



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

## **Actividad antagonista de cepas bacterianas contra hongos fitopatógenos de frutos y hortalizas**

### **TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

I.A.I. Diana Becerra Morales

**Dirigido por:**

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

C.U. Santiago de Querétaro, Querétaro, Diciembre de 2014.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química

PROGRAMA DE POSGRADO DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Actividad antagonista de cepas bacterianas contra hongos fitopatógenos de frutos y hortalizas**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Presenta:**

I.A.I. Diana Becerra Morales

**Dirigido por:**

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

**SINODALES**

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Presidente

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche  
Secretario

Dr. Miguel Ángel Ramos López  
Vocal

Dra. Ludmila Elisa Guzmán Pantoja  
Suplente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
Suplente

M. en S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro., México

Diciembre, 2014

## Resumen

Los hongos fitopatógenos ocasionan enfermedades que deterioran la calidad de frutas y hortalizas durante el cultivo y en poscosecha, provocando grandes pérdidas económicas. Los fungicidas son el principal método de control, sin embargo, su uso indiscriminado ha ocasionado contaminación ambiental y resistencia en estos patógenos, por lo que el uso de microorganismos antagonistas constituye una alternativa para el control de enfermedades fúngicas. En el presente trabajo, cuatro cepas bacterianas (D1, D2, D3 y D4) aisladas de un suelo orgánico identificadas como *Bacillus subtilis*, y cuatro cepas caracterizadas como Promotoras de Crecimiento Vegetal (*Bacillus mojavensis* QAH05, *Bacillus mojavensis* QAH11, *Bacillus* sp. y *B. subtilis*) fueron evaluadas en su potencial antagonístico *in vitro* contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium expansum* y *Fusarium stilboides*. Cada cepa presentó diferente actividad antagonística; *Bacillus* sp. mostró la mayor actividad inhibitoria contra *R. solani* (>90%); las cepas D1, D3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* tuvieron un porcentaje de inhibición mayor a 90 % contra *S. rolfsii*, mientras que las cepas D2 y D4 presentaron porcentajes de inhibición mayores a 70% contra *F. stilboides*. Ninguna cepa mostró inhibición considerable contra *P. expansum* en los ensayos (<25%). La caracterización bioquímica de los aislados demostró que todas las cepas producen sideróforos y poseen actividad hemolítica y emulsificante, propiedades relacionadas con la producción de lipopéptidos, sin embargo, no se detectó producción de HCN para ninguna de ellas. En los ensayos de inhibición de germinación de esporas de *F. stilboides* y *P. expansum* usando los sobrenadantes bacterianos, se encontró una disminución de la germinación de los conidios del primero por las cepas D3 y D4 (>60%), mientras *Bacillus* sp. inhibió más de 75% la germinación de esporas de *P. expansum*, además se pudo observar un efecto de los sobrenadantes sobre las esporas, reduciendo la turgencia y la viabilidad. En ensayos en frutos de pimiento infectados con *F. stilboildes*, la aplicación de las cepas no mostró ningún efecto en el desarrollo del hongo. En conclusión, las cepas más sobresalientes del estudio fueron D1, D3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* y podrían ser empleadas en campo para el control de los patógenos transmitidos por el suelo.

**Palabras clave:** Biocontrol, lipopéptidos, actividad hemolítica, 16 ARNr, *Bacillus*.

## Summary

The phytopathogenic fungi are causative agents of pre and postharvest diseases that impair the quality of various fruits and vegetables, causing large economic losses. Fungicides are the primary method of control; however, its indiscriminate use has caused pollution and resistance to these pathogens, so that the use of antagonistic microorganisms is an alternative for the control of fungal diseases. In this work, four strain bacteria (D1, D2, D3, D4), isolated from organic soil were identified as *Bacillus subtilis*, and four strains characterized as Plant Growth Promoters (*Bacillus mojavensis* QAH05, *Bacillus mojavensis* QAH11, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*), were evaluated in their antagonistic potential *in vitro* against *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium expansum* and *Fusarium stilboides*. The results show that each strain had different antagonistic activity; *Bacillus sp.* strain showed the highest inhibitory activity against *R. solani* (> 90%); strains D1, D3, *Bacillus subtilis* and *Bacillus sp.* had more than 90 % of inhibition against *S. rolfsii*, while D2 and D4 strains showed more than 70 % of inhibition against *F. stilboides*. No inhibition was observed for *P. expansum in vitro* assays (<25%). These isolates strains were characterized by biochemical antagonistic activities which show that all strains have emulsifying activity and hemolytic activity, properties related with the production of lipopeptides. Siderophore production in all isolates was also found, however, the production of HCN was not detected for any strain. In inhibition spore germination assay of *F. stilboides* and *P. expansum* using the bacterial supernatants, it was found a decrease of conidial germination of *F. stilboides* by D3 and D4 strains (> 60%); *Bacillus sp.* inhibited more than 75% germination of spores of *P. expansum*; Analysis by microscopy showed a reduction in the turgidity and viability of the spores by effect of supernatants. In assays in pepper fruits infected with *F. stilboildes*, the application of the strains showed any effect in the fungi development. Strains D1, D3, *Bacillus sp.* and *Bacillus subtilis* were the most salient for *in vitro* control of the tested pathogens and they could be used in the field to control soil-borne diseases

**Keywords:** Biocontrol, lipopeptides, hemolytic activity. 16 RNAr, *Bacillus*.

## DEDICATORIAS

A mi hija **Daniela**, porque Ella ha sido y seguirá siendo siempre mi motor día a día, porque sus sonrisas alegran siempre mis días, porque por Ella siempre quiero ser una mejor persona. Te amo.

A mi esposo **Daniel**, porque siempre me ha apoyado en todo tanto en lo personal como en lo profesional, gracias por tu paciencia y amor, y por seguir siempre a mi lado, en las buenas y en las malas, te amo.

A mis Padres **Guillermo** y **Marisol** a quienes respeto y admiro mucho, gracias por todo su apoyo durante toda mi vida, en especial en los momentos más difíciles, tanto a mí, como a mi pequeña familia, y por ser un ejemplo de superación constante para mí, Por todo eso y mucho más muchas Gracias !!!

A mi hermana, **Itzel**, porque aunque estemos lejos quiero que sepas que siempre contarás conmigo en las buenas y en las malas y agradezco todo tu apoyo siempre.

En especial, A mi Tía **Rosy**, por todo su apoyo y comprensión siempre, desde que tengo memoria, a mí y ahora a mi pequeña familia.

A mis suegros, **Francisco** y **Natalia**, por todo su apoyo durante nuestra estancia en estos más de dos años.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, por darme la fortaleza para seguir adelante, porque a pesar de todo Tú siempre estás presente.*

*A la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de realizar mis estudios de Posgrado durante estos dos años.*

*Al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC) de la Universidad Autónoma de Querétaro, por los conocimientos adquiridos durante mi estancia.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.*

*Al Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar por la paciencia otorgada y por compartir sus conocimientos durante estos más de dos años, que me han ayudado a crecer como profesional y sobre todo como persona. Gracias por brindarme su apoyo y amistad en todo este tiempo.*

*A mis sinodales Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche, Dr. Miguel Angel Ramos López, Dra. Ludmila Elisa Guzmán Pantoja, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, por su asesoría y apoyo en la realización de mi proyecto y mi estancia en el PROPAC.*

*A todos los profesores que me impartieron clases, por darme las herramientas necesarias para mi formación; a los trabajadores que laboran a diario para brindarnos un mejor servicio, en especial a Carmelita y Laurita. A mis compañeros y amigos de generación, en especial a Hilda, Silvia, Adri, David y Honorio.*

## ÍNDICE

Resumen	I
Summary	II
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Pérdidas en pre y poscosecha de productos hortofrutícolas	3
2.2 Fitopatógenos de importancia agrícola	4
2.2.1 <i>Rhizoctonia solani</i>	4
2.2.2 <i>Sclerotium rolfsii</i>	8
2.2.3 <i>Fusarium spp.</i>	11
2.2.4 <i>Penicillium expansum</i>	13
2.3 Control de enfermedades de las plantas	15
2.3.1 Control químico	16
2.3.2 Control biológico	17
2.4 Bacterias con potencial antagonista	18
2.5 Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol	20
2.5.1 Competencia por los nutrientes y/o el espacio	20
2.5.2 Interacción directa con el patógeno (producción de enzimas)	21
2.5.3 Producción de metabolitos secundarios implicados en el antagonismo	22
2.5.4 Lipopeptidos	23
2.5.5 Producción de sideróforos	25
2.5.6 Producción de HCN	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 General	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Sitio de estudio	29
4.2 Material biológico	29

4.3 Selección de aislados bacterianos	29
4.4 Pruebas de antagonismo <i>In vitro</i>	30
4.5 Identificación de las cepas seleccionadas	31
4.6 Naturaleza bioquímica de los sobrenadantes bacterianos por CCF	32
4.7 Determinación de otras características bioquímicas	33
4.7.1 Actividad emulsificante	33
4.7.2 Actividad hemolítica	33
4.7.3 Producción de HCN	34
4.7.4 Actividad quitinolítica	34
4.7.5 Producción de sideróforos	34
4.8 Capacidad de los sobrenadantes bacterianos en la inhibición de la germinación de esporas	35
4.8.1 Recolección de esporas fúngicas	35
4.8.2 Preparación de los sobrenadantes bacterianos	35
4.9 Bioensayos en fruto	36
4.9.1 Preparación de inóculos	36
4.9.2 Bioensayo en fruto	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Selección de cepas con potencial antagónico	38
5.2 Ensayos de antagonismo <i>In vitro</i>	39
5.3 Identificación de las cepas seleccionadas	45
5.4 Naturaleza bioquímica de los sobrenadantes bacterianos por CCF	49
5.5 Determinación de otros metabolitos	51
5.5.1 Actividad hemolítica	51
5.5.2 Actividad emulsificante del sobrenadante	53
5.5.3 Actividad quitinolítica	54
5.5.4 Producción de ácido cianhídrico (HCN)	55
5.5.5 Determinación de sideróforos	56
5.6 Capacidad de los sobrenadantes bacterianos en la inhibición de la germinación de esporas	60
5.7 Bioensayos en frutos	64
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA	69

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Microorganismos antagonistas utilizados en el control de enfermedades fúngicas poscosecha	19
2. Mezcla de reacción para PCR por muestra de ADN	31
3. Escala empleada para la descripción de la germinación de esporas fúngicas	36
4. Descripción morfológica de los aislados bacterianos (D1, D2, D3 y D4)	38
5. Actividad antagonista de cepas bacterianas en el control biológico de hongos fitopatógenos	41
6. Concentración de ADN obtenido por purificación del gel del PCR	46
7. Porcentajes de identidad de las cepas identificadas mediante la secuenciación del gen 16 s ARNr	47
8. Medición de halos de hemólisis, actividad emulsificante, actividad quitinolítica y producción de HCN.	51
9. Ensayo para la producción de sideróforos en medio SD-CAS	58
10. Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de <i>F. stilboides</i>	60
11. Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de <i>P. expansum</i>	62
12. Daños al epicarpio y pedúnculo del pimiento por <i>F. stilboides</i>	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Morfología de <i>R. solani</i> .	5
2. Ciclo de vida de <i>R. solani</i> .	6
3. Esclerocios de <i>R. solani</i> en papa	7
4. Podredumbre de cuello causada por <i>R. solani</i> en plántulas de tomate	8
5. Morfología de <i>S. rolfsii</i>	9
6. Infección por <i>S. rolfsii</i>	11
7. Ciclo infectivo de <i>Fusarium</i> spp. en papa	12
8. <i>Penicillium expansum</i>	14
9. Estructuras representativas de tres familias de lipopéptidos: a) Iturina; b) fengycina; c) surfactina	24
10. Estructuras de sideróforos producidos por <i>Bacillus</i> sp.	25
11. Ensayos preliminares de antagonismo en placa de APD con CN para <i>F. stilboides</i>	30
12. Condiciones para la amplificación del gen 16S ARNr, por PCR	32
13. Crecimiento de <i>F. stilboides</i> en medio de cultivo con sobrenadante bacteriano.	40
14. Crecimiento de <i>P. expansum</i> en medio de cultivo con las cepas antagonistas	41
15. Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra <i>R. solani</i> , después de 3 días de incubación.	42
16. Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra <i>S. rolfsii</i> , después de 3 días de incubación.	43
17. Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra <i>F. stilboides</i> , después de 7 días de incubación	43
18. Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra <i>P. expansum</i> , después de 7 días de incubación	44
19. Gel de electroforesis con los productos de PCR purificados	46
20. Filogenia de los aislados bacterianos de estudio con cepas de referencia	48
21. Placa de CCF cargada con extractos de sobrenadantes bacterianos y revelada	

con ninhidrina: Recuadro azul y amarillo indica la revelación de compuestos con actividad antifúngica; recuadro rojo indica presencia de compuestos del medio de cultivo	50
22. Actividad hemolítica del aislado D3, <i>Bacillus</i> sp. y <i>B. subtilis</i> .	52
23. Medición de la actividad emulsificante del sobrenadante de la cepa <i>B. mojavensis</i> QAH11	53
24. Ensayo en placas de agar quitina coloidal	55
25. Ensayo para la producción de sideróforos en placas de agar SD-CAS: A) Cepas <i>B. mojavensis</i> QAH11, B) cepa D2, c) cepa <i>B. subtilis</i> , D) cepa D1, E) Cepa <i>Bacillus</i> sp. F) Cepas <i>B. mojavensis</i> QAH05	57
26. Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de <i>F. stilboides</i> a) Control <i>F. stilboides</i> , b) tratamiento con <i>Bacillus</i> sp. c) tratamiento con D1 d) Tratamiento con <i>B. subtilis</i>	63
27. Incidencia de <i>F. stilboides</i> en epicarpio y pedúnculo	64

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de postcosecha ocasionan de 10 a 30% de pérdidas de la producción total de los cultivos, de las cuales se estima que del 10 al 50% son causadas por hongos fitopatógenos (Tripathi y col., 2008).

*Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* son de los principales hongos patógenos del ahogamiento (*damping-off*) y podredumbre de las plántulas de papa, calabaza (Huang y col, 2012; Osemwegie, y col, 2010, Kwon y col., 2009), trigo (Zarrin y col., 2008), y tomate (Berta y col., 2005; De Curtis y col., 2010; Mukherjee y col., 1997). Sin embargo, estos hongos también pueden ocasionar daños en frutas y hortalizas en poscosecha. Otro patógeno que se presenta en el campo y en poscosecha es *Fusarium stilboides*, que afecta principalmente al pedúnculo del pimiento. Se manifiesta por el desarrollo de un micelio blanquecino, que se extiende con el paso del tiempo y culmina con la necrosis parcial o total del tejido (Sandoval y col., 2011). Uno de los principales hongos causantes de pérdidas poscosecha en frutos es *Penicillium expansum* que causa pudrición azul en manzana, provocando frutos blandos, acuosos y en general de color marrón claro (Sánchez y col., 2008).

El empleo de fungicidas es el principal método de control de estos patógenos, sin embargo, su uso indiscriminado ocasiona un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por ello, el uso de microorganismos antagonistas constituye una alternativa sustentable contra diversas enfermedades que afectan al tallo, raíz, plántula y fruto (Wisniewski y Wilson, 1992). El potencial que tiene el género *Bacillus* para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana, se ha utilizado en el control biológico de fitopatógenos (Zhao y col., 2013).

La actividad antagonista de *Bacillus* spp. contra diversos patógenos se ha asociado a la producción de diversas moléculas responsables como fosfolípidos, bacteriocinas, compuestos de naturaleza lipopéptica con actividad surfactante, cuya principal característica es la actividad emulsificante, algunos

compuestos volátiles, enzimas líticas y sideróforos (Pathma, y col., 2011). Los antibióticos peptídicos, que incluyen los lipopéptidos, representan la clase predominante de moléculas con potencial antagonista. Sin embargo, es probable que las cepas más eficaces de control biológico actúen a través de múltiples mecanismos (Kumar y col., 2012).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar cepas bacterianas provenientes de la rizósfera de un cultivo orgánico de zarzamora y evaluar su potencial antagónico *In vitro* contra *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. stilboides* y *P. expansum*. Así mismo, determinar algunas actividades bioquímicas relacionadas con la capacidad antagónica y evaluar la capacidad de los sobrenadantes bacterianos para inhibir la germinación de las esporas de estos patógenos.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Pérdidas en pre y poscosecha de productos hortofrutícolas

Las frutas y hortalizas frescas son los productos hortofrutícolas más susceptibles al deterioro antes y después de la cosecha. Las pérdidas se pueden atribuir a diversos factores ambientales como la temperatura, humedad relativa, velocidad del aire y la composición atmosférica (concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono) que contribuye a la descomposición de los productos frescos, así como la influencia de factores físicos, fisiológicos y biológicos como lesiones mecánicas, la tasa de respiración de los frutos, la producción de etileno, estrés hídrico, la brotación y enraizamiento, desórdenes fisiológicos y la contaminación por microorganismos patógenos (Kader y col., 2002).

Se estima que a nivel mundial las pérdidas en poscosecha de frutas y hortalizas causadas por microorganismos son del 10 al 30% de la producción total, y en algunos países en vías de desarrollo las pérdidas son superiores a 30% (Kader, 2002; Agrios, 2005).

Específicamente las pérdidas causadas por fitopatógenos son del 10 al 50% (Tripathi y col., 2008), ocasionando mermas de 40% en mangos (Singh, 1960), 30% en los cítricos, 30% en pimiento (Sandoval y col., 2011), 50% en la piña, 7 a 12% en las uvas, 28-42% en fresa (Kader y col., 1991). Eckert y col. (1983) estiman que de 100,000 especies de hongos, menos de 10% son patógenos de plantas y más de 100 especies de hongos son responsables de la mayoría de enfermedades de poscosecha.

Las frutas, debido a su bajo pH, alto contenido de humedad y la composición de nutrientes son muy susceptibles al ataque de hongos fitopatógenos (Phillips, 1984), ocasionando pérdidas de hasta 40% en mangos (Singh, 1960), 30% en los cítricos, 30% en pimiento (Sandoval y col., 2011), 50% en la piña, 7 a 12% en las uvas, 28-42% en fresa (Kader y col., 1991).

La mayoría de los géneros de hongos que atacan frutas y hortalizas después de la cosecha solamente invaden los tejidos a través de heridas (Wills y

col., 1981). Las lesiones que tienen lugar en la manipulación del producto proporcionan innumerables vías de entrada a estos patógenos si bien algunos de ellos son capaces de invadir productos sanos. Los frutos inmaduros son normalmente más resistentes al ataque de patógenos y las defensas se debilitan con la maduración (Dennis, 1985).

## **2.2 Fitopatógenos de importancia agrícola**

Algunos de los hongos fitopatógenos más importantes por su incidencia, severidad y pérdidas económicas que ocasionan en pre y poscosecha en cultivos de mayor importancia agrícola pertenecen a las especies de *R. solani*, *S. rolfsii* y *Fusarium stilboides* cuyos síntomas son marchitez y podredumbres en plántula y fruto (Divya y col., 2013; Rodríguez, 2001) y *P. expansum* que causa pudrición azul en frutos (Sánchez y col., 2008). Estos patógenos se describen con mayor detalle a continuación:

### **2.2.1 *Rhizoctonia solani***

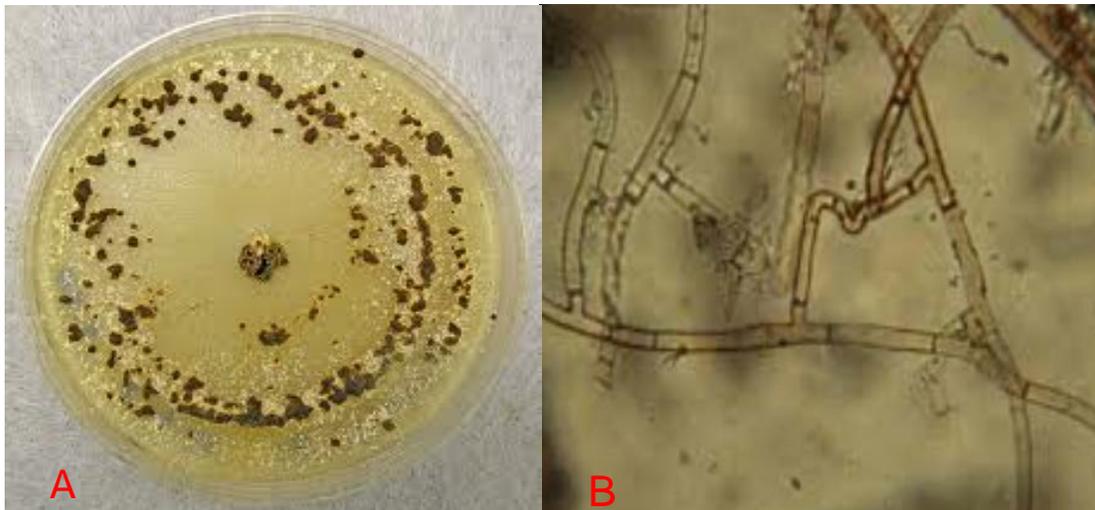
*Rhizoctonia solani* Kühn es uno de los patógenos transmitidos por el suelo (Subash, 2013) más importantes que causan diversas enfermedades como pudrición de las semillas, raíz, tallo y cuello de las plántulas infectadas hasta pudriciones en los frutos (Budge y col., 2009; González, 2002; Agrios, 2005) de una gran variedad de cultivos como tomate (De Curtis y col., 2012), papa (Brewer y col., 2005), col (Budge y col., 2009) y chile (Subash, 2013). Es un hongo del suelo saprófito que puede sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales, y afecta a una amplia variedad de especies de cultivos a nivel mundial (Ogoshi, 1987). *R. solani* sobrevive en el suelo en forma de esclerocios, como hifas de paredes gruesas en el suelo y en los tubérculos o en restos vegetales (Papavizas y col., 1975).

