007/978-1-4939-3375-4\_1
71. **Narayanasamy, P. (2011).** *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*, India, Ed. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-90-481-9735-4
72. **Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016).** Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in public health*, 4, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
73. **Nivina, A., Yuet, K.P., Hsu, J. y Khosla, C. (2019).** Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. *Chemical Reviews*, 119 (24):12524-12547. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00525

74. **Orozco-Mosqueda, M. C., Rocha-Granados, M. C., Glick, B. R. and Santoyo, G. (2018)** Microbiome Engineering to Improve Biocontrol and Plant Growth-Promoting Mechanisms. *Microbiological Research*, 208:25–31. [://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005)
75. **Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., y Wang, H. (2019).** Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00294
76. **Panaccione D.G. (2005).** Origins and Significance of Ergot Alkaloid Diversity in Fungi. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.039>
77. **Parkinson, L. E., Shivas, R. G. and Dann, E. K. (2017)** Pathogenicity of Nectriaceous Fungi on Avocado in Australia. *Phytopathology*, 107:1479-1485. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0084-R>
78. **Pastrana, A. M., Watson, D. C. and Gordon, T. (2020).** Colonization of Wild Blackberry Plants in California by *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*. *Plant Disease*, (), PDIS-06-20-1297-RE-. doi:10.1094/PDIS-06-20-1297-RE
79. **Pastrana, A.M., Kirkpatrick, S.C., Kong, M., Broome, J.C. y Gordon, T.R (2017).** *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a New Forma Specialis Causing *Fusarium* Wilt of Blackberry. *Plant Disease*, 101(12), 2066–2072. doi:10.1094/pdis-03-17-0428-re
80. **Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S. y Fernández, F. J. (2007).** O-CAS, a Fast and Universal Method for Siderophore Detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
81. **Piechulla, B., Lemfack, M.C. y Kai, M. (2017).** Effects of Discrete Bioactive Microbial Volatiles on Plants and Fungi. *Plant, Cell & Environment*, 40(10), 2042–2067. doi:10.1111/pce.13011
82. **Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., Kim, E., Cho, H. J., Reynolds, J. M., Song, M. C., Park, S. R. y Yoon, Y. J. (2019).** A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and

- Biologics. *Frontiers in microbiology*, 10, 1404.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>
83. **Ploetz, R.C. (2015).** Management of *Fusarium* Wilt of Banana: A Review with Special Reference to Tropical Race 4. *Crop Protection*, 73, 7–15. doi:10.1016/j.cropro.2015.01.007
  84. **Probst, C.M., Ridgway, H.J., Jaspers, M.V. y Jones, E.E. (2019).** Pathogenicity of *Ilyonectria liriodendri* and *Dactylonectria macrodidyma* Propagules in Grapevines. *Eur J Plant Pathol.*, 154, 405–421. doi:10.1007/s10658-018-01664-0
  85. **Pyne, M.E., Narcross, L., y Martin, V.J.J. (2019).** Engineering Plant Secondary Metabolism in Microbial Systems. *Plant Physiology*, pp.01291.2018. doi:10.1104/pp.18.01291
  86. **Rajendran, N., y Marahiel, M. A. (1999).** Multifunctional Peptide Synthetases Required for Nonribosomal Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 195–220. doi:10.1016/b978-0-08-091283-7.00094-1
  87. **Ramírez Gil, J. G, Castañeda S., D. A y Morales O., J. G. (2014)** Estudios Etiológicos de la Marchitez del Aguacate en Antioquia, Colombia. *Rev. Ceres, Viçosa*, 61 (1): 50-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>.
  88. **Raza, W. y Shen, Q. (2020).** Volatile Organic Compounds Mediated Plant-Microbe Interactions in Soil. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 209–219. doi:10.1016/b978-0-12-818469-1.00018-3
  89. **Calderón, G. y Rzedowski, J. (2005).** Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán).
  90. **Risdian, C., Mozef, T. y Wink, J. (2019).** Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms*, 7(5):124. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050124>
  91. **R Core Team (2020).** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
  92. **RStudio Team (2020).** RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>

93. **Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., y Tribedi, P. (2015).** Microbial Siderophores and their Potential Applications: a Review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999. doi:10.1007/s11356-015-4294-0
94. **Sánchez-González, E. I., Gutiérrez-Soto, J. G., Olivares-Sáenz, E., Gutiérrez-Díez, A., Barrientos-Priego, A. F. y Ochoa-Ascencio, S. (2019).** Screening Progenies of Mexican Race Avocado Genotypes for Resistance to *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Hort science*, 54(5):809–813. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13552-18ç>
95. **Sánchez Fernández, R. E., Sánchez O., B. L., Sandoval E., Y. K. M., Ulloa B., A., Armendáriz G., B., García M., M. C. y Macías R., M. L. (2013).** Hongos endófitos: Fuente Potencial de Metabolitos Secundarios Bioactivos con Utilidad en Agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2):132-146. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43228901006>
96. **Santoyo, G., Hernández-Flores, B., Hernández Salmerón, J., Rojas Solís, D., Contreras-Pérez, M., Loeza-Lara, P. D., y Orozco-Mosqueda, M. del C. (2020).** Detection of the *phlD* and *hcnC* Genes in Antagonistic Siderophore Producing Bacteria Associated to *Rubus fruticosus* L. *Nova Scientia*, 12(24). <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2160>
97. **Sarhan, M.S., Hamza, M.A., Youssef, H.H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Nemr, R., Daanaa, H.A., Mourad, E.F., Morsi, A.T., Abdelfadeel, M.R., Abbas, M.T., Fayez, M., Ruppel, S., y Hegazi, N.A. (2019).** Culturomics of the Plant Prokaryotic Microbiome and the Dawn of Blant-based Culture Media - A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>
98. **Soltani, J. (2016).** Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus* : Recent Advances. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 275–292. doi:10.1016/b978-0-444-63505-1.00035-x
99. **Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L. y Garbeva, P. (2017).** Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02484