En México, 75% de los productores de chile indican que el ahogamiento o "*damping-off*" causado por un conjunto de hongos asociados, entre ellos *R. solani* es la enfermedad más importante durante la fase de germinación de la plántula y está presente en 88 de cada 100 almácigos causando pérdidas de 1 a 15%

(Subash, 2013).

Las características morfológicas más típicas de *R. solani* son micelio de color marrón o castaño oscuro (Figura 1a), sus ramificaciones en ángulo recto, constricciones en el punto de origen de la ramificación de la hifa y formación de un septo tipo doliporo en la rama cerca de su origen (Figura 1b) (Ogoshi, 1987).

Las hifas producen esclerocios en forma de masas miceliales, color blanco, que luego se oscurecen hasta llegar a distintos tonos de castaño, irregulares, grandes de 1 a 8 mm visibles a simple vista, variando las condiciones en que se produce, de consistencia dura en cortes microscópicos muestran una constitución de hifas entrelazadas, de diámetro variable, cortas, elípticas, semejantes a diminutos barriles dispuestos en cadena (Sarasola y col., 1975). Los esclerocios germinan bajo condiciones de humedad favorable y temperaturas relativamente frías (entre 16 y 23°C) infectando los brotes y tallos de nuevas plantas (Calderón, 1978).



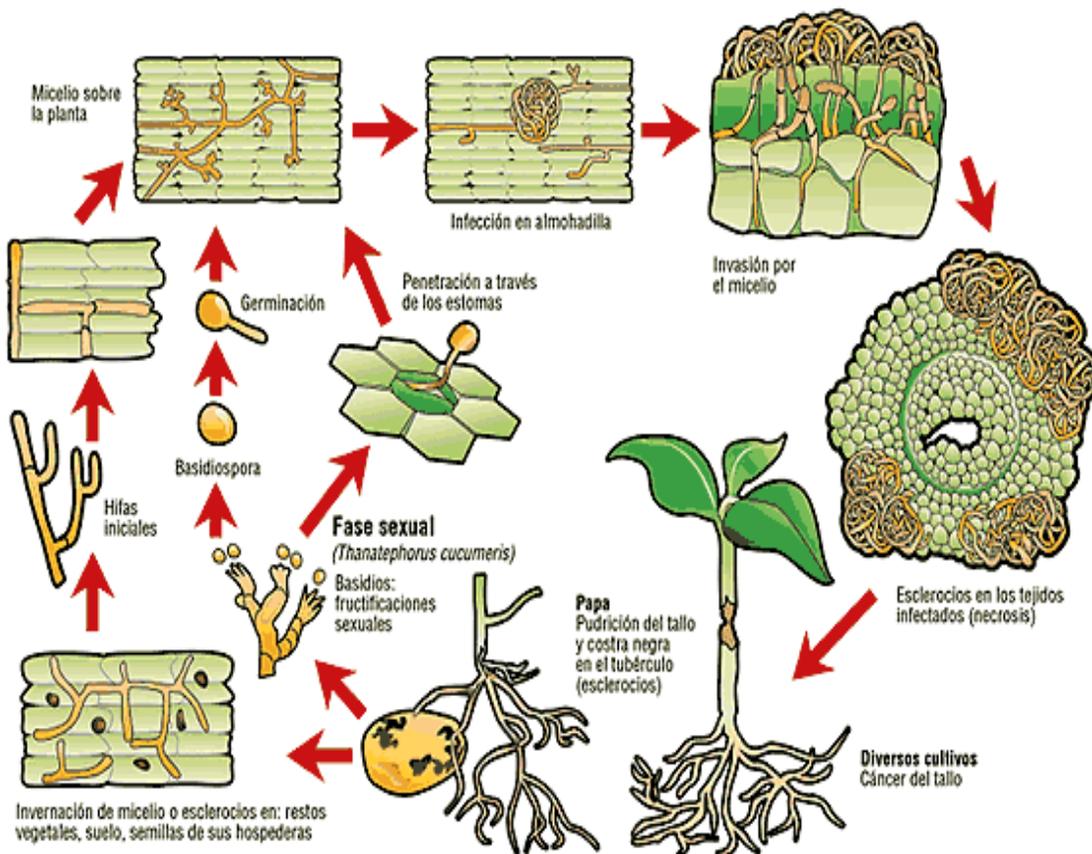
**Figura 1.** Morfología de *R. solani*.

a) Formación de esclerocios en el micelio de *R. solani*; b) Vista bajo el microscopio de las hifas de *R. solani*

Macroscópicamente las colonias típicas de este microorganismo se caracterizan por ser blancas, algodonosas, planas, sin embargo, dependiendo

de la especie, puede presentarse tonalidades cremas amarillentas (Barnett y col., 1973).

El ciclo de vida de *R. solani* incluye periodos parasíticos y saprofiticos así como ciclos de reproducción sexual y asexual (Figura 2). En el cultivo de papa, *R. solani* permanece de una cosecha a otra en forma de esclerocios (Figura 3) y de micelio en residuos vegetales que se encuentran en el suelo. Al germinar los esclerocios producen hifas que luego de entrar en contacto con la planta, invaden los tejidos principalmente de raíz y tallos, afectando los tejidos jóvenes de brotes y estolones (García y col., 2002).

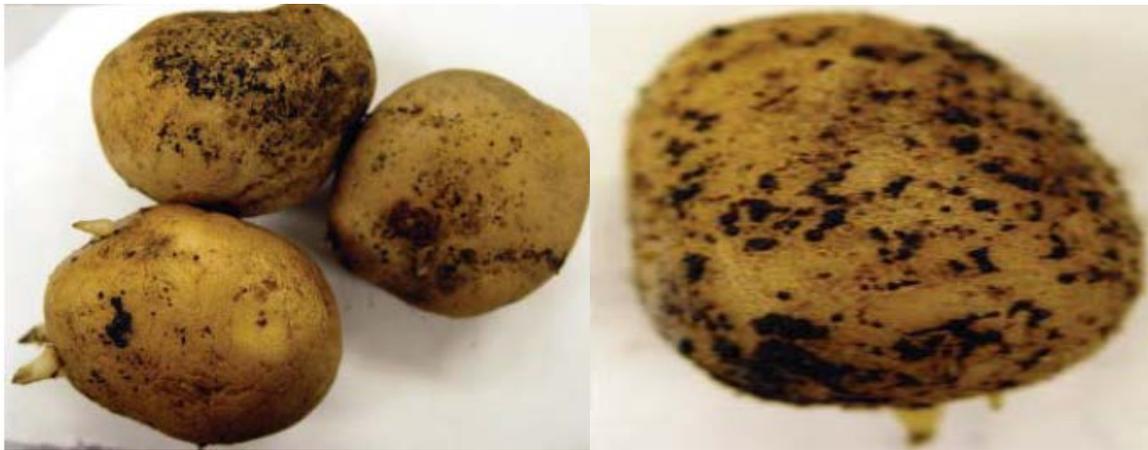


**Figura 2.** Ciclo de vida de *R. solani*.

Algunos de los síntomas que se observan durante el inicio de la enfermedad incluyen lesiones necróticas de color marrón en la base de brotes, podredumbre de la corona, pudrición de la raíz, o el cancro del tallo que a menudo conduce al amarillamiento de plántulas, hojas apicales arrugadas (Carling, 1989),

marchitez y pérdida de las siembras, en los casos graves (Yao y col., 2002).

*R. solani* puede infectar los tejidos subyacentes, ya sea a través de la penetración mecánica por medio de la fuerza o mediante la utilización de aberturas y heridas naturales (Parmeter, 1970). El hongo también puede utilizar las aberturas como estomas en los tallos, cotiledones y hojas o lenticelas en tubérculos de patata como portales de entrada a los tejidos de las plantas. La hifa crece cada vez más en la abertura y llena la cavidad subyacente antes de penetrar en los tejidos nuevos.



**Figura 3.** Esclerocios de *R. solani* en papa

En el cultivo de tomate, *R. solani* produce el cancro del cuello. Ataca en plántula (Figura 4) y en estadios más avanzados de desarrollo puede manifestarse como podredumbre de las raíces, o canchros del tallo a nivel del suelo, causando marchitamiento, debilitamiento, detención del crecimiento y muerte de la planta. Los frutos en contacto con el suelo o cercanos al mismo, pueden desarrollar una podredumbre parda con bandas concéntricas más claras y más oscuras alternadas (Arias y col, 2008).



**Figura 4.** Podredumbre de cuello causada por *R. solani* en plántulas de tomate

### **2.2.2 *Sclerotium rolfsii***

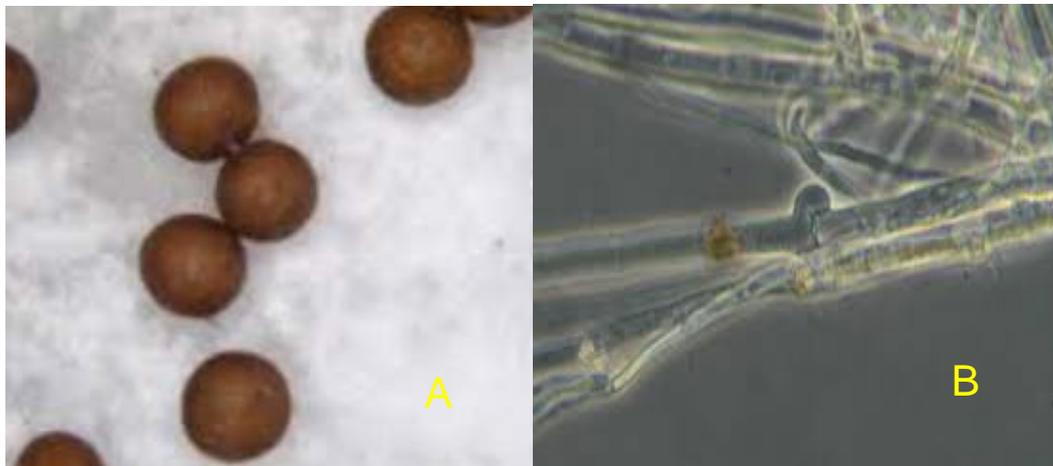
*Sclerotium rolfsii* es considerado como el principal agente causal de la podredumbre del tallo y cuello del frijol, judías y soya debido a su amplia distribución, elevada incidencia y predominio de estas plantas (Singh y col. 1974). Es causante de pudriciones en melón (*Cucumis melo* L.) provocando podredumbre de las plántulas, el cancro del tallo, roya de la corona, y la pudrición de la raíz, corona, bulbo, tubérculo y fruta (Kwon y col., 2009). El valor de las pérdidas económicas y de rendimiento en los cultivos afectados por *S. rolfsii* no se ha cuantificado con precisión, aunque se estima que es elevado. Puede ocasionar desde daños poco severos hasta la pérdida total de las cosechas dependiendo del huésped, las condiciones ambientales y el manejo del cultivo. No obstante, se ha señalado a *S. rolfsii* como responsable del 5% de las pérdidas totales de las cosechas en el sur de EE.UU. (Remesal, 2012).

Los síntomas de infección por *S. rolfsii* se pueden presentar como lesiones acuosas en la base de los tallos a nivel de la superficie del suelo, después se extiende rápidamente y estrangula al tallo; en las plantas herbáceas se marchitan y se caen. Este hongo es capaz de infectar cualquier órgano del huésped incluyendo hojas, flores y frutos, siempre que éstos entren en contacto con el

suelo infestado y que las condiciones ambientales sean favorables (Aycock, 1966).

*S. rolfsii* es un hongo que en condiciones favorables produce abundante micelio en los tejidos infectados. Las hifas son relativamente grandes, de 5 a 9  $\mu$  de diámetro. Son hialinas de paredes delgadas y con aversiones a nivel de las septas. El micelio al crecer tiende a formar rizomorfos que ya crecidos se expanden en forma de abanico, teniendo una coloración blanca. Una vez infectados los tejidos, la masa de micelio puede aparecer de dos a 10 días. La penetración ocurre cuando el patógeno produce una enzima que destruye las paredes de las células externas del hospedero, resultando una destrucción de los tejidos y en la formación de micelio y esclerocios (Punja y col., 1985).

Aproximadamente después de siete días de la infección, aparecen los esclerocios que se forman a partir del micelio cuando los rizomorfos se entrecruzan y empiezan a formar cuerpos esféricos inicialmente blancos y después toman una coloración café claro u oscura (Figura 5). Estos esclerocios miden en promedio de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, pero algunos pueden llegar a 8 ó 10 mm de diámetro (Remesal, 2012).



**Figura 5.** Morfología de *S. rolfsii*

a) Formación de esclerocios; b) Hifas de *S. rolfsii*.

El hongo sobrevive en forma de segmentos de hifas o esclerocios en plantas infectadas o residuos de plantas en el suelo, no produce ningún tipo de espora asexual. Es capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones ambientales, el pH óptimo de crecimiento del micelio es de 3.0 a 5.0 y la germinación de los esclerocios ocurre en valores de pH de 2.0 a 5.0. La germinación se inhibe a pH mayor de 7.0 y el máximo crecimiento del micelio ocurre entre 25 y 35 °C con muy poco desarrollo o ninguno a 10° o 40° C. El micelio muere a 0 °C, y los esclerocios sobreviven a temperaturas de -10° C. El crecimiento del micelio y la germinación de los esclerocios ocurren rápidamente con luz continua, pero también puede desarrollarse en obscuridad completa si las condiciones son favorables (Punja, 1985).

La infección puede producirse en cualquier órgano de la planta siempre que las condiciones ambientales sean favorables, ya que no existe especialización del hongo por los diferentes órganos vegetales ya sean raíces, base de tallos, ramas, hojas, flores o frutos (Aycock, 1966). Cuando los tallos de las plantas herbáceas se deterioran aparecen masas de micelio blanco en el sitio de la lesión, la cual puede extenderse en el suelo circundante al tallo. Poco después que aparece la masa de micelio se empiezan a formar cuerpos redondeados de color blanco que posteriormente se tornan lisos y de color café claro, café oscuro o negro llamados esclerocios, estos son las estructuras de resistencia que le sirven para sobrevivir en condiciones adversas (Punja, 1985). Los esclerocios se forman en los tejidos enfermos cerca de la superficie del suelo. En bulbos y los tubérculos los tejidos se vuelven blandos y se colapsan, formándose micelio en las áreas podridas (Aycock, 1966).

El progreso de la infección en el sistema radical de las plantas susceptibles es especialmente rápido cuando se trata de tejidos suculentos como en zanahoria o remolacha (Figura 6). En estos casos la enfermedad siempre comienza por la parte alta de la raíz y resulta en una pudrición blanda de todo el órgano con abundante micelio blanco en su superficie, que confiere una textura aterciopelada, y esclerocios en formación o ya maduros (Aparicio, 2010).



**Figura 6.** Infección por *S. rolfsii*

A) Esclerocios de *S. rolfsii* en suelo; B) Micelio de *S. rolfsii* en cuello y raíz

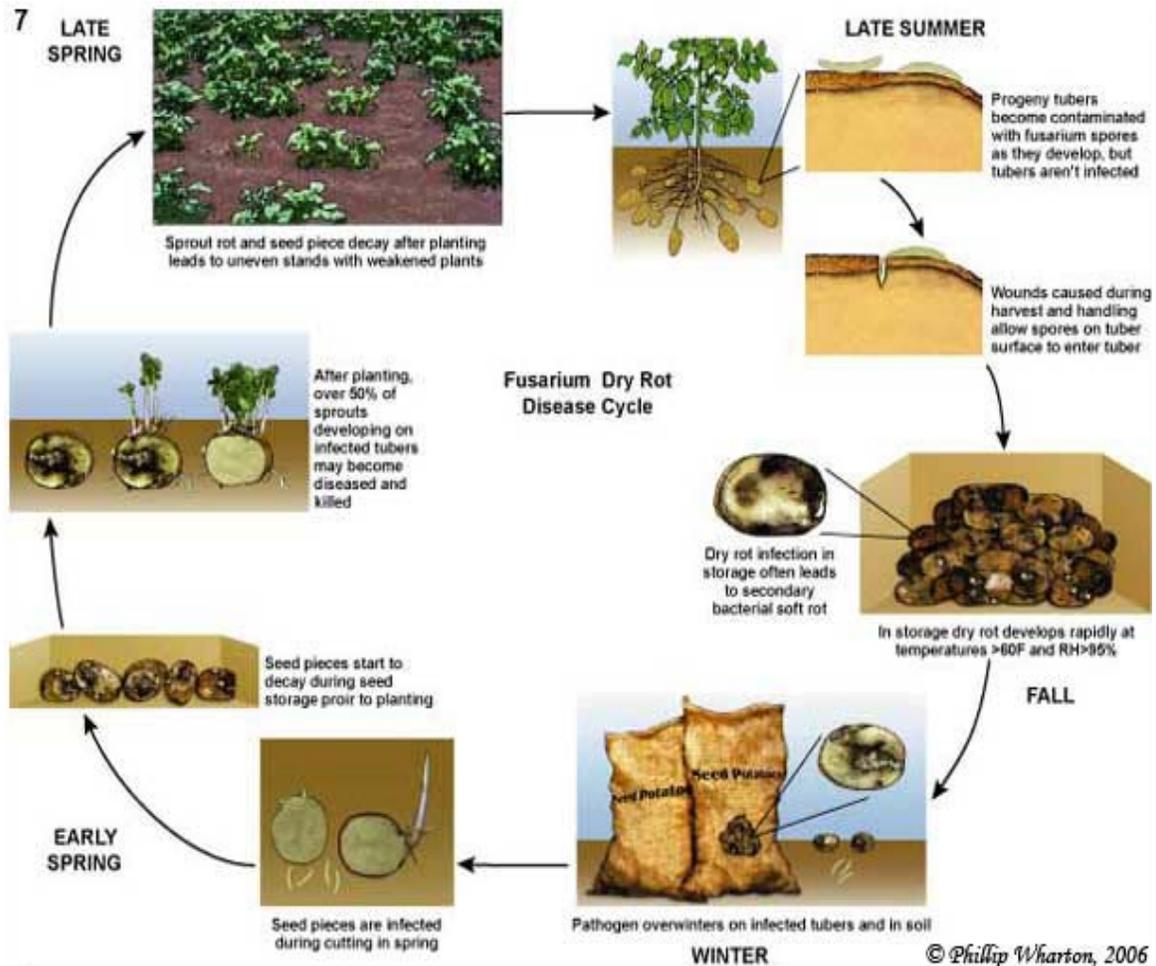
### 2.2.3 *Fusarium spp.*

*Fusarium spp.* es un patógeno causante del marchitamiento vascular principalmente en vegetales y flores. Presenta especies fitopatógenas como, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* y *F. stilboides* (Agrios, 1998).

*Fusarium spp.*, se caracteriza morfológicamente por producir colonias de crecimiento rápido. El micelio es generalmente abundante, algodonoso y con coloración variable de blanco a rosado durazno. Algunas especies presentan usualmente un tinte de color intenso al dorso de la colonia (Arias y Jerez, 2008). Puede presentar tres clases de esporas: microconidias, macroconidias y clamidiosporas (Garcés De Granada y col., 1999).

*Fusarium spp.* penetra la epidermis de las raíces, la corteza y endodermos, finalmente entra a los vasos del xilema, colonizando el sistema vascular (Figura 7), en el cual el fitopatógeno produce compuestos complejos que interfieren con la capacidad de la planta al trasladar la toma de agua y nutrientes; ocasionando la degradación de tejidos y la muerte. Las hifas del hongo penetran directamente o a través de heridas hechas en forma mecánica o por nematodos, insectos o miriápodos, la epidermis de las raíces, pasa a la corteza y a los endodermos y entran a los vasos del xilema invadiéndolos cuando están maduros (Baker, 1978).

El patógeno coloniza el xilema de las plantas por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de las microconidias lo cual contribuye a la colonización no uniforme, generalmente un lado de la planta; el hongo deteriora los tejidos por medio de enzimas que degradan la pared celular como xilanasas entre otras y se comienzan a formar cavidades en las hojas y paredes lignificadas del tallo (Ochoa, 1996).



**Figura 7.** Ciclo infeccioso de *Fusarium* spp. en papa

Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve hacia el tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema y los invade cuando están maduros. El patógeno coloniza por crecimiento del micelio o por medio de transporte pasivo de microconidias (Baayen, 1988). La colonización del tallo es

unilateral debido a que la diseminación lateral y radial del hongo parece inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales (Baayen, 1988). *F. oxysporum* produce un micelio en forma de red en la superficie de la punta de la raíz de la que desarrollan hifas de penetración. Estas hifas penetran paredes epidérmicas directamente y posteriormente colonizan el tejido por el crecimiento intra e intercelular (Mengen, 1996).

Los síntomas de la enfermedad aparecen de forma unilateral causando marchitamiento vascular; pudrición de raíz, corona, tallo, fruto, y *damping-off*. En semillas, se acompaña de un amarillamiento parcial de las hojas, a veces se observa una mitad clorótica y la otra verde normal y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma; a su vez se observa enanismo de éstos y disminución en el crecimiento de la planta, los síntomas avanzan lentamente por la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte (Arias y Jerez, 2008). La mayoría de los casos del marchitamiento vascular debidos a este género, son producidos por especies de *F. oxysporum*; diferentes huéspedes son atacados por diferentes formas especiales y/o especies de este hongo. Sin embargo, *F. stilboides* puede producir daños en frutos como el pimiento (Sandoval y col., 2011), que se manifiesta por el desarrollo de un micelio blanquecino, que se extiende con el paso del tiempo y culmina con la necrosis parcial o total del tejido. En 2008 este problema se manifestó en alrededor de 30 % de los embarques para exportación, lo que se tradujo en pérdidas económicas significativas para las empresas.

#### **2.2.4 *Penicillium expansum***

El género *Penicillium* se coloca en la división *Deutoromycota* si los conidióforos y conidios son los únicos orgánulos reproductores presentes. En la Figura 8 se muestran conidióforos y conidios del *P. expansum*, pero se ubican con los ascomicetos cuando se forman cleistotecias con ascosporas (James, 2005).



**Figura 8.** *Penicillium expansum*

A) Micelio de *P. expansum* B) Conidios y conidióforos de *P. expansum*

*P. expansum* causa la pudrición del moho azul en el frutos de manzana y pera, principalmente, y produce considerables pérdidas poscosecha durante la cosecha, procesamiento, empaque, transporte y almacenamiento de la mercancía (Cao y col., 2005). La pudrición azul es característica por provocar podredumbre blanda, acuosa y de color marrón claro en los frutos infectados. En general comienza a desarrollarse a partir de una herida sobre la que aparece el hongo, primero de color blanco, recubriéndose luego de la esporulación azul característica que le da el nombre a la enfermedad (Carrasco, 2013). Más del 80 % de pérdidas durante el almacenamiento de la manzana son atribuidas principalmente a daños producidos por este hongo, que es capaz de desarrollarse por debajo de 0 °C (Sánchez y col., 2008).

*P. expansum* infecta una fruta sólo cuando hay heridas superficiales producidas durante la cosecha, empaque y procesamiento de la fruta, a través de los cuales los conidios son capaces de penetrar. Los conidios se pueden encontrar distribuidos desde el suelo, los desechos putrefactos, cortezas de árboles, hasta en cámaras de refrigeración debido a que el hongo es capaz de sobrevivir a bajas temperaturas. Los conidios se pueden aislar desde el aire hasta de las paredes, así como en el agua y soluciones fungicidas en donde se han sumergido las manzanas y las frutas en antes del procesamiento y

envasado. Además, también es capaz de causar infección durante cualquier estación del año.

Si el hongo ha colonizado la fruta con micelio, la formación de conidióforos se produce en la superficie o bajo la superficie de las hifas. Los conidios tienen un color similar "al aceite de olivo" y se difunden por las corrientes de viento. *P. expansum* normalmente infecta sólo fruta madura o demasiado madura (Pitt y col., 1985). El patógeno es incapaz de atravesar la cutícula de la fruta. La penetración se da a través de heridas o aberturas naturales. Sobre los frutos infectados se producen numerosas esporas, que aparecerán inicialmente como micelio blanco en la superficie de la fruta infectada y posteriormente tienden a cambiar de color a azul o tonalidades de color verde. Los frutos maduros son más susceptibles a la infección con *P. expansum*.

*P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*, utilizan la acidificación del tejido para apoyar su patogenicidad a través de la secreción de ácidos orgánicos (Prusky y Yakoby, 2003). La alcalinización del sitio de la infección por hongos se logra mediante la secreción activa de amoníaco, que es en gran parte el producto de la actividad de la proteasa y desaminación de los aminoácidos (Prusky, 2008).

### **2.3 Control de enfermedades de las plantas**

El control de enfermedades poscosecha comienza en el campo ya que un buen programa sanitario disminuye la fuente de inóculo y los riesgos de infecciones luego de la cosecha (Blanco, 2012). Los fungicidas son el principal medio de control de enfermedades de poscosecha (Eckert y Ogawa, 1985). Sin embargo, varios fungicidas han sido prohibidos por la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (EPA). o retirados del mercado por la residualidad de estos productos en el agua, suelo y las plantas, además del deterioro de la salud humana y del ambiente y la resistencia por parte de los patógenos a estos productos.

### 2.3.1 Control químico

Algunas frutas y verduras son tratadas con fungicidas después de ser cosechadas para reducir la incidencia de enfermedades poscosecha, y por lo tanto, las personas que las consumen, tienen una mayor probabilidad de exposición directa a otros productos que fueron aplicados en el campo (Eckert y Ogawa, 1985)..

El fungicida prochloraz es utilizado para el control de antracnosis en poscosecha causada por especies de *Colletotrichum* spp. en papaya; sin embargo, su recomendación para el control de esta enfermedad está limitada debido a que no tiene registro de tolerancia por parte de la EPA y además éste fungicida está clasificado como posible cancerígeno en humanos (Santamaría y col., 2011). Fungicidas como fludioxonil y fenhexamid están registrados en los EE.UU. para aplicación en poscosecha para controlar la descomposición de los melocotones y las nectarinas (Karabulut y col., 2010).

Actualmente, el tiabendazol, que pertenece a la clase química de los benzimidazoles, es el principal fungicida utilizado para el control de hongos poscosecha como *Penicillium* spp. en manzana y pera (Errampalli y col., 2006). El uso intensivo de la tiabendazol, junto con el agente difenilamina (DPA), ha dado lugar al desarrollo de patógenos resistentes en el embalaje (Rosenberger y col., 1985).

Los benzimidazoles se convierten en metil benzimidazol carbamato (MBC, carbendazim) en la superficie de las plantas, el cual interfiere en la división nuclear de los hongos. El género *Fusarium* es sensible a benomyl; sin embargo, es probable que este fungicida sea un agente mutagénico, que pudiera incrementar el grado de resistencia de los patógenos ante su efecto (Agrios, 2005).

Los fungicidas son cada vez menos eficaces debido al desarrollo de resistencia a patógenos, aunado a esto existen los posibles riesgos asociados al uso de productos químicos (Wilson y col., 1994).

### **2.3.2 Control biológico**

Es evidente que existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos y eficaces métodos de control de enfermedades de poscosecha que son percibidos como seguros por el público y representan un riesgo menor para la salud humana y el medio ambiente en comparación con los métodos de control químico.

La resistencia de los patógenos fúngicos a muchos productos químicos de control ha hecho hincapié en la necesidad de desarrollar estrategias de control alternativas para minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia y la dependencia de los productos químicos para el manejo de enfermedades (Romero y col., 2007).

En este escenario, el control biológico ha recibido mayor atención debido a que representa una alternativa viable a los fungicidas químicos de hoy en día. Es una tecnología emergente para controlar las enfermedades poscosecha considerada de bajo impacto sobre el medio ambiente (Wilson y Wisniewski, 1989; Wilson y col., 1991).

Para seleccionar a un microorganismo como agente de control biológico, hay que tener en cuenta muchas características, como son (Wisniewski y Wilson, 1992):

- i. Estabilidad genética
- ii. Efectividad a bajas concentraciones
- iii. Poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales (incluidas las bajas temperaturas y el almacenamiento bajo condiciones controladas)
- iv. Efectivo para un gran número de patógenos y para diversas frutas y vegetales
- v. Capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos
- vi. Formulación estable en el tiempo
- vii. Facilidad de aplicación
- viii. No productor de metabolitos secundarios que sean tóxicos para personas y animales
- ix. Resistencia a los plaguicidas

- x. Compatibilidad con otros tratamientos químicos, biológicos y físicos
- xi. No ser patógeno sobre el huésped

En el caso de poscosecha, el antagonista deberá sobrevivir y conservar su efectividad después de exponerlo a tratamientos de poscosecha y bajo condiciones de almacenamiento, tanto de humedad relativa, como a bajas temperaturas, y a diversas relaciones de Oxígeno/CO<sub>2</sub> (Janisiewicz, 1991).

## 2.4 Bacterias con potencial antagonista

Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de ejercer un efecto de control sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y hortalizas (Wisniewski y Wilson, 1991). La superficie del fruto o fructoplano es el mejor lugar para el aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad en el fruto (Janisiewicz y Korsten, 2002). Especies de *Bacillus* están involucradas en el control de enfermedades de las plantas (Cuadro 1). El mecanismo de antibiosis ha demostrado ser uno de los más importantes (Thomashow y Weller, 1996).

Se han utilizado levaduras con potencial antagonista como *Pichia guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Candida sake*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii* para el control de la podredumbre de los cítricos (Sharma y col., 2009).

Bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* se han reportado con potencial para inhibir el decaimiento de los cítricos causado por *P. digitatum* y *P. italicum* (Singh y col, 1984; Huang y col, 1995).

Suárez y col. (2007) reportan que bacterias del género *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp. y otros géneros bacterianos, así como hongos del género *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. se han identificado como agentes de biocontrol en sustratos de compostas vegetales contra *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp.

**Cuadro 1.** Microorganismos antagonistas utilizados en el control de enfermedades fúngicas poscosecha

<b>Cultivo</b>	<b>Agente Biocontrol</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Referencia</b>
Manzana	<i>Pseudomonas syringae</i>	Pudrición azul	Janisiewicz, 1987
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pudrición gris	
	<i>Pichia guilliermondii</i>		Janisiewicz y Roitman, 1988
Cítricos	<i>B. subtilis</i>	Pudrición azul	Singh y Deverall, 1984
	<i>Pichia guilliermondii</i>	Pudrición del tallo	
	<i>Pichia guilliermondii</i>		Chalutz y Wilson, 1990
	<i>B. subtilis subsp. subtilis</i>		
	<i>Trichoderma</i> sp.		
Pera	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Pudrición azul	Janisiewicz y col., 1988
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rhizopus	Wilson y col., 1987
Uva	<i>Trichoderma harzianum</i>	Pudrición gris	Chalutz y col., 1988
	<i>Pichia guilliermondii</i>	Rhizopus	
Fresa	<i>Trichoderma</i> sp.	Pudrición gris	Tronsmo y col, 1977
Piña	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i>	Tong-Kwee y Rohrbock, 1980

## **2.5 Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol**

En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de mecanismos de acción es una característica a tener en cuenta en un antagonista, ya que la posibilidad de presentar resistencia hacia el antagonista se reduce si éste actúa por varios mecanismos (Cook y Baker, 1983). Los principales mecanismos de acción referenciados para controlar el desarrollo de patógenos pueden ser resultado de la competencia por los nutrientes, de la producción de bacteriocinas y otros compuestos antagonistas derivados de los metabolismos secundarios, como péptidos con actividad antimicrobiana o antifúngica (Schillinger y col., 1996).

### **2.5.1 Competencia por los nutrientes y/o el espacio**

Se puede definir como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya “escasez” de algún elemento esencial. Si hay exceso no hay competencia.

La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Fernández y col., 2001). Este tipo de antagonismo es favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, virulencia, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante y col., 2009).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando existe exceso de alguno de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz.

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Infante y col., 2009).

La competencia por nutrientes parece desempeñar un papel importante en el efecto antagónico en el control de *P. expansum* por levaduras (Rivera y col., 2012) y en *P. digitatum* por *Debaryomyces hansenii* (Droby y col., 1998).

### **2.5.2 Interacción directa con el patógeno (producción de enzimas)**

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo. El parasitismo puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos y consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista (Fernández y col., 2001). Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, glucanasas y proteasas que degradan las paredes de las hifas, conidias o esclerocios. Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante (Paster y col., 1993). Se ha demostrado la producción de  $\beta$ -1,3-glucanasa por *Aureobasidium pullulans*, enzima que participa en la degradación de las paredes celulares de hongos parásitos (Castoria y col., 2001).

Se ha demostrado la producción de lipasas, proteasas y  $\beta$  glucanasas de *B. subtilis* que actúan sobre el patógeno fúngico *F. oxysporum*. Por otra parte, también se ha informado la producción de quitinasas por parte de *B. cereus*, lo que podría estar involucrado en el biocontrol de hongos fitopatógenos (Tejera y col. 2011). Para el control de *S. rolfsii* por *Serratia marcescens* está implicada la expresión de la enzima quitinasa (Heydari y col., 2010).

### **2.5.3 Producción de metabolitos secundarios implicados en el antagonismo**

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos de bajo peso molecular (menos de 2.5 KDa) producidos durante la fase de crecimiento bacteriano que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia (Parés, 2002). Los metabolitos secundarios presentan una enorme variedad de estructuras químicas. Muchos de ellos suelen ser específicos de algunos grupos microbianos.

Algunos de estos metabolitos bacterianos tienen propiedades inhibitorias de enzimas de la planta, propiedades antimicrobianas, reguladores de crecimiento de plantas, herbicidas, insecticidas y anti-parasitarios. Todas estas propiedades biológicas ha propiciado el uso de estos metabolitos secundarios como agentes de control biológico en la agricultura. El uso de antagonistas microbianos y sus metabolitos secundarios en la agricultura en lugar de agroquímicos podría disminuir el peligro de contaminación (Pathma y col. 2011).

Se ha demostrado que las rizobacterias pueden generar diversos mecanismos de protección de las plantas al ataque de patógenos, mediante la producción de metabolitos como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN), antibióticos, e incluso pueden propiciar la inducción de un sistema de resistencia (ISR) en las plantas que resistan al ataque de patógenos (Kloepper y col., 1997; Whipps y col., 2001).

Bacterias del género *Pseudomonas* tienen la capacidad de producir antibióticos como gacetilfloroglucinol (DAPG), omicina, fenazina, pirrolnitrina, entre otros, los cuáles han demostrado ser altamente eficientes en el control biológico de fitopatógenos. Cepas del género *Streptomyces* tienen potencial de producir antibióticos que reducen o inhiben el crecimiento y desarrollo de patógenos vegetales transportados por el suelo como los actinomicetos (Bressan y col., 2008).

Bacterias del género *Bacillus* spp. son productoras de metabolitos secundarios que incluyen una amplia gama de compuestos producidos naturalmente como péptidos antimicrobianos, polipéptidos, lipopéptidos cíclicos, policétidos, lantibióticos, bacteriocinas, lactonas, fosfolípidos, sideróforos y volátiles (Pathma y col. 2011).

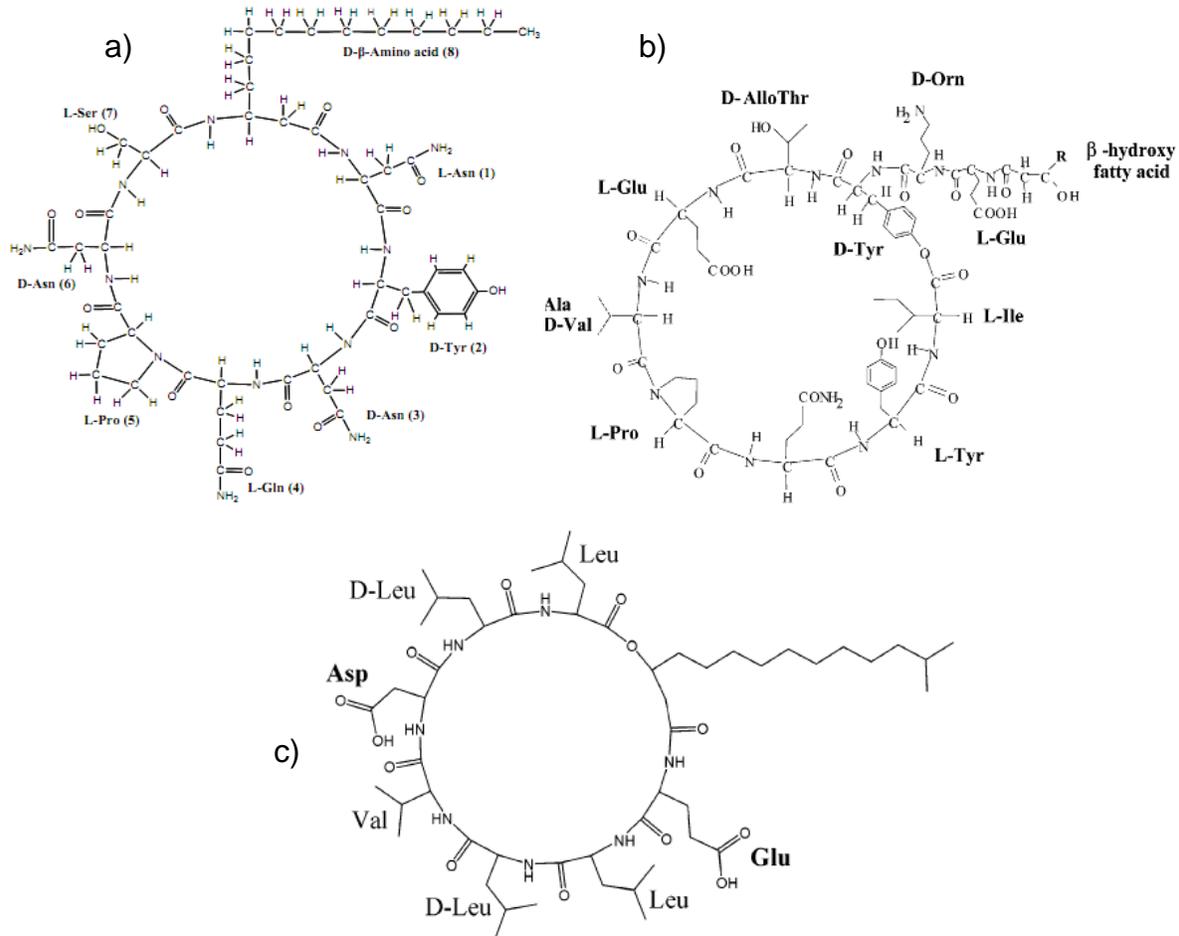
#### 2.5.4 Lipopeptidos

*B. subtilis* tiene un promedio de 45% de su genoma dedicado a la síntesis de antibióticos y tiene el potencial de producir más de dos docenas de compuestos antimicrobianos estructuralmente diversos. Entre estos compuestos antimicrobianos, la familia de los lipopéptidos cíclicos (LPC) que tienen un potencial reconocido contra la inhibición de patógenos gracias a sus propiedades tensioactivas o biosurfactantes (Ongena y col., 2007).