100. **Tam, E., Tsang, C.-C., Lau, S. y Woo, P. (2015).** Polyketides, Toxins and Pigments in *Penicillium marneffei*. *Toxins*, 7(11), 4421–4436. doi:10.3390/toxins7114421
101. **Teliz, D. y Mora, A. (2007)** El Aguacate y su Manejo Integrado, Ediciones Mundi Prensa, 2ª Edición, pp: 9-10, 174-175
102. **Tilocca, B., Cao, A., and Migheli, Q. (2020).** Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11, 41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>
103. **Tirranen, L.S. y Gitelson, I.I. (2006).** The Role of Volatile Metabolites in Microbial Communities of the LSS higher plant link. *Advances in Space Research*, 38(6), 1227–1232. doi:10.1016/j.asr.2006.02.038
104. **Thomas, G., Withall, D. y Birkett, M. (2020).** Harnessing Microbial Volatiles to Replace Pesticides and Fertilizers. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13645
105. **Thomidis, T. and Exadaktylou, E. (2012).** Effectiveness of Cyproconazole to Control *Armillaria* Root Rot of Apple, Walnut and Kiwifruit. *Crop Protection*, 36: 49–51. doi:10.1016/j.cropro.2012.02.003
106. **Uchoa S., P. K, de Lima, L. B; Pimenta, A, de Oliveira, M, Mafezoli, J. and Lima, M. A. (2017)** HPLC Quantification of Cytotoxic Compounds from *Aspergillus niger*. *Journal of Chemistry*, 2017:1-7 <https://doi.org/10.1155/2017/6969358>
107. **Ul Haq, I., Sarwar, M.K., Faraz, A. and Latif, M.Z. (2020)** Synthetic Chemicals: Major Component of Plant Disease Management. In: Ul Haq I., Ijaz S. (eds) *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches. Sustainability in Plant and Crop Protection*, vol 13. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_4)
108. **Vadamalai, G., Kong, L.L. and Iftikhar, Y. (2020)** Plant Genetics and Physiology in Disease Prognosis. In: Ul Haq I., Ijaz S. (eds) *Plant Disease Management Strategies for Sustainable Agriculture through Traditional and Modern Approaches. Sustainability in Plant and Crop Protection*, vol 13. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-35955-3_2)
109. **Visagie, C.M., Houbraeken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. y Samson, R.A. (2014).**

- Identification and Nomenclature of the Genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78:343–371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
110. **Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G. and Polizzi, G. (2012).** First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160:156. doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x
111. **Wallner, A., Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H., y Haas, H. (2009).** Ferricrocin, a Siderophore Involved in Intra- and Transcellular Iron Distribution in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4194–4196. doi:10.1128/aem.00479-09
112. **Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., & Yuan, Q. (2020).** Biosynthesis of Aromatic Polyketides in Microorganisms Using Type II Polyketide Synthases. *Microbial Cell Factories*, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-01367-4
113. **Wicaksono, W. A., Jones, E. E., Casonato, S., Monk, J. y Ridgway, H. J. (2018).** Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit, Using Endophytic Bacteria Recovered from a Medicinal Plant. *Biological Control*, 116:103–112. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.003
114. **Winkelmann, G. (2007).** Ecology of Siderophores with Special Reference to the Fungi. *BioMetals*, 20(3-4), 379–392. doi:10.1007/s10534-006-9076-1
115. **Wu, Q., Deering, R., Zhang, G., Wang, B., Li, X., Sun, J., Chen, J., Zhang, H., Rowley, D.C. y Wang, H. (2018).** Albisporachelin, a New Hydroxamate Type Siderophore from the Deep Ocean Sediment-Derived Actinomycete *Amycolatopsis albispora* WP1T. *Marine Drugs*, 16(6), 199. doi:10.3390/md16060199
116. **White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W. (1990).** Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. New York. Academic Press. pp. 315-322.
117. **Yaish, W. M. (2017).** Draft Genome Sequence of the Endophytic *Bacillus aryabhatai* Strain SQU-R12, Identified from *Phoenix dactylifera* L. Roots. *Genome Announc* 5:e00718-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00718-17>.

118. **Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L. y Chen, X. (2020).** Antifungal Peptides Produced by Actinomycetes and their Biological Activities against Plant Diseases. *The Journal of Antibiotics*, 73(5), 265–282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
119. **Zhang, Q., Yang, L., Zhang, J., Wu, M., Chen, W., Jiang, D. y Li, G. (2015).** Production of Anti-Fungal Volatiles by Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* and its Efficacy in Suppression of *Verticillium* Wilt of Cotton. *Plant and Soil*, 392(1), 101-114.
120. **Zhao, P., Xue, Y., Li, J., Li, X., Zu, X., Zhao, Z., C. Q. and Feng, S., W. G. (2019)** Non-Lipopeptide Fungi-Derived Peptide Antibiotics Developed Since 2000. *Biotechnology Letters*, 41 (6-7):651-673 <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02677-3>