La mayoría de los lipopéptidos cíclicos son moléculas de péptidos vinculadas por una cola de ácido graso hidrófobo de longitud variable. El género *Bacillus* spp., secreta tres principales familias de LPC: surfactinas, iturina A, B, C y fengicinas (Figura 9), que son péptidos bioactivos con un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas y biofarmacéuticas, debido a que son biosurfactantes activos de membrana y antibióticos peptídicos con actividades antimicrobianas potentes (Peng y col., 2008).

Generalmente, los lipopéptidos son más activos en la reducción de la tensión superficial de glicolípidos. Entre ellos, la surfactina, un lipopéptido cíclico producido por *B. subtilis*, es uno de los más eficientes biosurfactantes. Este puede bajar la tensión superficial del agua 72 a 27 mN m<sup>-1</sup>, y tiene concentración micelar crítica (CMC) de 25 mg l<sup>-1</sup>. Además, todos los lipopéptidos cíclicos pueden disminuir la tensión superficial del agua (Peng y col., 2008). La familia de las surfactinas son biotensioactivos poderosos con actividad emulsionante excepcional y propiedades espumantes correlacionada con la actividad hemolítica en suspensiones de eritrocitos y es por tanto un indicador de la presencia de lipopéptidos (Ongena y col., 2007). La familia surfactina abarca variantes

estructurales, pero todos los miembros son heptapéptidos vinculados entre sí con un ácido graso  $\beta$ -hidroxi para formar una estructura de anillo de lactona cíclica.



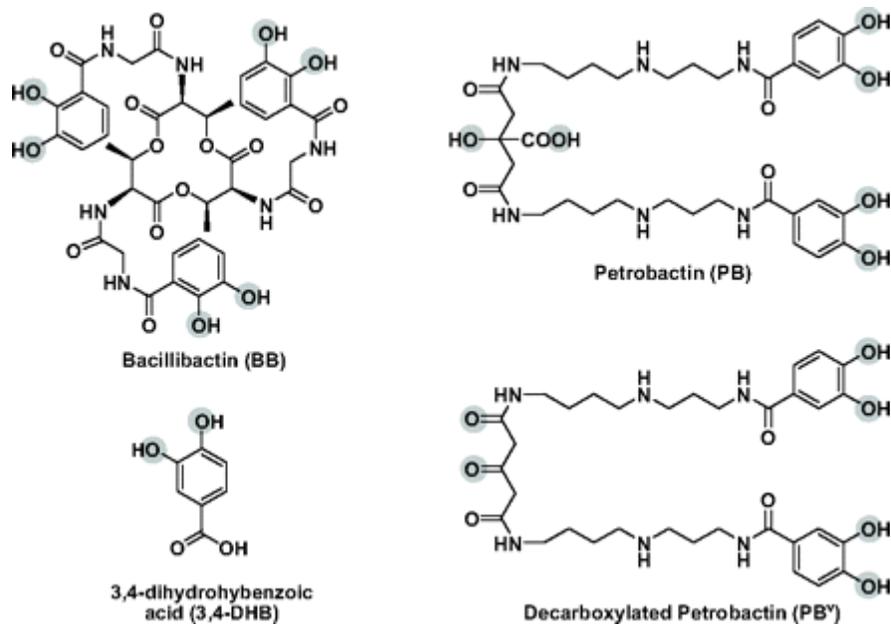
**Figura 9.** Estructuras representativas de tres familias de lipopéptidos  
a) Iturina; b) fengycina; c) surfactina

La actividad biológica de las iturinas es diferente a la de las surfactinas, pues se basa en sus propiedades de permeabilización de las membranas celulares y la formación de poros de conducción iónica (Yu y col., 2010). En el caso de las enfermedades transmitidas por el suelo como *R. solani*, causante de damping-off de tomate, la iturina A producida por *B. subtilis subsp. subtilis* RB14 está involucrada en la supresión del patógeno. La participación de iturinas y fengicinas de cepas de *Bacillus* spp. se muestra en el control biológico contra diversos patógenos y en diferentes especies de plantas (Ongena y col., 2007).

### 2.5.5 Producción de sideróforos

Los suelos generalmente contienen una abundante oferta de Fe en forma de óxidos cristalinos y amorfos. El grado de disolución depende en gran medida del potencial redox del suelo y pH. En condiciones de un pH neutro a alcalino, el Fe está presente principalmente en la forma mineral de Fe (III),  $Fe(OH)_3$ , que es esencialmente insoluble. Plantas y microorganismos han desarrollado una variedad de mecanismos para secuestrar Fe bajo condiciones limitadas, entre ellos los conocidos como sideróforos (Alexander y col., 1991).

Los sideróforos microbianos son agentes quelantes de Fe (III) producidos por bacterias y hongos. Estos compuestos se unen a un Fe fuera de la célula con una afinidad muy alta y luego son tomados mediante receptores específicos en la membrana celular (Schwyn y col., 1987).



**Figura 10.** Estructuras de sideróforos producidos por *Bacillus* sp.

Los sideróforos pueden provocar diversas respuestas en otras especies bacterianas que están presentes en el mismo nicho. El crecimiento de algunas especies puede ser inhibida y esto se ha atribuido a ser uno de los mecanismos

por los que actúan los agentes de biocontrol en la inhibición del crecimiento de patógenos en la rizósfera (Qing-Ping y col., 2011). Mercado y col., (2001). Menciona que la eliminación de algunos patógenos por rizobacterias se debe a la producción de sideróforos que estos microorganismos sintetizan cuando existe una baja concentración de Fe en el suelo.

Una vez que el  $Fe^{3+}$  ingresa a la bacteria, es convertido a  $Fe^{2+}$  por medio de una reacción enzimática de óxido reducción (Kloepper, 1997). Las bacterias, al atrapar o quelar este elemento del suelo lo hacen no disponible para otros microorganismos que carecen de este sistema de asimilación, lo que limita el crecimiento de otros microorganismos (Figura 10).

Especies del género *Bacillus* producen sideróforos, tal es el caso de la especie *B. megaterium* en la que se ha descrito el sideróforo esquizokinen. También se determinó la producción de los sideróforos bacilibactina, ácido tiótico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico que se definen como un material que puede reducir en gran medida la tensión superficial del agua cuando en muy baja concentración. La producción de lipopéptidos y el papel de estos compuestos en *Bacillus* spp. han sido probadas como contra *X. campestris pv. campestris* y *P. carotovorum subsp. Carotovorum. subtilis* (Tejera y col., 2011).

### **2.5.6 Producción de HCN**

Además de los metabolitos mencionados anteriormente, el ácido cianhídrico (HCN) es altamente tóxico para los microorganismos aerobios a concentraciones picomolares y bloquea efectivamente la vía del citocromo oxidasa. Se cree que la producción de HCN por ciertos microorganismos es eficaz contra patógenos de las plantas. Pocas especies bacterianas son conocidas por producir y excretar cianuro de hidrógeno (HCN), un potente inhibidor de la citocromo c oxidasa y varias otras enzimas. En las cepas productoras, HCN no parecen tener un papel en el metabolismo primario y generalmente se considera un metabolito secundario (Blumer y col., 2000) *Pseudomonas* y cepas de *Bacillus* tienen un gran potencial en el control de la enfermedad de la marchitez causada por *Fusarium* spp. del garbanzo (Karimi y col., 2012). Los resultados de algunos estudios de

investigación en este sentido han demostrado que *P. fluorescens*, produce HCN, relacionado con la supresión de la pudrición negra de tabaco causada por *Thielaviopsis basicola* (Heydari y col., 2007).

El creciente uso de nuevas tecnologías de biocontrol de patógenos de las plantas y los productos hortofrutícolas ha incentivado a conocer nuevas alternativas de control utilizando el potencial que presentan muchas bacterias para la inhibición mediante diversos mecanismos. Es importante conocer los modos de acción de las bacterias así como la producción de diversos metabolitos involucrados en el antagonismo para así poder ampliar el panorama al sector agropecuario y poder ofrecer una alternativa amigable con el medio ambiente y segura para los humanos para el control de las enfermedades en pre y poscosecha.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* e *In vivo* de aislados bacterianos de un cultivo orgánico de zarzamora contra *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. stilboides* y *P. expansum*, así como determinar algunos metabolitos relacionados en el mecanismo de inhibición de estos hongos fitopatógenos.

#### 3.2 Particulares

- Evaluar la capacidad antagonista de aislados bacterianos *In vitro* contra *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. stilboides* y *P. expansum*.
- Identificar genéticamente los aislados bacterianos antagonistas por medio de la amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR.
- Identificación bioquímica de los metabolitos presentes en los sobrenadantes bacterianos.
- Evaluar la capacidad de los sobrenadantes bacterianos para inhibir la germinación de esporas fúngicas y determinar algunas actividades bioquímicas relacionadas con el antagonismo.
- Evaluar la capacidad de los aislados bacterianos para inhibir el crecimiento de *F. stilboides* en pimiento.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sitio de estudio

Se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de un cultivo orgánico de zarzamora, localidad Senegal de las Palomas, ubicado en el municipio de San Juan del río, Querétaro, con coordenadas 20°26'10.3" latitud Norte y 100°05'03.4" longitud Oeste.

### 4.2 Material biológico

Se emplearon como referencia cuatro cepas bacterianas identificadas como *B. mojavensis* QAH05, *B. mojavensis* QAH11, *Bacillus* sp, *B. subtilis* previamente caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal (PCV) en el Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

Además, se utilizaron cuatro cepas fúngicas identificadas en trabajos previos. La cepa del hongo *P. expansum* Link fue aislada por Sánchez y col. (2008) seleccionada en la región Serrana de Querétaro por su virulencia sobre manzanas 'Golden Delicious' y registrada con la clave CFNL2016 en el cepario X. La cepa del hongo *F. stilboides* CFNL-2768 fue aislada de frutos de pimiento con síntomas de la enfermedad, en el Laboratorio de Micología, UANL, (Sandoval y col., 2011). *R. solani* y *S. rolfsii* fueron utilizadas en ensayos realizados por Velázquez y col., (2011).

### 4.3 Selección de aislados bacterianos

Las muestras se pasteurizaron, posteriormente se realizaron siembras en placa de agar nutritivo (AN) de las diluciones de suelo, con la técnica propuesta por Kumar y col., (2012) para la selección de bacterias formadoras de esporas. Las placas inoculadas se incubaron a 30° C ( $\pm$  1° C) durante 24-48 h. Se aislaron por separado todas las colonias con distintas características morfológicas entre sí y se mantuvieron en refrigeración a 4°C en cajas de AN hasta el momento de su uso.

Se realizaron ensayos preliminares de antagonismo con cada uno de los aislados bacterianos contra *F. stilboides* y *P. expansum* en placas de APD con CN (Figura 11), utilizando la técnica de cultivo dual (Kishore y col., 2004) y se seleccionaron sólo aquellas cepas que presentaron inhibición contra estos dos hongos. Los aislados resultantes fueron caracterizados por su morfología colonial según el borde, textura y transparencia (Delaat, 1997).



**Figura 11.** Ensayos preliminares de antagonismo en placa de APD con CN para *F. stilboides*

#### **4.4 Pruebas de antagonismo *In vitro***

Los aislados seleccionados en el escrutinio preliminar se inocularon individualmente en frascos de vidrio que contenían 100 mL de medio CN y se incubaron en un agitador rotatorio a 180 rpm a 30° C ( $\pm$  1° C). (Ghribi, y col., 2011). Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 3400 rpm por 15 min para obtener los concentrados celulares. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó APD. Se esterilizó en una olla de presión a 121° a 1.5 atm durante 1 minutos y se vació en cajas Petri. Una vez solidificado el medio, se cortó con un sacabocados un disco de 3mm de diámetro de una caja con crecimiento del hongo y se inoculó con el disco del hongo en la parte central de la caja (Kishore y col., 2004). Para el testigo se utilizó medio CN adicionado con APD. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Las placas se incubaron a 30° C ( $\pm$  1° C). y se midieron los diámetro de crecimiento con un Vernier cada 24 horas durante 7 días, o hasta que el hongo

control haya invadido toda la caja. El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula  $100 \times C-T / C$  (T, el tratamiento; C, de control) (Kumar y col., 2012).

#### 4.5 Identificación de las cepas seleccionadas

Se realizó la extracción de DNA bacteriano utilizando el kit de extracción de ZYMO RESEARCH®, de acuerdo al protocolo que proporcionó el fabricante. Una vez obtenidas las muestras de DNA genómico, se realizó una electroforesis para verificar la integridad del DNA, utilizando agarosa al 1% en buffer TBE adicionado con bromuro de etidio (1µg/mL) para la tinción y se corrió a 90 V por 45 min. Se reveló en un fotodocumentador con luz UV.

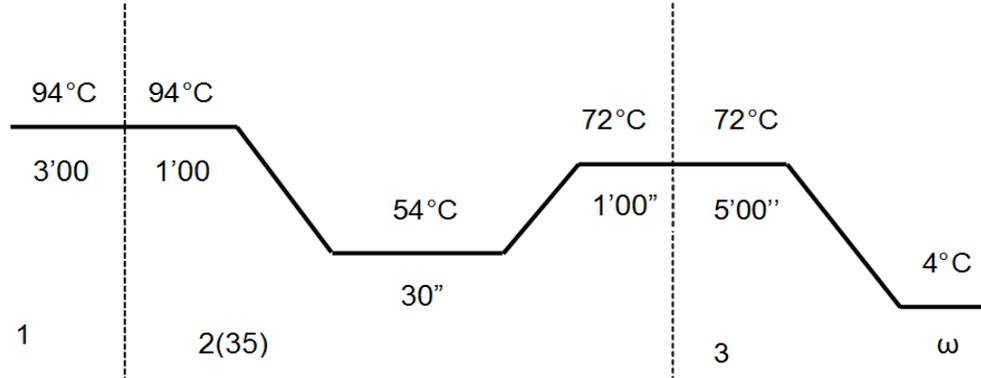
La amplificación del gen 16S ARNr se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada ADN bacteriano, utilizando una mezcla de reacción (Cuadro 2) de acuerdo a las condiciones mostradas en la Figura 12. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos propuestos por Weisburg y col. (1991):

fD1: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

rD1: 5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

**Cuadro 2.** Mezcla de reacción para PCR por muestra de ADN

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen 1X (µL)</b>
Agua	31.1
Solución amortiguadora 10X	2.5
Cloruro de Magnesio 1.5mM	3
dNTP 50mM	2
Oligo fD1 20mM	2
Oligo rD1 20mM	2
Taq Polimerasa	0.4
DNA	2
Glicerol	2.5
<b>Total</b>	<b>50</b>



**Figura 12.** Condiciones para la amplificación del gen 16S ARNr, por PCR

Los productos resultantes de la reacción de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X a 90 V por 45 min. A continuación, el gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio (1ppm/mL) por 15 minutos, después se enjuagó en una solución de TBE 1X. Posteriormente se revelaron las bandas del gel correspondientes al gen 16S ARNr en un fotodocumentador Kodak.

Se cortaron las bandas del gel de agarosa que aparecieron a la altura de 1500 pares de bases con respecto al marcador de peso molecular. Estos productos de PCR se purificaron con el Kit comercial “GFX PCR DNA Gel Band Purific PAC” de la marca GE Healthcare® de acuerdo al protocolo del fabricante. Para verificar la calidad e integridad del DNA purificado se corrieron las muestras de DNA por electroforesis puro en gel de agarosa en las mismas condiciones que ya se mencionaron con anterioridad (Figura 12) y se determinó la concentración de DNA empleando el programa para Ácidos Nucleicos del equipo Nanodrop 1000 Espectrofotómetro UV-Vis de Microfluidos Thermo Scientific.

#### 4.6 Naturaleza bioquímica de los sobrenadantes bacterianos por CCF

Se obtuvieron los sobrenadantes bacterianos de todos los aislados seleccionados, inoculados en CN después de 48 h de crecimiento a 30°C y 180 rpm. El sobrenadante se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y se dejó enfriar.

Posteriormente, se adicionó a cada frasco con sobrenadante HCl concentrado hasta alcanzar un pH final de 2.0 y se precipitó durante una noche a 4°C.

Transcurrido el tiempo de reposo, se colectaron los precipitados por centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 20 min para posteriormente secarlos en una estufa con aire forzado a 40°C durante 16 h. Para la extracción de compuestos biotensoactivos, se añadieron 25 mL de una mezcla cloroformo-metanol (2:1v / v) a cada tubo con el producto seco, y se incubaron en un agitador rotatorio a 250 rpm, 30 °C ( $\pm 0,5$ ) durante 15 minutos. El extracto se filtró y se evaporó en una campana de extracción hasta quedar completamente seco. A este extracto se le conoce como extracto crudo (Ghribi, y col.,2011).

Después de la evaporación, el extracto crudo, se resuspendió con 1mL de cloroformo. Cada extracto analizó en una placa de sílica gel F254 con el siguiente sistema de disolventes: cloroformo/ metanol/ agua (85:15:2, v/v/v). Para detectar los grupos funcionales de aminoácidos se utilizaron los siguientes reactivos de revelación: ninhidrina n- butanol-acetato ácido (Peng y col., 2008). Se determinaron los Rf con la siguiente fórmula ( $R_f = \text{Distancia recorrida de la muestra desde el origen} / \text{Distancia recorrida del eluyente desde el origen}$ ).

## **4.7 Determinación de otras características bioquímicas**

### **4.7.1 Actividad emulsificante**

Se añadieron muestras (2 mL) de sobrenadante libre de células a un tubo de vidrio y 2mL de aceite de parafina (Ghribi y col., 2011). Después de agitar vigorosamente en el vortex, los tubos se dejaron reposar durante 1 hora. Se midieron las absorbancias a 540 nm. La actividad de emulsificación (EA) se definió como la densidad óptica medida (absorbancia por unidad de longitud). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (Patel, y col., 1997).

### **4.7.2 Actividad hemolítica**

Actividad hemolítica se determinó mediante la técnica de estría cruzada con cada una de las cepas antagonistas en la superficie de las placas que contienen

medio de agar sangre y se incubaron a 37 ° C después de 24 h. Después de este tiempo, se midieron los diámetros de las zonas hemolíticas (mm) y de crecimiento y los resultados se expresaron como actividad hemolítica (mm) (Monteiro, 2002) mediante la siguiente ecuación: Halo de hemólisis (mm) = (Diámetro de hemólisis / Diámetro de crecimiento).

#### **4.7.3 Producción de HCN**

La determinación de la producción de ácido cianhídrico (HCN), se realizó de acuerdo a Devi y col., (2007), para lo cual se emplearon 5 mL de cultivos de 24 horas de crecimiento en CN a los cuales se le agregaron 165 µL del reactivo de ácido pícrico neutralizado con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (composición para 40mL: 0.12 g de ácido pícrico, 2 g de carbonato de sodio anhidrido), dejando reaccionar la mezcla durante 5 horas. El resultado se tomará como positivo si la mezcla presentó cambio de coloración.

#### **4.7.4 Actividad quitinolítica**

La actividad quitinolítica de las cepas fue evaluada en placas con medio de agar suplementado con quitina coloidal (0.5%) como principal fuente de carbono (Aktuganov y col., 2002). Las placas se inocularon con bacterias en forma de estría cruzada y se incubaron a 30°C durante tres a siete días. El crecimiento de los aislados se evaluó a los tres días de incubación así como el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de las colonias.

#### **4.7.5 Producción de sideróforos**

Se preparó medio Agar CAS-azul según Schwyn y Neilands (1995) utilizando 60.5 mg de Cromo Azurol S (CAS) disuelto en 50 mL de agua destilada y desionizada. Se mezcló con 10 mL de solución de hierro (III) (1 mmol / L FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 10 mmol de HCl / L). Esta solución se añadió lentamente bajo agitación a 72.9 mg HDTMA disuelto en 40 mL de agua. La mezcla resultante de color azul oscuro se diluyó 20 veces y se sometió a tratamiento térmico en autoclave a 121

°C durante 15 min. Se le adicionó 2% de agar (w / v) como agente gelificante (Shin y col., 2001).

Se prepararon cajas Petri (9 cm de diámetro) con agar-CAS azul como base de agar. Después de la solidificación, se le agregaron 6mL de AN. Las placas se inocularon con las bacterias seleccionadas por el método de punción. Se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48-72 horas o hasta observar cambios en la coloración del medio. Todos estos experimentos se realizaron por triplicado. Se determinó como positiva aquellas bacterias que produjeron halo color anaranjado en el medio.

#### **4.8 Capacidad de los sobrenadantes bacterianos en la inhibición de la germinación de esporas**

##### **4.8.1 Recolección de esporas fúngicas**

Se preparó una suspensión conidial a partir de cultivos con dos semanas de incubación de *F. stilboides* y *R. solani* a 25° C, agregando 5 mL de diluyente (agua salina al 0.85%) sobre la superficie del medio de cultivo. La suspensión de esporas se filtró a través de dos capas de gasa de algodón esterilizada y se ajustó la concentración de esporas mediante conteo con una cámara de Neubauer, ajustando la concentración a  $1 \times 10^4$  esporas/ mL.

##### **4.8.2 Preparación de los sobrenadantes bacterianos**

Los cultivos de bacterias almacenadas a 4 °C en AN fueron resembrados en Caldo Nutritivo e incubados durante 24 h a  $30 \pm 1$  °C y 180 rpm. Posteriormente, el medio se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se descartaron las células y el sobrenadante se esterilizó a 115°C por 15 min.

Se realizó el ensayo de inhibición de la germinación de esporas para cada hongo, tomando en cuenta como tratamientos cada sobrenadante bacteriano. Para cada tratamiento se utilizaron pozos de 1mL incluidos en microplacas de poliestireno. Se inocularon 500 µL del sobrenadante bacteriano, 200 µL de la suspensión del patógeno (200 esporas) y 300 µL de medio Papa Dextrosa Líquido

(PDL). También se prepararon placas testigo de APD con esporas fúngicas en el medio de cultivo sin bacteria.

Las microplacas se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Se evaluó el índice de germinación desde 0 y 1 (espora no germinada) hasta 4 (tubo germinativo cuatro veces el diámetro de la espora) como lo muestra el cuadro 3, escala propuesta por Rivera y col. (2012) Se consideraron 100 esporas por tratamiento en tres diferentes campos del microscopio. Se llevó a cabo un análisis de varianza para cada antagonista, tomando como variable la suma ponderada de los índices de germinación de las esporas en un diseño experimental al azar.

**Cuadro 3.** Escala empleada para la descripción de la germinación de esporas fúngicas

0	1	2	3	4
				

## 4.9 Bioensayos en fruto

### 4.9.1 Preparación de inóculos

Los aislados bacterianos se cultivaron en caldo nutritivo durante 24 h a 30 ± 1 °C y 180 rpm. Después de la incubación se centrifugaron los tubos y se descartó el sobrenadante, recuperando la biomasa celular que se resuspendió en solución salina estéril al 0.85% . La concentración del inóculo (antagonista) se ajustó a 1 x 10<sup>7</sup> UFC-/mL (Sánchez y col., 2008). Para preparar el inóculo de *F. stilboides*, se recuperaron las esporas presentes de los crecimientos fúngicos en cajas Petri con APD empleando solución salina estéril a 0.85 %. La suspensión de esporas se filtró a través de dos capas de gasa de algodón esterilizada y se ajustó la concentración de esporas a 1x 10<sup>4</sup> esporas /mL.

#### 4.9.2 Bioensayo en fruto

Para la realización del ensayo, se lavaron y desinfectaron 30 frutos de pimiento con hipoclorito de sodio (5 %) durante 2 min., posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar bajo flujo laminar por 10 min. Una vez que los frutos de pimiento se secaron, se realizaron 10 heridas en el epicarpio del pimiento con un punzón estéril de 3 mm de diámetro y tres heridas en el pedúnculo; cada horadación se inoculó con 10  $\mu$ l de la suspensión de esporas de *F. stilboides* ( $\approx$ 100 células). Posteriormente, cada herida se inoculó con 25  $\mu$ l de la suspensión de bacterias antagonistas ( $\approx$ 250 000 células). Los frutos se dejaron secar, se depositaron en frascos individuales de plástico previamente desinfectados con etanol a 70 % y se incubaron a  $24 \pm 1$  °C. Al cabo de seis y 12 días se midió la incidencia del patógeno en el epicarpio (mm) y la severidad del daño en el pedúnculo de acuerdo a una escala donde 0=sin daño visible, 1=severidad baja (observación de poco micelio), 2=severidad media (desarrollo del micelio sin cubrir totalmente el pedúnculo) y 3=daño severo (micelio abundante cubriendo totalmente el pedúnculo) (Sanchez y col., 2008).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Selección de cepas con potencial antagónico

Como resultado de la selección previa de bacterias con potencial antagonista contra *F. stilboides* y *P. expansum* se seleccionaron cuatro bacterias y se nombraron como D1, D2, D3 y D4. Como testigo se emplearon ocho cepas del Laboratorio de Plantas y Biotecnología Vegetal de la UAQ, previamente caracterizadas como promotoras de crecimiento vegetal, de las cuáles se seleccionaron cuatro identificadas como *B. mojavensis* QAH05, *B. mojavensis* QAH11, *Bacillus* sp. QAMA04, *B. subtilis* QAP12, que presentaron, en este estudio, potencial de inhibición sobre *F. stilboides* y *P. expansum*. Se realizó la caracterización morfológica de los aislados D1, D2, D3 Y D4 según Delaat (1997) consignando los resultados en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Descripción morfológica de los aislados bacterianos (D1, D2, D3 y D4)

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
D1	Colonias con borde dentado irregular, translúcida de la periferia y opaca del centro, elevada. Color beige de la periferia y oscura del centro. Consistencia butirosa, casi seca y sin brillo.
D2	Colonias pequeñas, enteras y con borde dentado, y más oscuro. Elevación convexa baja, consistencia seca y con poco brillo.
D3	Colonias de tamaño grande, de forma lobulada, y contorno grueso y oscuro, consistencia viscosa. Transparencia opaca. Tiene color café claro en el contorno y beige en el interior o a simple vista. Forma elevada.
D4	Colonias pequeñas de forma entera o completa, consistencia viscosa, translúcidas y unas ligeramente opacas. Poca elevación. Color beige claro.

Todas las bacterias seleccionadas son resistentes a altas temperaturas, característica de las bacterias esporogénicas resistentes a la luz UV y la desecación, lo que les permite resistir condiciones ambientales adversas (Raaijmakers y col., 2002; Saharan y Nehra, 2011).

Uno de los géneros bacterianos que produce esporas e identificado en esta evaluación es *Bacillus* spp., que se caracteriza por tener paredes celulares de múltiples capas, formación de endosporas resistentes, y la secreción de antibióticos peptídicos, así como la producción de algunos otros metabolitos con capacidad de promoción de crecimiento vegetal (Kumar y col., 2011). El género *Bacillus* es caracterizado por expresar actividad antagonista mediante la supresión de los patógenos tanto *In vitro* como en condiciones *In vivo* (Kumar y col., 2011).

## **5.2 Ensayos de antagonismo *In vitro***

La capacidad inhibitoria de los aislados bacterianos se probó frente a los patógenos *R. solani*, *S. rolfsii*, *F. Stilboides* y *P. expansum*.

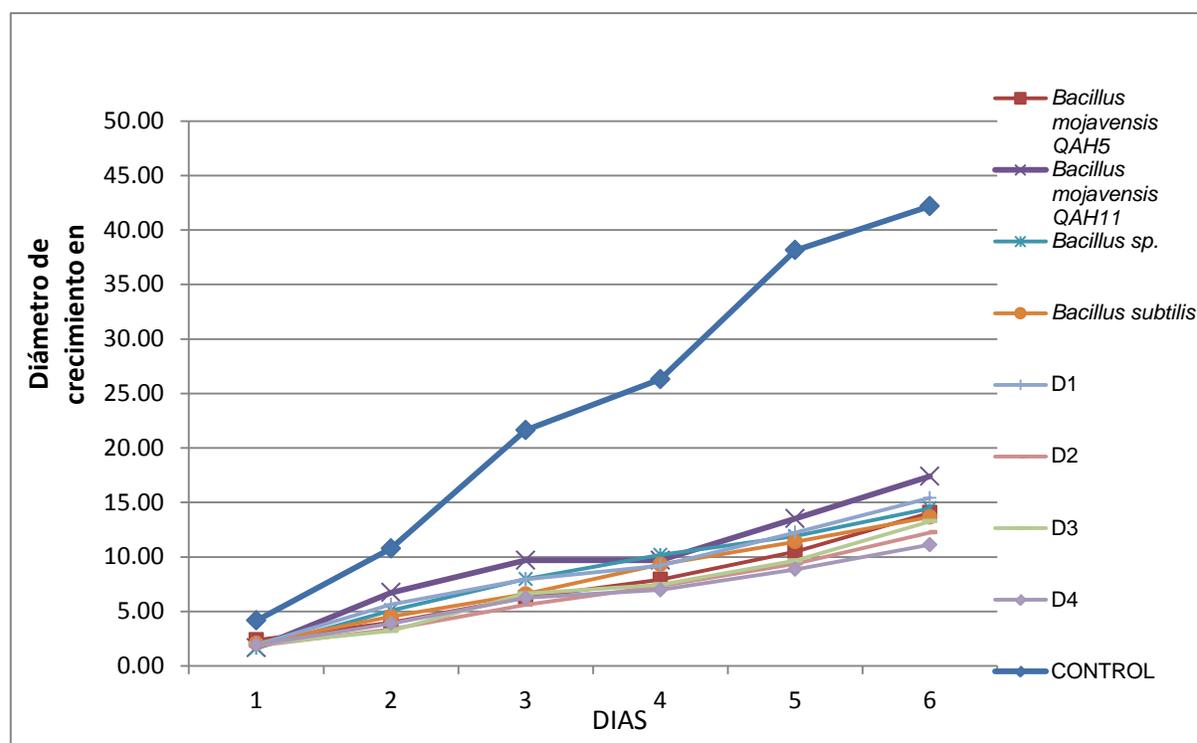
Se observó que *F. stilboides* (Figura 13) en presencia de los sobrenadantes bacterianos presenta un diámetro de crecimiento inferior a 10 mm hasta el cuarto día de incubación, comparado con el control que a esa misma fecha presenta un diámetro respectivo superior a 25 mm. Se puede observar que para el quinto día de incubación el efecto de inhibición de los sobrenadantes bacterianos pierde paulatinamente su actividad. Estos resultados podrían dar un indicio de la duración del efecto de los sobrenadantes bacterianos para la inhibición del crecimiento del hongo.

La tendencia de crecimiento de *P. expansum* en el transcurso de seis días (Figura 14) fue muy similar entre todos los tratamientos con sobrenadantes bacterianos, incluyendo el testigo en APD inoculado con *P. expansum*. Se observa que el crecimiento del hongo es lento con tendencia exponencial a partir del segundo día de incubación. Sin embargo, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los tratamientos, indicando

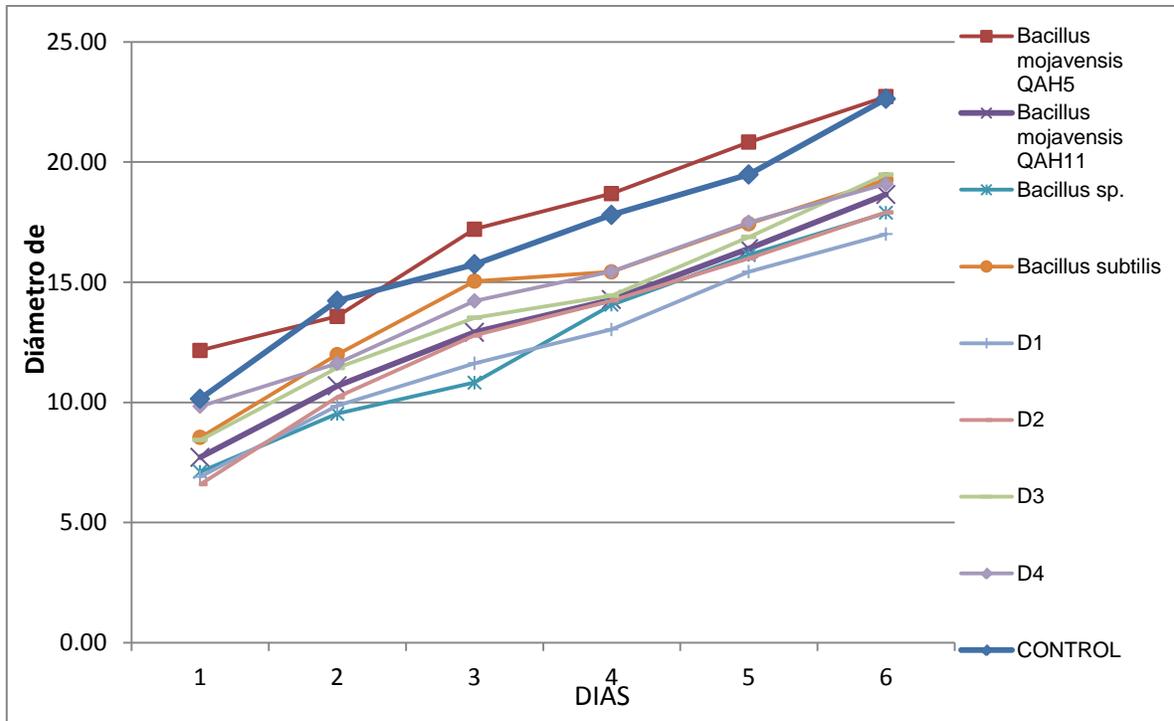
que *Bacillus* sp., D1 y D2 fueron las cepas más antagónicas para *P. expansum*. También se puede observar claramente que la cepa H5 tuvo un valor negativo en los porcentajes de inhibición, indicando un crecimiento ligeramente mayor al testigo.

Para *R. solani* y *S. rolfsii* no se logró obtener una cinética de crecimiento debido a que al tercer día de incubación, el hongo ya había cubierto completamente de micelio toda la caja Petri, por lo que se suspendieron las mediciones.

Se determinaron los porcentajes de inhibición del patógeno con los sobrenadantes bacterianos usando la fórmula  $100 \times C-T / C$  (T, crecimiento del hongo sobre el tratamiento con sobrenadante bacteriano; C, crecimiento del hongo testigo sin sobrenadante bacteriano propuesta por Kumar y col. (2012). Se utilizó como control una Placa de Petri con el hongo sin sobrenadante bacteriano (Cuadro 5).



**Figura 13.** Crecimiento de *F. stilboides* en medio de cultivo con sobrenadante bacteriano.



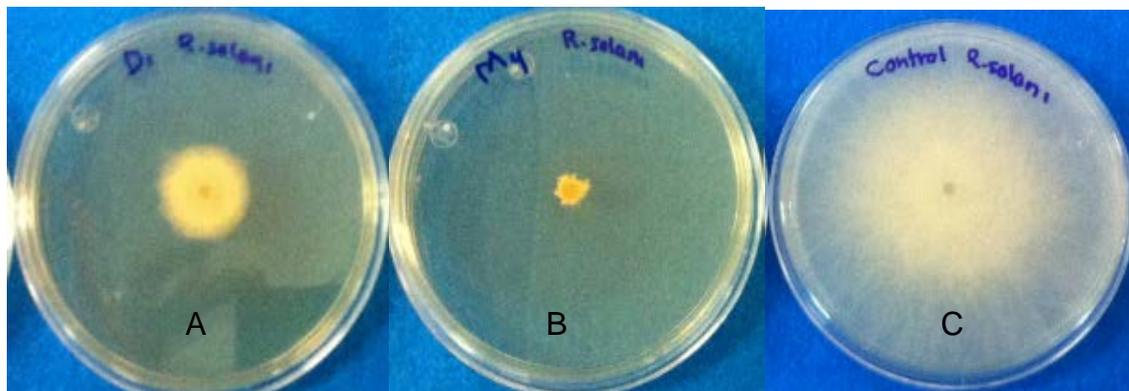
**Figura 14.** Crecimiento de *P. expansum* en medio de cultivo con las cepas antagonistas

**Cuadro 5.** Actividad antagonista de cepas bacterianas en el control biológico de hongos fitopatógenos

Cepa	<i>F. stilboides</i>	<i>P. expansum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
<i>B. mojavensis</i> QAH05	66.70 bc <sup>xz</sup>	-0.73 b	75.99 b	83.42 c
<i>B. mojavensis</i> QAH11	58.78 d	17.32 ab	64.28 e	85.21 c
<i>Bacillus</i> sp.	65.73 bc	20.96 a	91.19 a	96.16 a
<i>B. subtilis</i>	67.62 bc	14.58 ab	71.33 d	94.34 a
D1	63.47 cd	24.55 a	74.65 bc	96.14 a
D2	70.98 ab	20.85 a	72.78 cd	87.08 bc
D3	68.57 abc	13.60 ab	73.62 bcd	92.30 ab
D4	73.66 a	15.85 ab	66.48 e	86.17 c

<sup>x</sup>Valores correspondientes al porcentaje de inhibición; <sup>z</sup>Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

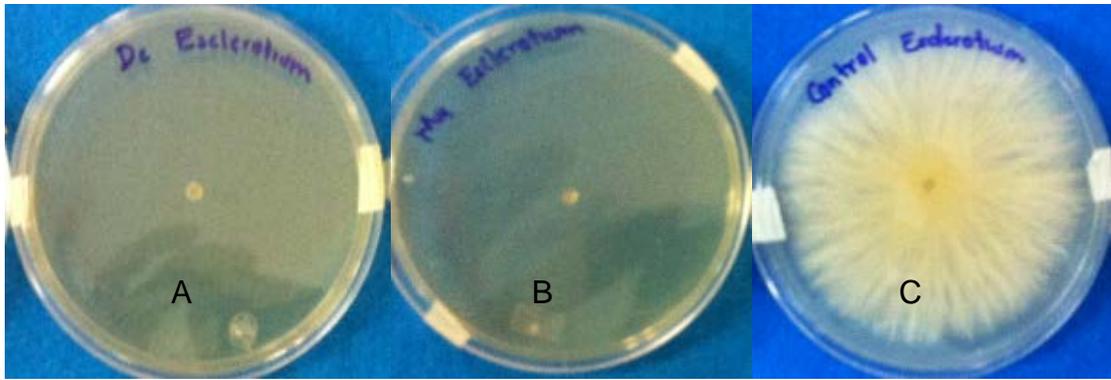
Las cepa *Bacillus* sp. QAM04 presentó la mayor actividad antagonista contra *R. solani* (>90%), siendo la más significativa (Cuadro 5 y Figura 15). Sin embargo, se pueden considerar las cepas D1, D2, D3, *B. mojavensis* QAH05 y *B. subtilis* como bacterias con potencial de inhibición contra este patógeno, puesto que presentaron valores superiores al 70% de inhibición del crecimiento, considerando que Kishore y col. (2005) seleccionaron cepas con porcentajes de inhibición comprendidos entre el 60-66%.



**Figura 15.** Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra *R. solani*, después de 3 días de incubación.

- A) Sobrenadante bacteriano de cepa D1, B) Sobrenadante bacteriano de cepa *Bacillus* sp., C) Testigo sin sobrenadante bacteriano

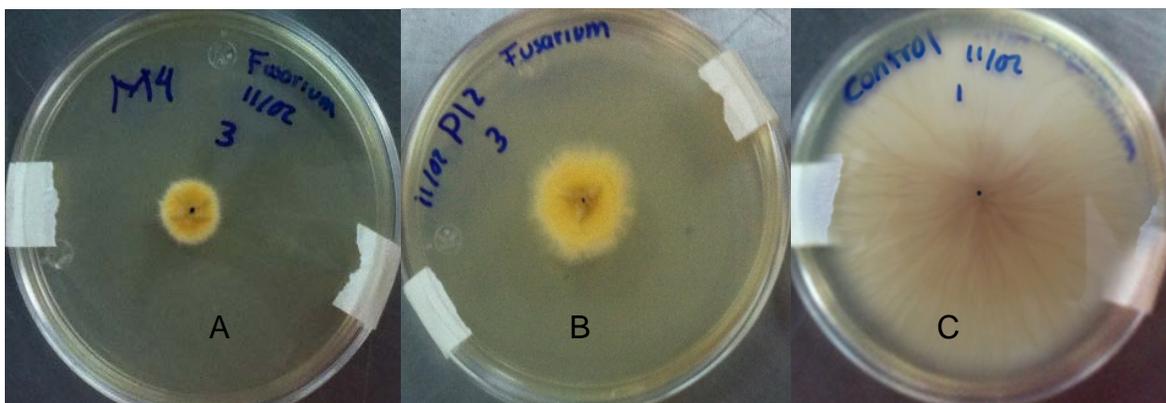
Se presentó inhibición para *S. rolfsii* (Figura 16) por las bacterias *Bacillus* sp., *B. subtilis* y la cepa D1 con los mayores porcentajes de inhibición siendo 96.2%, 94.3% y 96.1% respectivamente, lo que indica que para estos tratamientos el crecimiento del hongo fue casi nulo. Cabe destacar que la cepa D3 también presenta un alto potencial de inhibición (92.3%) de *S. rolfsii*. Los resultados son alentadores, considerando otros trabajos en los cuales se ha reportado resultados similares utilizando *B. subtilis* como bacteria antagonista contra diversos hongos fitopatógenos (Jiang y col., 2001; Ragazzo y col., 2011).. Resultados similares se observaron también por el estudio realizado por Nalisha y col. (2006) donde el crecimiento de micelio de *Sclerotium* spp. fue inhibido por aplicación de *Bacillus* spp. utilizando la técnica de cultivo dual, donde observa la reducción de los esclerocios.



**Figura 16.** Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra *S. rolfsii*, después de 3 días de incubación.

- A) Sobrenadante bacteriano de cepa D2, B) Sobrenadante bacteriano de la cepa *Bacillus* sp., C) Testigo sin sobrenadante bacteriano

Es notable la inhibición del crecimiento de los hongos inoculados en cajas Petri con sobrenadante bacteriano en comparación con las del control de *F. stilboides* (Figura 17). La cepa D4 fue la de mayor actividad antagonista, presentando 73.7% de inhibición del hongo. La cepa D2 también disminuyó considerablemente el crecimiento de *F. stilboides*. Karimi y col. (2012) menciona que en prueba de cultivo dual, cepas de *B. subtilis* inhiben el crecimiento de patógenos como *Fusarium* spp. en 51.16%.

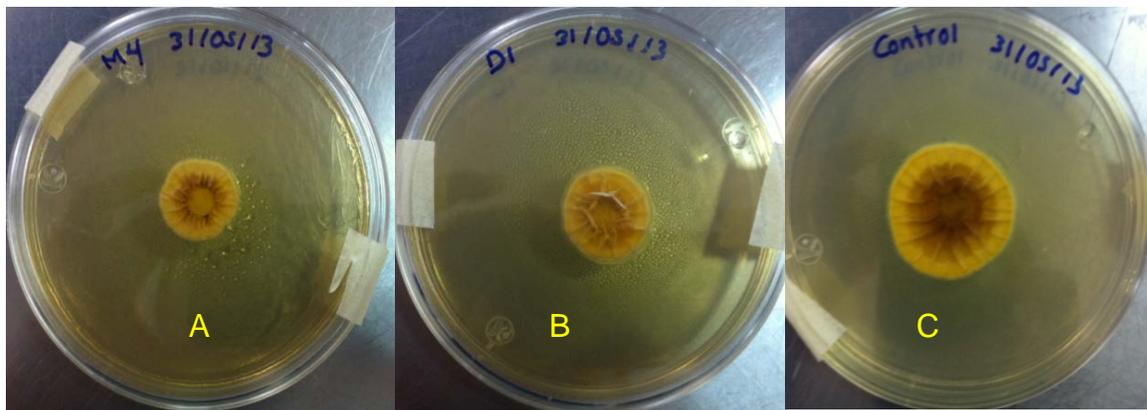


**Figura 17.** Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra *F. stilboides*, después de 7 días de incubación.

- A) Sobrenadante bacteriano de cepa *Bacillus* sp., B) Sobrenadante bacteriano de cepa *B. subtilis*, C) Testigo sin sobrenadante bacteriano

En los últimos años, varias especies de *Bacillus* como *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis* y *B. pumilis* fueron utilizados como agentes de biocontrol contra diferentes especies de *Fusarium*, inhibiendo el crecimiento del micelio entre 72 y 89%. (Zhao y col., 2014). Cepas de *B. subtilis* redujeron el crecimiento del micelio de *F. solani* en un 34,4% (Morsy y col., 2009). Considerando los datos obtenidos, los resultados son alentadores para el control de este hongo.

Para el ensayo de antagonismo realizado con *P. expansum*, (Figura 18) el análisis estadístico muestra que las cepas D1, D2 y *Bacillus* sp. presentaron diferencias significativas en los porcentajes de inhibición. Sin embargo, se obtuvieron porcentajes de inhibición finales no mayores a 25%, por lo que prácticamente no se observó inhibición del hongo. Considerando las condiciones de este estudio, puede existir una posible resistencia de este patógeno ante los compuestos excretados. Janisiewicz y col. (2000) reportan que algunas bacterias de diversos géneros no son capaces de generar antibiosis contra *P. expansum* en distintos medios estudiados.



**Figura 18.** Ensayos en placa con sobrenadantes bacterianos contra *P. expansum* a los 7 días de incubación.

- A) Sobrenadante bacteriano de cepa *Bacillus* sp., B) Sobrenadante bacteriano de cepa D1, C) Testigo sin sobrenadante bacteriano

Los patógenos que toleran el estrés ambiental a menudo tienen pocos competidores, tal es el caso de *Penicillium* spp., que a menudo producen

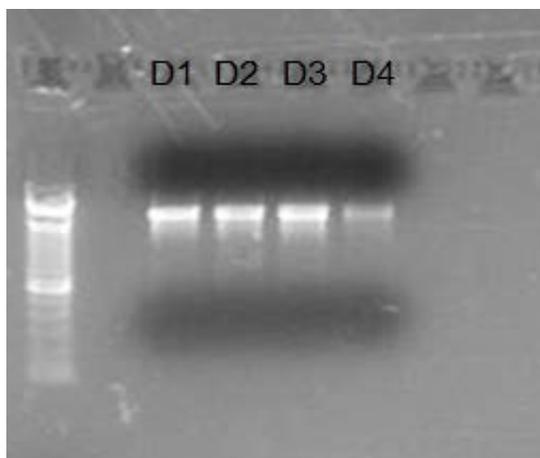
metabolitos secundarios que inhiben competidores, por lo tanto, las especies tolerantes al estrés y competitivo requerirían estrategias de biocontrol diferentes como la aplicación de un control integrado desde campo para reducir la incidencia poscosecha (Janisiewicz y col., 2002).

La actividad antagonista está asociada a la producción de diversos metabolitos que se encuentran difundidos en el agar y que son estables a altas temperaturas. *B. subtilis* tienen la capacidad de producir antibióticos peptídicos que contribuye para su utilización en las formulaciones de control biológico de varias enfermedades de las plantas (Monteiro y col., 2005) Estos metabolitos pueden ser de naturaleza lipopeptídica. Los Lipopéptidos presentan excelente estabilidad a temperaturas bajas y altas, altas concentraciones salinas, toleran un amplio intervalo de pH (3-8), también presentan tolerancia a disolventes e irradiación ultravioleta (Zhao y col., 2013).

Se han reportado algunos trabajos en donde evalúan la estabilidad térmica de diversos metabolitos bacterianos y pudieron concluir que en tratamientos térmicos por debajo de 100 ° C no se afecta la actividad antifúngica de los lipopéptidos (Shu-Mei, y col., 2012). La actividad se reduce en un 27,5% cuando los lipopéptidos se tratan a 121 ° C durante 15 min. (Shu-Mei, y col., 2012). Sin embargo, con los ensayos antagonistas realizados, podemos decir que algunos compuestos inmersos en los sobrenadantes bacterianos presentan capacidad antifúngica aún después de haberlos sometido a temperaturas de esterilización.

### **5.3 Identificación de las cepas seleccionadas**

Después de realizar el PCR, se verificó la integridad del ADN de las cepas D1, D2, D3y D4 como se muestra en la Figura 19. Se determinó la concentración de DNA empleando el programa para Ácidos Nucleicos del equipo Nanodrop 1000 Espectrofotómetro UV-Vis de Microfluidos de Thermo Scientific (Cuadro 6).



**Figura 19.** Gel de electroforesis con los productos de PCR purificados

**Cuadro 6.** Concentración de ADN obtenido por purificación del gel del PCR

Muestra	Concentración ng $\mu\text{l}^{-1}$	Ratio 260/280	Ratio 260/230
D1	34.5	2.03	0.05
D2	27.4	1.84	0.46
D3	32.2	1.90	0.04
D4	11.4	1.73	0.15

La calidad del ADN genómico fue examinado por mediciones de la relación 260/280 y 260/230 nm por Análisis NanoDrop. En el pico de la luz UV la absorción de ADN es 260 nm, el pico de la luz UV para proteínas es 280 nm, la absorción a 230 nm refleja impurezas de, por ejemplo, carbohidratos, péptidos, fenoles, sales tampón, y otros compuestos aromáticos (Hansen y col., 2007). Un ADN puro y de buena calidad debe tener una pureza alrededor de 1.8, si esta relación es baja, puede indicar la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben a 280nm (Álvarez, 2012). La relación de 260/280 nm de las cuatro cepas en promedio oscilarn alrededor de 1.70, valores cercanos a lo reportado, lo que nos indica que los ADNs son de buena calidad. En la relación

230/260 nm, los valores son bajos, indicando que casi no hay presencia de contaminantes

.El ADN purificado se envió al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su secuenciación. Se realizó la secuenciación del gen 16s ARN con los oligonucleótidos universales fD1 y rD1. Una vez obtenidas las secuencias de los productos de PCR, estas fueron ingresadas al programa BLAST del NCBI para buscar homologías con secuencias reportadas. En el Cuadro 7 se muestran los resultados de dichos alineamientos y el porcentaje de identidad.

**Cuadro 7.** Porcentajes de identidad de las cepas identificadas mediante la secuenciación del gen 16 s ARNr

Cepa de estudio	Microorganismo	% de identidad
D1	<i>B. subtilis</i> subsp. spizizenii	97
D2	<i>B. subtilis</i> subsp. spizizenii	99
D3	<i>B. subtilis</i> strain 168	99
D4	<i>B. subtilis</i> strain 168	96

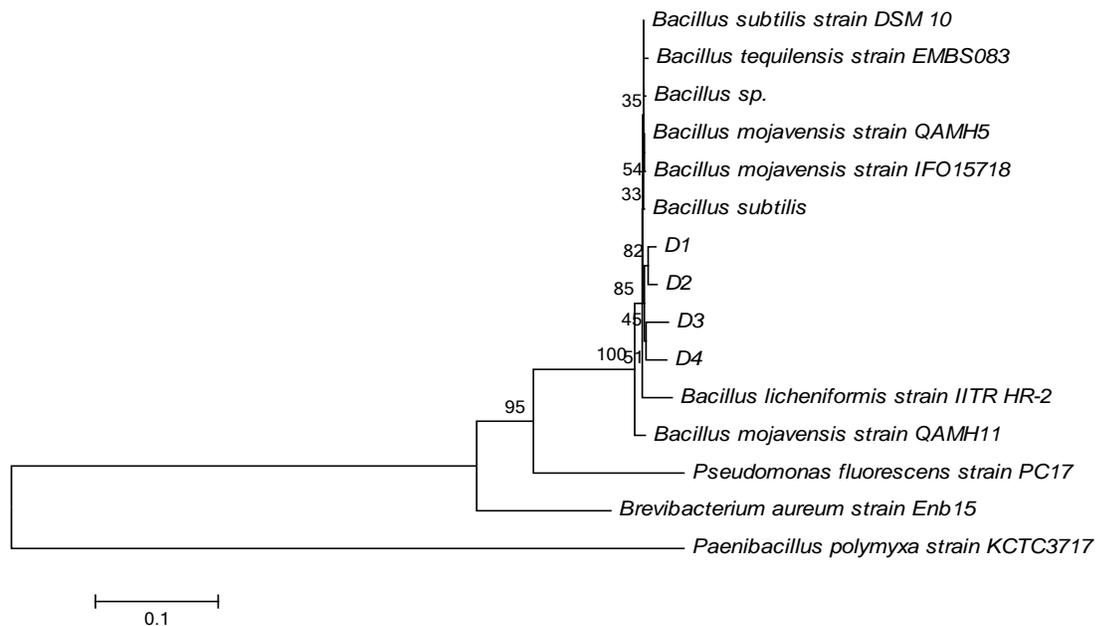
La secuenciación del gen ARNr 16S proporciona los medios precisos para la identificación de microorganismos. La calidad de esta identificación, depende principalmente de la base de datos que se utiliza (Álvarez, 2012).

El análisis con el programa Blast reveló que las secuencias del 16S rARN de los aislados D1, D2, D3 y D4 tienen 97, 99, 99 y 96% de similitud respectivamente con *B. subtilis*.

El par de oligonucleótidos fD1 y rD1 son capaces de amplificar una amplia variedad de taxones bacterianos. La sustitución del oligonucleótido rD1 con rP1 extiende la diversidad de especies aún más, sin embargo, desde la perspectiva de amplificar el número máximo de nucleótidos del 16S ADN, rD1 es preferible; debido a que está más cerca del extremo 3' (Weigsburg y col., 1991).

A partir de las secuencias de los aislados se construyó un dendrograma (Figura 20) utilizando el programa MEGA con la metodología propuesta por Criminger y col (2007). El árbol filogenético en el cual se comparan las secuencias del gen 16S del ARN ribosomal de los aislados muestra una diferencia evolutiva dividida en dos grupos principalmente. Se incluyeron a especies de grupo externo como *P. fluorescens*, *Brevibacterium aureum* y *Paenobacillus polymyxa*. En el primer grupo las cepas de referencia *P. fluorescens*, *Brevibacterium aureum* y *Paenobacillus polymyxan* externa se agruparon. En tanto que, en el segundo grupo todos los demás aislados se agruparon con los del género *Bacillus*.

En la actualidad la comparación de secuencias de 16S ARNr está siendo aplicada para la identificación de bacterias, aisladas de diversas fuentes, en base a sus relaciones filogenéticas. Su utilización se ha incrementado debido la existencia de numerosas bases de datos que cuentan con las secuencias del 16S ARNr. Sin embargo, cuando se estudian especies bacterianas estrechamente relacionadas, o cepas dentro de una misma especie, el poder discriminante de la técnica basada en el estudio del 16S ARNr puede ser limitado (McCartney, 2002).



**Figura 20.** Filogenia de los aislados bacterianos de estudio con cepas de referencia

#### 5.4 Naturaleza bioquímica de los sobrenadantes bacterianos por CCF

El análisis preliminar en Cromatografía de Capa Fina (CCF) reveló la presencia para todas las cepas de cuatro bandas de color intenso ubicadas dentro del recuadro de color rojo, incluyendo el control (Figura 21). Este resultado puede indicar una interferencia del medio de cultivo, debido a que el CN está compuesto de peptona de gelatina y extracto de carne, cuya composición química está dada principalmente por aminoácidos y cadenas cortas de péptidos, razón que puede explicar la revelación de estas bandas por el reactivo de ninhidrina. Para las muestras de D1 y D2, en la cromatografía observada bajo la luz UV se muestran bandas para cada una con un  $R_f=0.83$ , sin embargo al revelar la placa con ninhidrina no se observan estas bandas.

Todas las demás cepas, exceptuando el control, presentaron dos bandas en mayor o menor intensidad con  $R_f= 0.56$  y  $R_f= 0.80$  respectivamente, ambas para cada una de las muestras. Esto nos indica que puede existir la presencia de compuestos con naturaleza lipopeptídica, como lo cita Peng y col. (2008). Se ha evaluado la capacidad de *Bacillus* spp antagonistas contra *Podosphaera* spp. detectando la presencia de compuestos antifúngicos en los sobrenadantes por medio de CCF, donde reportan valores de  $R_f = 0.70$ . La exploración mediante HPLC reveló que los compuestos pertenecían a la familia de los lipopéptidos, como la surfactina y fengycina (Romero y col., 2007).

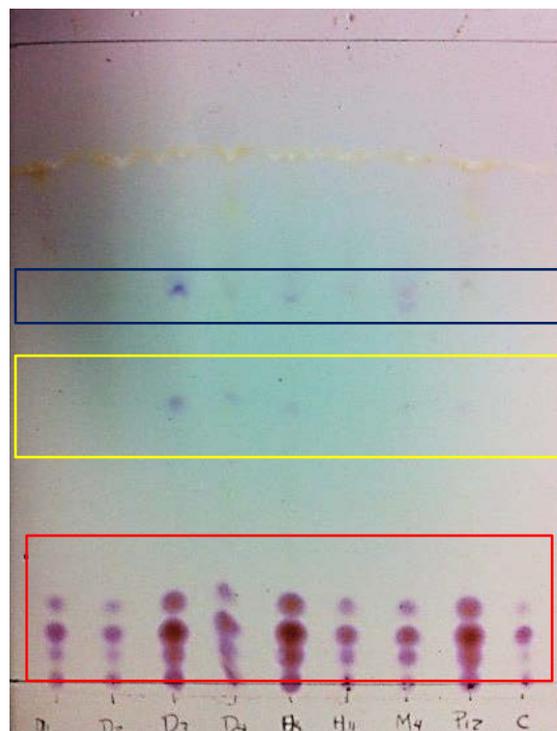
Razafindralambo y col. (1993), extrajo lipopéptidos de *B. subtilis* con actividad antifúngica. De acuerdo a su  $R_f$  se pueden identificar dos grupos de compuestos con  $R_f$  cercanos a 0.65. El análisis por medio de FPLC reveló la presencia de compuestos como iturina y surfactina.

De todas las especies bacterianas productoras de lipopéptidos cíclicos (LPCs), el género *Bacillus* es considerado como el más eficiente ya que puede secretar tres principales familias de LPCs: surfactinas, iturina y fengycina por una sola cepa de *Bacillus* spp. Sin embargo, LPCs con configuraciones moleculares diferentes tienen propiedades similares entre sí. (Zhao y col., 2013) Estos compuestos son bien conocidos por su amplio espectro de actividad

antifúngica (Stein 2005). La estructura anfifílica de lipopéptidos les permite interactuar con las membranas biológicas antagonicamente e inducir la formación de poros (Romero y col., 2007).

Varias especies de *Bacillus* producen biotensioactivos lipopeptídicos; el más importante es la surfactina, que se produce a partir de *B. subtilis*. La surfactina no se sintetiza ribosomalmente; lo hace por un sistema enzima multifuncional como el que participa en la síntesis de los antibióticos de péptido liberado a partir de bacterias bacilos (Nitschke y col., 2006).

Este ensayo no es determinante para la identificación de metabolitos secundarios, sólo se utiliza para la purificación de los compuestos con actividad antifúngica. Sin embargo, por los valores de los R<sub>f</sub> y los resultados obtenidos con pruebas más determinantes como HPLC, podemos generalizar una idea de la posible naturaleza de estos compuestos con actividad antimicrobiana.



**Figura 21.** Placa de CCF cargada con extractos de sobrenadantes bacterianos y revelada con ninhidrina

\*Recuadro azul y amarillo indica la revelación de compuestos con actividad antifúngica; recuadro rojo indica presencia de compuestos del medio de cultivo

## 5.5 Determinación de otros metabolitos

### 5.5.1 Actividad hemolítica

El ensayo de hemólisis se llevó a cabo con el fin de observar la producción de lipopéptidos por cepas de *Bacillus* spp. y para verificar la relación de estos compuestos con la actividad antimicrobiana.

Se realizó la prueba de actividad hemolítica para todas las cepas bacterianas y se midieron los diámetros de las zonas hemolíticas (Cuadro 8), los resultados se expresaron como halos de solubilización (mm) (Monteiro, 2002).

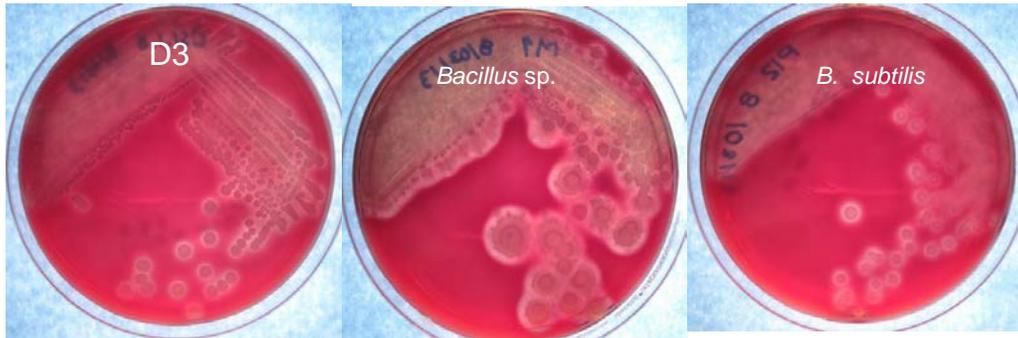
**Cuadro 8.** Medición de halos de hemólisis, actividad emulsificante, actividad quitinolítica y producción de HCN.

Cepas	Actividad hemolítica	Actividad emulsificante	Actividad emulsificante (extracto)	Actividad quitinolítica	HCN
D1	1.32 b <sup>xy</sup>	0.42de <sup>z</sup>	1.17b	-	-
D2	0.85b	0.21f	0.68 c	-	-
D3	1.31b	0.67abc	1.60 a	-	+
D4	0.99b	0.63bc	1.11 b	-	-
<i>B. mojavensis</i> QAH05	1.43b	0.84a	0.63 cd	-	-
<i>B. mojavensis</i> QAH11	1.11b	0.24ef	0.28 e	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	2.75a	0.52cd	0.53 d	-	+
<i>B. subtilis</i>	1.53b	0.75ab	0.29 e	-	+

<sup>x</sup>Valores correspondientes al halo de solubilización (cm); <sup>y</sup> Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ); (+) Actividad positiva, (-) Actividad negativa

Se observó que todos los aislados produjeron un halo de hemólisis o solubilización alrededor de cada colonia; la cepa *Bacillus* sp. mostró un halo de solubilización significativamente mayor que las demás cepas bacterianas (Figura

22). Esta propiedad está relacionada con la producción de lipopéptidos y la correlación que existe entre la capacidad hemolítica con la capacidad antagonista de las bacterias para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Ohno y col.,1995).



**Figura 22.** Actividad hemolítica del aislado D3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis*.

Comparando los resultados obtenidos en las pruebas de hemólisis con la actividad antimicrobiana (Cuadro 5 y 8), se observa que existe una relación entre la producción de lipopéptidos y la inhibición del crecimiento de bacterias fitopatógenos, como lo dice Monteiro y col., (2002).

En un estudio realizado por Leclère y col., (2005) evaluaron la actividad hemolítica de sobrenadante de *B. subtilis* como prueba indirecta para determinar la presencia de compuestos antimicrobianos como micosubtilina, donde por medio de HPLC purificaron y obtuvieron este compuesto con actividad antifúngica.

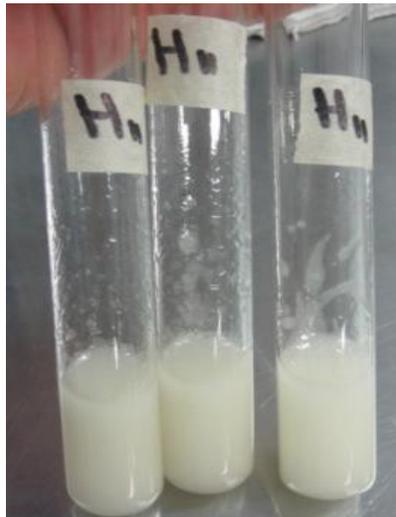
La micosubtilina es un compuesto perteneciente a la familia de los lipopéptidos. Análisis de espectrometría de masas de extractos de micosubtilina mostraron patrones similares a los lipopéptidos. Sin embargo, la prueba de hemólisis evalúa indirectamente la producción biosurfactante por microorganismos, lo que no significa que estas sustancias poseen actividad antimicrobiana en la misma intensidad que hemolítica.

La actividad hemolítica se determina por dos genes, denominado shIA y shIB, que codifican polipéptidos con pesos moleculares de (shIA) y (shIB). Ambos

polipéptidos se sintetizan como precursores con péptidos que se eliminan durante la exportación. Los genes *shIA* y *shIB* están sujetos al control regulado por el hierro. Una actividad hemolítica positiva también podría estar relacionada con la degradación proteolítica por parte del microorganismo que contienen ese gen (como *Serratia* spp.), lo que indicaría que sería una cepa patogénica (Rusn y col., 1990).

### 5.5.2 Actividad emulsificante del sobrenadante

En la prueba de emulsificación (Figura 23) se determinó indirectamente la presencia de lipopéptidos en los sobrenadantes de cultivos bacterianos por medio de la formación de la interfase entre líquidos inmiscibles como el aceite de parafina en agua. El análisis se basa en el aumento en la turbidez de una mezcla de medio y aceite obtenido de la emulsión del hidrocarburo. Se pudo observar la formación de un anillo de emulsificación transcurrida la primera hora. La actividad emulsificante se muestra el Cuadro 8. La cepa *B. mojavensis* QAH05 fue mayor significativamente, sin embargo la estabilidad de todas las emulsiones a las 24 horas es baja.



**Figura 23.** Medición de la actividad emulsificante del sobrenadante de la cepa *B. mojavensis* QAH11

La actividad emulsificante con hidrocarburos como la N-parafina es menos estable a las 24 horas de reposo de las emulsiones, como lo cita Patel y col., (1997), quienes muestran que la estabilidad de las emulsiones con mezclas de hidrocarburos como n- parafina, hexadecano, mezclas de naftaleno y 2-metilo, fue menor en comparación con los hidrocarburos puros y después 24h se observó la pérdida de la actividad de emulsificación. La capacidad para emulsionar aceite y agua es una propiedad importante de algunas bacterias que usan hidrocarburos como única fuente de energía.

Esto concuerda con lo propuesto por Zhu col., (2012), quienes señalan que el índice de emulsificación es mayor cuando la concentración de lipopéptidos es más alta, mientras que la concentración de lipopéptidos es baja cuando hay poca emulsificación. Los resultados mostraron que la estabilidad en emulsión de los lipopéptidos disminuyó con el tiempo prolongado y después de estar en posición vertical durante 24 h.

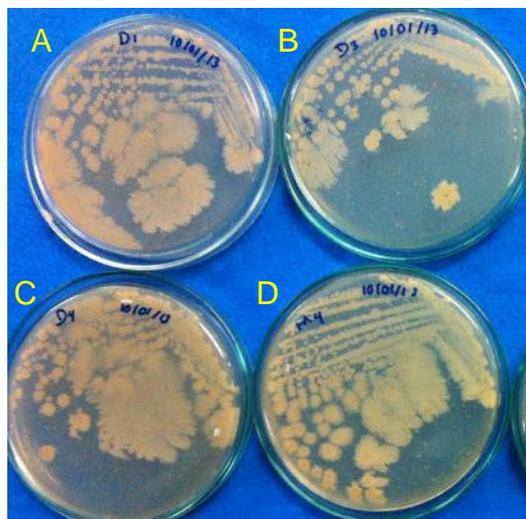
La turbidez de la emulsión es directamente proporcional a concentraciones crecientes. Esto sugiere que la actividad emulsionante implica una interacción directa con el propio hidrocarburo en lugar de simplemente ejerciendo un efecto sobre la tensión superficial del medio (Rosenmberg y col.,1979).

### **5.5.3 Actividad quitinolítica**

Se evaluó la actividad quitinolítica de las bacterias aisladas, para lo cual como parámetro positivo se consideró la producción de un halo alrededor del crecimiento bacteriano en las placas de agar suplementado con quitina coloidal (Figura 24). Ninguna de las cepas presentaron halo de degradación de quitina, por lo que se considera como negativo el ensayo, aunque las cepas si presentaron crecimiento en este medio mínimo, utilizan como única fuente de carbono la quitina.

Está demostrado que variedades del género *Bacillus* spp. inoculadas en el suelo, reducen la incidencia de la pudrición de raíz causada por *R. solani*, relacionada con la producción de enzimas quitinolíticas (Pleban y col.,1997),

razón por la cual se pudiera esperar una relación positiva en este ensayo debido a que varias cepas de trabajo dieron resultados alentadores contra la inhibición de este hongo.



**Figura 24.** Ensayo en placas de agar quitina coloidal

A) Crecimiento de la cepa D1; B) Crecimiento de la cepa D3; C) Crecimiento de la cepa D4; D) Crecimiento de la cepa *Bacillus* sp.

Algunos géneros de *Bacillus* no muestran un halo de hidrólisis en medio mínimo con quitina coloidal, a pesar de que variedades de esta especie han mostrado actividad quitinolítica. Estos resultados sugieren que sólo pocas cepas muestran actividad quitinolítica detectable. Por lo que las enzimas quitinolíticas en *Bacillus* spp. juegan un papel nutricional secundario, ya que la quitina no es una fuente de carbono y nitrógeno importante (Barboza y col., 1999).

#### 5.5.4 Producción de ácido cianhídrico (HCN)

En el presente estudio se determinó la capacidad de todos los aislados bacterianos pertenecientes al Género *Bacillus* spp. para producir HCN, empleando el método propuesto por Devi y col. (2007). Esta reacción específica y cuantitativa se ha aplicado para la determinación de cianuro por oxidación de  $CN^-$  a un haluro de cianógeno, CNX, en el que  $CN^-$  es la especie reactiva. El

CN<sup>+</sup> reacciona con piridina para producir un intermedio que se hidroliza a un dialdehído conjugado, aldehído glutacónico. El aldehído glutacónico se acopla entonces con una amina primaria o un compuesto que contiene hidrógenos de metileno reactivos (RH<sub>2</sub>) (Lamber y col., 1975).

Se pudo observar que los aislamientos producen HCN basándose en las medidas de las absorbancias desarrolladas en la reacción de picrato / Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, siendo las cepas D3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* las más significativas (Cuadro 8). Sin embargo, cuando se determinaron los límites de detección, las concentraciones obtenidas son inferiores al valor estándar, lo que nos indica que éste método no es muy confiable para detectar pequeñas cantidades de este compuesto.

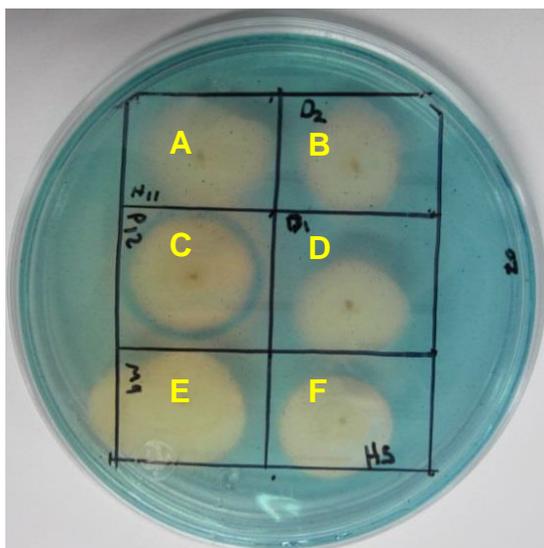
Independientemente de las bajas concentraciones producidas por cada bacteria, está demostrado que el HCN es uno de los compuestos volátiles más importantes producidos por *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. que ha sido reportado como un eficaz compuesto en el control de algunas enfermedades fúngicas, debido a su alta toxicidad (Karimi y col., 2012). La producción de cianuro está muy estrechamente regulada en bacterias, cuyas concentraciones generalmente están por debajo de 1 mM y pueden ser tolerados por muchas células vivas. Sin embargo, es posible que las células huésped cuando se infectan masivamente por un patógeno cianogénico puedan sufrir de efectos secundarios causados por cianuro (Goldfarb y Margraf 1967). La glicina es el precursor inmediato metabólico de la ruta del cianuro, por lo que un medio suplementado con glicina podría dar mejores resultados para esta prueba.

### **5.5.5 Determinación de sideróforos**

El ensayo CAS detecta cambio de color del complejo de hierro-CAS de azul a naranja después de la quelación del hierro unido por un sideróforo (Schwyn y Neilands, 1987). El ensayo de placa de CAS se ha usado principalmente para la producción de sideróforos por diversas cepas de tipos salvajes o mutantes. Sin embargo, es difícil de cultivar microorganismos exigentes sobre la placa de agar CAS y algunos ingredientes de la agar CAS

tienen actividad antibacteriana innata. El hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) usado en la preparación del medio de CAS demostró ser tóxico para algunas bacterias y hongos (Schwyn y Neilands, 1987; Milagres y col., 1999).

En este trabajo se presenta una modificación al medio CAS-agar para permitir el crecimiento de diferentes microorganismos sin problemas de inhibición causado por la toxicidad de HDTMA utilizado en la preparación de reactivo CAS (Milagres y col., 1999) (Figura 25). Considerando el método propuesto por Qing y col. (2011), el ensayo de SD-CASA es un método más simple y más barato, incluso para la producción de sideróforos por un agente de control biológico potencial.



**Figura 25.** Ensayo para la producción de sideróforos en placas de agar SD-CAS: A) Cepas *B. mojavensis* QAH11, B) cepa D2, c) cepa *B. subtilis*, D) cepa D1, E) Cepa *Bacillus* sp. F) Cepas *B. mojavensis* QAH05

Casi todas las cepas ensayadas, exceptuando *B. mojavensis* QAH11, presentaron cambios de coloración en el medio, en mayor o menor grado se observó un halo de color amarillo-naranja alrededor de cada colonia sembrada en la placa SD-CAS (Cuadro 9). El cambio de color del medio o la zona clara indica resultado positivo, según (Kumar y col., 2013) es decir, la producción de sideróforos se indica con halos de color naranja alrededor de las colonias.

Este cambio en el color del reactivo de CAS fue debido a que el sideróforo presente quela el hierro del reactivo CAS y produce el cambio de color de azul a rojo-naranja (Schwyn y col., 1987).

Las diferencias en el cambio de color en el agar CAS-azul producida por todas las especies, pueden estar relacionada con las diferencias en la naturaleza química de los compuestos quelantes del hierro producidas (Machuca y col. 2007).

Los sideróforos producidos por rizobacterias quelan hierro disponible y por lo tanto crean escasez artificial de hierro a los respectivos fitopatógenos, limitando así su crecimiento (Sayyed y col., 2011).

**Cuadro 9.** Ensayo para la producción de sideróforos en medio SD-CAS

Cepa	Medio SD-CAS
D1	+
D2	+
D3	++
D4	+
<i>B.mojavensis</i> QAH05	++
<i>B.mojavensis</i> QAH11	-
<i>Bacillus</i> sp.	++
<i>B. subtilis</i>	+

(++) Actividad positiva mayor, (+) Actividad positiva menor

(-) Actividad negativa

Se ha reportado estabilidad y sensibilidad del medio SD-CAS al no ser afectado por cambios de pH o ingredientes de soluciones del ensayo Sin embargo, Por encima de pH 7, el color azul de la solución CAS cambia a amarillo, debido a la formación de hidróxido de hierro que ya no es distinguible del CAS libre de hierro. (Shin y col., 2001).

La producción de sideróforos se considera como un componente importante del mecanismo bacteriano para la suficiencia de hierro y

probablemente más importante para la supervivencia y el crecimiento en el entorno competitivo del suelo, que es generalmente deficiente en hierro soluble (Khan y col., 2006). Los sideróforos exhiben una considerable variabilidad estructural y afinidad por el hierro, que determina el crecimiento de un microorganismo en condiciones de competencia cuando la disponibilidad es un factor limitante (Dimkpa y col., 2009).

El crecimiento de algunas especies puede ser inhibida y esto se ha atribuido a ser uno de los mecanismos por los que actúan los agentes de biocontrol en la inhibición del crecimiento de patógenos en la rizósfera (Quing-Pi y col., 2011). Su modo de acción en la supresión de la enfermedad está basado únicamente en la competencia por el hierro contra el patógeno (Agrawal y col., 2013).

Se ha visto que varias especies de *Bacillus* son de interés ya que son dominantes en el suelo y son conocidos por secretar antimicrobianos y sideróforos. Además, también son importantes productores de biosurfactantes. Estos pueden causar la lisis de zoosporas de hongos patógenos de plantas transmitidas por el suelo como *Pythium*, *Phytophthora* y *Plasmopara* interactuando e interrumpiendo el flujo de la membrana plasmática (Miller, 1997). En consecuencia, *Bacillus* y otras rizobacterias pueden facilitar un control de amortiguación-off especialmente en viveros vegetales donde la enfermedad es prevalente menudo mediante la destrucción de zoosporas de estos fitopatógenos. (Agrawal y col., 2013).

Se han identificado varias sustancias antibióticas incluyendo bacteriocinas y antibióticos como la fenazina producidas por *Pseudomonas* spp., sin embargo, uno de los mecanismos más importantes responsables en la supresión de los patógenos de las plantas es la competencia mediada por hierro de los sideróforos. Las pyoverdinas son los principales sideróforos sintetizados por *Pseudomonas* spp. en condiciones de crecimiento de hierro limitantes. Estas moléculas son uno de los mecanismos implicados en la supresión de enfermedades fúngicas de plantas transmitidas por el suelo (Jenifer y col., 2013).

## 5.6 Capacidad de los sobrenadantes bacterianos en la inhibición de la germinación de esporas

Se utilizaron extractos de cultivos líquidos libre de células que contenían metabolitos de cada cepa de *Bacillus* spp. y se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la germinación de esporas de *F. stilboides* y *P. expansum* *In vitro*. Por otra parte, se realizó un análisis microscópico de daños morfológicos inducidos por estos metabolitos. Se realizó un conteo de 100 esporas por triplicado y se determinó el porcentaje de germinación de cada lote. Además se utilizó una escala del 1 al 5 para determinar el tamaño del tubo germinativo.

En el ensayo realizado para *F. stilboides*, las esporas germinaron en medio PDL con CN (Cuadro 10). Los porcentajes de germinación para el tratamiento control observados bajo el microscopio en una resolución de 40X fueron del 36% aproximadamente de 100 esporas contadas, considerado como porcentajes bajos. Para poder determinar el mejor tratamiento para la inhibición de la germinación de esporas, se obtuvieron los porcentajes de no germinación, que para fines de esta explicación puede traducirse como en porcentaje de inhibición.

**Cuadro 10.** Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de *F. stilboides*

Tratamiento	% de inhibición
D1	67 ab <sup>xy</sup>
D2	66 ab
D3	71 ab
D4	67 ab
<i>B. mojavensis</i> QAH05	53 bc
<i>B. mojavensis</i> QAH11	54 bc
<i>Bacillus</i> sp.	78 a
<i>B. subtilis</i>	57 bc
<i>F. stilboides</i>	32 c

<sup>x</sup>Valores correspondientes al Promedio de esporas germinadas; <sup>y</sup> Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Los tubos germinativos fueron de tamaño considerablemente mayor a los demás tratamientos. Los tamaños de los tubos germinativos oscilan en la escala de germinación del 2 al 5 (de los cuáles, 15% fueron superiores a la escala 5), tamaños que casi no se pudieron observar en los otros tratamientos.

El índice más bajo de germinación de esporas fue obtenido por el tratamiento con la cepa *Bacillus* sp. que presenta mayor diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos al inhibir la germinación en un 78%. Los porcentajes de germinación para esta cepa fueron de 22%, con tamaños de germinación no mayores a la escala 3.

Los sobrenadantes bacterianos de D1, D2 y D3, tuvieron porcentajes de inhibición de entre 66 y 72%. La cepa *Bacillus* sp. presenta correlación entre los ensayos de antagonismo en placa realizados para *F. stilboides* con los de germinación de esporas. Un efecto similar es observado por Romero y col., (2007), donde los extractos lipopeptídicos de cepas de *B. subtilis subsp. subtilis* redujeron significativamente la germinación (11 y 17%) en comparación con los no tratados.

El mismo ensayo de germinación de esporas con el medio esterilizado se realizó para *P. expansum* (Cuadro 11). De acuerdo al análisis estadístico, el tratamiento con la cepa D4 fue el mejor para la inhibición de *P. expansum*. Comparado con el control, que obtuvo un porcentaje de germinación del 68%. Un efecto similar es observado por Rivera y col., (2012) cuando levaduras antagonistas inhiben la germinación de conidios en más de 71% en medio NYDB 20 %.

Los resultados indicaron que los metabolitos secundarios presentes en el medio de cultivo inhibieron fuertemente el crecimiento del micelio y la germinación de esporas. Este mismo efecto inhibitorio de metabolitos lo demostró Tan y col., (2013) donde se observa un efecto de metabolitos producidos por bacterias del género *Bacillus* sobre *Fusarium* spp., provocando inhibición causando distorsión, la tumescencia de las hifas y las esporas. Etchegaray y col, (2008) reporta que células fúngicas fueron dañadas por el tratamiento con lipopéptidos,

observándose una reducción en la estructura de las hifas.

**Cuadro 11.** Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de *P. expansum*

Tratamiento	% inhibición
D1	48.33ab <sup>xy</sup>
D2	55.00ab
D3	61.00ab
D4	62.67a
<i>B. mojavensis</i> QAH05	48.00ab
<i>B. mojavensis</i> QAH11	52.67ab
<i>Bacillus</i> sp.	41.67ab
<i>B. subtilis</i>	47.67ab
<i>P. expansum</i>	32.00b

<sup>x</sup>Valores correspondientes al Promedio de esporas germinadas; <sup>y</sup> Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

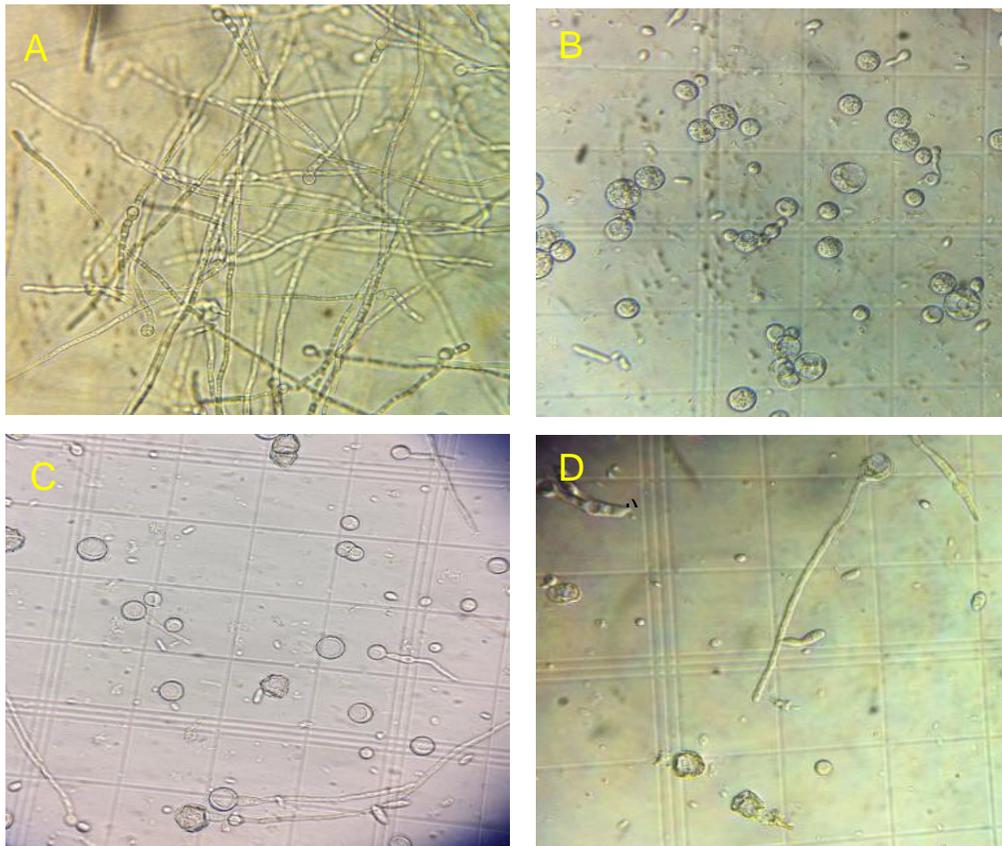
La interacción antagonista entre los compuestos antifúngicos y conidios de hongos parece compartir una característica común, que implica la inducción de daños vinculados a modificaciones morfológicas estructurales a los conidios, todos los cuales resultan en un daño irreversible, haciéndolos inviables (Romero y col., 2007).

Se pudo observar que después de llevar a cabo la incubación durante aproximadamente 24 h, las esporas presentaron formas anormales con respecto al control. Con el tratamiento de la cepa *Bacillus* sp., los conidios aparecieron bulbosos e hinchados (Figura 26). Con la cepa *B. subtilis*, algunos conidios perdieron turgencia, así como para los que recibieron el tratamiento con D1.

Huang y col. (2012) observaron por medio de micrografías, que algunos compuestos lipopeptídicos excretados por *Bacillus* spp. indujeron la deformación

de las hifas, la ampliación de vacuolas citoplasmáticas y fugas citoplasmática en *R. solani* Q1. En un estudio similar, se demostró que *B. subtilis subsp. subtilis* redujo la germinación de conidias de *P.fusca* mostrando conidios modificados. Los conidios tratados con extractos lipopeptídicos de cultivos de *B. subtilis subsp. subtilis* muestran una morfología caracterizada por la aparición de grandes depresiones y pérdida de turgencia, resultando en la formación de unos tubos degradados germinales y la ausencia de apresorios o hifas (Romero y col., 2007).

Estos resultados apoyaron la hipótesis de que la secreción de compuestos antifúngicos, tales como lipopéptidos, es el mecanismo primario que contribuye al efecto nocivo de estas cepas de *Bacillus* spp. frente a la germinación de diversos patógenos.



**Figura 26.** Efecto de los sobrenadantes en la germinación de conidios de *F. stilboides* a) Control *F. stilboides*, b) tratamiento con *Bacillus* sp. c) tratamiento con D1 d) Tratamiento con *B. subtilis*

## 5.7 Bioensayos en frutos

Se realizó el ensayo de infección en frutos de pimiento con *F. stilboides*, como lo reportan Sandoval y col. (2011). Cada cepa bacteriana fue considerada como un tratamiento y un control sin la cepa bacteriana. El experimento se realizó por triplicado. Se realizó una sola medición al sexto día de incubación de los frutos inoculados, según lo reportado.

Se observó la aparición de micelio blanco al tercer día en algunos de los frutos inoculados, principalmente sobre el pedúnculo y el epicarpio.



**Figura 27.** Incidencia de *F. stilboides* en epicarpio y pedúnculo

A partir del tercer día de incubación y de los días posteriores se comenzó a ver un mayor crecimiento de micelio en los frutos con casi todos los tratamientos, excepto para *B.mojavensis* QAH11. Aunado a la aparición del micelio blanco, se observó una mancha necrótica alrededor de la herida, no asociada a la infección fúngica. Se presume que la bacteria comenzó a degradar el tejido vegetal del área donde fue inoculada para la mayoría de los tratamientos, excepto para D3.

**Cuadro 12.** Daños al epicarpio y pedúnculo del pimiento por *F. stilboides*

CEPA	Daño al epicarpio (mm)	Severidad al pedúnculo
D1	10.843 a <sup>xy</sup>	2 a
D2	9.516 a	2 a
D3	8.110 a	2 a
D4	9.027 a	2 a
<i>B.mojavensis</i> QAH05	10.850 a	2 a
<i>B.mojavensis</i> QAH11	1.000 b	1 a
<i>Bacillus</i> sp.	8.870 a	2 a
<i>B. subtilis</i>	9.016 a	2 a
<i>Control</i>	9.136 a	2 a

<sup>X</sup>Valores correspondientes al promedio en mm de diámetro del crecimiento del hongo; <sup>Y</sup> Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales con base a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ )

Se midió la incidencia del hongo en el pedúnculo y se determinaron los diámetros de invasión del patógeno (cuadro12). Se observa que sólo la cepa *B. mojavensis* QAH11, tuvo diferencia significativa al presentar menor crecimiento del hongo. Tampoco existen diferencias en la disminución de la severidad del pedúnculo. Por lo que podemos concluir que no existe un efecto significativo para la inhibición del patógeno en el fruto usando las bacterias. Aunque la cepa *B. mojavensis* QAH11, no presentó buenos resultados en las pruebas de antagonismo *in vitro*, en las pruebas en fruto fue la que mejor inhibió el crecimiento del hongo. Por lo que no existe ninguna correlación entre los ensayos de antagonismo realizados *in vitro* con los ensayos antagonistas realizados *in vivo*.

Las células en cultivo líquido (como Caldo Nutritivo) no tienen la misma capacidad para producir sustancias inhibitoras que las células cultivadas en medios sólidos debido a que los metabolitos producidos por las bacterias pueden

ser inestables o con tendencia a inactivarse en el ambiente de la superficie de la fruta. Los hongos crecen a temperaturas más bajas que la temperatura mínima requerida para el crecimiento de las bacterias y la producción de antibióticos (Pusey y col, 1984). El efecto de la temperatura sobre el rendimiento o producción de metabolitos bacterianos es de importancia, porque el hongo puede estar en ventaja contra la bacteria y no necesariamente porque carezca de efecto inhibitorio.

Lo anterior probablemente se deba a que entre los diversos mecanismos de acción que las bacterias puedan ejercer sobre el patógeno, éste sea capaz de generar respuestas de defensa en el tejido del hospedero (Sandoval y col., 2012). Existen reportes similares en donde en ensayos *in vivo* levaduras indujeron algún mecanismo de resistencia en el hospedero, mientras que *in vitro* la inhibición del crecimiento del hongo se deba fundamentalmente a una competencia por nutrientes y por espacio. (Janisiewicz, 1987).

## 6. CONCLUSIONES

### Identificación de cepas bacterianas

La caracterización genética por medio de la amplificación del gen 16S DNA nos muestra que los aislados bacterianos de la rizósfera del suelo orgánico de zarzamora (nombrados como D1, D2, D3 Y D4), que presentaron actividad inhibitoria contra diversos fitopatógenos, poseen altamente homología (> ¿??) con especies de *B. subtilis*.

### Actividad inhibitoria contra hongos

Como resultado de los ensayos de antagonismo *In vitro*, la cepa *Bacillus* sp. mostró la mayor actividad inhibitoria contra *R. solani*; las cepas D1, D3, *Bacillus* sp. y *B. subtilis* tuvieron el mayor efecto inhibitorio contra *S. rolfsii*, mientras que las cepas D2 y D4 presentaron de inhibición contra *F. stilboides*. Sin embargo no se observó inhibición de *P. expansum*.

No existe relación entre la capacidad de un aislado bacteriano para la inhibición de un patógeno con la capacidad de ese mismo aislado para inhibir otro, todos presentan diferente actividad en función del patógeno, por lo que se consideran como específicos para ciertos patógenos fúngicos.

Todas las cepas presentaron actividad emulsificante y actividad hemolítica, propiedades relacionadas con la presencia lipopéptidos. Existe una correlación entre estas propiedades bioquímicas con la inhibición antagonista de los aislados bacterianos, puesto que todos fueron positivos para estas pruebas, en mayor o menor cantidad. No se detectó la presencia de enzimas líticas ni de HCN como agentes supresores en las bacterias de estudio.

Los sobrenadantes bacterianos provocaron deformaciones en los conidios de *F. stilboides* y *P. expansum* como el hinchamiento de la célula y la pérdida de turgencia y viabilidad de las mismas. Estos resultados indican la posible presencia de sustancias antagónicas en los sobrenadantes y podrían ser empleados para el control de enfermedades fúngicas.

Las bacterias que mostraron actividad antagonista *In vitro* no mostraron inhibición de *F. stilboides* sobre la superficie del fruto de pimiento, por lo que se puede concluir que no existe una relación de los ensayos *In vitro* con los ensayos *In vivo*. Existen factores que pueden explicar estos resultados como la intervención de mecanismos de resistencia del patógeno en el fruto o del mismo fruto hacia ambos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Agrawal**, D.P.K., Agrawal, S. 2013. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2:10, 406-417.

**Agrios**, G. N. 1995. Fitopatología. Uteha.

**Agrios**, G. 2005. Fitopatología. 2a Ed. Grupo. Noriega. México, DF.838p.

**Aktuganov** G. E., A. I. Melentev, L. Yu. Kuzmina, N. F. Galimzyanova, A. V. Shirokov. 2002. The Chitinolytic Activity of *Bacillus* Cohn Bacteria Antagonistic to Phytopathogenic Fungi. Microbiology, 72:3, 313–317

**Alexander**, D. B., Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fert Soils 12:1, 39-45.

**Aparicio** Bello, J. A. 2010. Cambios bioquímicos inducidos en cebolla por la inoculación con *Trichoderma harzianum* y su relación con el control de *Sclerotium rolfsii*. Tesis Doctoral.

**Arias**, T. J. K., Jerez, R. A. P. 2008. Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Trabajo de grado en Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Colombia.

**Aycock**, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii* or the status of Rolf's fungus after 70 years. N C ARS Tech Bull. 174:1, 202

**Baayen**, R. P. Elgerma, D. M. 1985. Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* sp. *dianthi*. Neth J Plant Path. 91: 119- 135.

**Baker**, R..In J. D. Horsfall and E. B. Cowling. 1978. Inoculum potential Ed. Plant

pathology: an advanced treatise. Academic Press. EEUU. 2: 137- 157

**Barboza-Corona**, J. E., Contreras, J. C., Velázquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gómez-Ramírez, M., Cruz-Camarillo, R., Ibarra, J.E. 1999. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett* . 21:12, 1125-1129.

**Barnett**, H. L., Binder, F. L. 1973. The fungal host-parasite relationship. *Annu Rev Phytopathol*, 11:1, 273-292.

**Bernardes De Assis**, J., Peyer, P., Rush, M. C., Zala, M., McDonald, B. A., Ceresini, P. 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology* 98:1326-1333.

**Berta**, G., Sampo, S., Gamalero, E., Massa, N., Lemanceau, P., 2005. Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mossae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 279–288.

**Blanco Zapata**, D. C. 2012. Evaluación de bacilos aerobios formadores de endosporas (bafes) para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kuhn en el cultivo de papa criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.

**Blumer**, C., Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 3, 170-177.

**Budge**, G. E., Shaw, M. W., Lambourne, C., Jennings, P., Clayburn, R., Boonham, N., McPherson, M. 2009. Characterization and origin of infection of *Rhizoctonia solani* associated with Brassica oleracea crops in the UK. *Plant pathology*, 58:6, 1059-1070

**Bressan**, W., Figueiredo, J. E. F. 2008. Efficacy and dose–response relationship in biocontrol of Fusarium disease in maize by *Streptomyces* spp. *Eur J Plant Pathol*, 120:3, 311-316.

**Calderón**, A, 1978. Enfermedades de la papa y su control. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 143.

**Carling**, DE.,Leiner, RH., Westphale, PC., 1989. Symptoms, signs, and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato induced by tuberborne inoculum of *Rhizoctonia solani* AG-3. Am J Potato Res. 66:693-702

**Cao**, J., Jiang, W., & He, H. (2005). Induced Resistance in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) Fruit against Infection by *Penicillium expansum* by Postharvest Infiltration of Acibenzolar-S-methyl. Journal of phytopathology, 53:11, 640-646.

**Carrasco** Reynoso, J. A. 2013. Antagonismo de levaduras aisladas de manzanas en almacenamiento prolongado contra *Penicillium expansum* link en poscosecha Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UAQ, Qro.

**Castoria**, R.; De Curtis, F.; Lima, G.; Caputo, L.; Pacifico, S.; De Cicco, V. 2001. *Aerobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biol Technol. 22:1, 7-17.

**Chalutz**, E. and C.L. Wilson. 1990. Biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus by *Debaryomyces hansenii*. Plant Dis. 74:134- 137.

**Coates**, L., & Johnson, G. 1997. Postharvest diseases of fruit and vegetables. Plant Pathogens and Plant Diseases, 533-548.

**Cook**, J. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Manual The American fitopatological Society, EEUU. 539 p.

**Criminger**, J. D., Hazen, T. H., Sobecky, P. A., & Lovell, C. R. 2007. Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. Appl Environ Microbiol, 73:18, 5959-5961.

**De Curtis**, F., G. Lima, D. Vitullo, V.De Cicco. 2010. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. Crop Prot. 29: 663–670.

- Delaat A.** 1997. Microbiología. 2ª ed. México: Panamericana
- Dennis C.** 1985. Fungi in: Postharvest physiology of vegetables. J. Weichmann Ed. Marcel Dekker, Inc., New York. Chapter 19: 377-411.
- Devi, K. K., Seth, N., Kothamasi, S., & Kothamasi, D.** 2007. Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions. *Current microbiology*. 54:1, 74-78.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatoš A, Büchel G, Kothe E.** 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol. Biochem.*, 41:1, 154-162.
- Divya Rani, V., Sudini, H.** 2013. Management of Soilborne Diseases in Crop Plants: An Overview. *IJPAES*, 3:4, 156-164.
- Droby, S. E., Chalutz, C. L., Wilson and Winiewski, M. E.** 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35:794-800.
- Eckert, J.W. and J.M Ogawa.** 1985. The chemical control of postharvest diseases: Subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:421-454.
- Eckert, J.W., Ratnayake, M.,** 1983. Host-pathogen interactions in postharvest disease. *Post Harvest Physiology and Crop Preservation.* Plenum Press, New York.
- Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., de Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E., & Teschke, O.** 2008. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of microbiology*, 190:6, 611-622.
- Errampalli, D., & Brubacher, N. R.** 2006. Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil. *Biol Control*, 36:1, 49-56.
- Fernández L.O., Vega M.** 2001. Microorganismos antagonistas para el control

fitosanitario. Manejo integrado de plagas. 62, 96-100.

**García**, R., García, A. and Garnica, C., 2002. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. Revista Latinoamericana de la Papa, 13: 24-40.

**Garcés** De Granada. E, Orozco.M. Zapata. C. 1999. Fitopatología em flores. Acta biológica Colombiana 4: 5-26.

**Ghribi** et. al. 2011. Enhancement of Bacillus subtilis Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. Biotechnology Research International. doi:10.4061/2011/653654

**Goldfarb** WB, Margraf H .1967. Cyanide production by *Pseudomonas aeruginosa*. Ann Surg 165:104–110

**González-Hernández**, D.2002. Estado Actual de la Taxonomía de *Rhizoctonia solarti* Kühn.

**Hansen** T.V.O., Simonsen, M. K., Nielsen, F. C., Hundrup, Y. A. 2007. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16:10, 2072-2076.

**Heydari**, A., y Pessarakli, M. 2010. Una revisión sobre el control biológico de patógenos fúngicos de plantas que utilizan antagonistas microbianos. *Diario de las ciencias biológicas* , 10 :4

**Hibbett**, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. T Mycol Soc Jpn 33: 533-556.

**Huang** B.J. Deverall, S.C. Morris. 1995. Postharvest control of green mold on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. Postharvest Biol Tec , 129–137

**Infante**, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de

Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal, 24:1, 14-21.

**James M. Jay**, Martin J. Loesner, David A. Golden. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 5ta edición, Ed. ACRIBIA, SA.

**Jenifer**, M. A., Reena, A., Aysha, O. S., Valli, S., Nirmala, P., Vinothkumar, P. 2013. Original Research Article Isolation of siderophore producing bacteria from rhizosphere soil and their antagonistic activity against selected fungal plant pathogens. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2:1, 59-65.

**Jiang**, Y. M., Zhu, X. R., Li, Y. B. 2001. Postharvest Control of Litchi Fruit Rot by *Bacillus subtilis*. LWT-Food Sci Technol, 34:7, 430-436.

**Janisiewicz**, W. J. 1991. Biological control of postharvest fruit diseases. Handbook of Applied Mycology Vol I. Ed. Marcel Dekker, Inc. p 301-325.

**Janisiewicz**, W. J.; Korsten, I. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annu Rev Phytopathol 40: 411-441.

**Janisiewicz**, W. J.; Tworkoski, T. J.; Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. Phytopathology 90: 1196-1200.

**Janisiewicz**, W.J. and J. Roitman. 1988. Biological control of blue-mold and gray-mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology. 78:1697-1700.

**Kader A.A.** 2002. Postharvest Technology of Horticultural Crops. University of California, Agriculture and Natural Resources, CA, USA, Publication, 33:11, 535 pp

**Karabulut**, O. A., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Palou, L. 2010. Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. Crop protection, 29:8, 903-906.

**Karimi**, K., J. Amini, B. Harighi, B. Bahramnejad. 2012. Evaluation of biocontrol

potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against Fusarium wilt of chickpea. Aust. J. Crop Sci 6:4,695-703

**Kishore**, G. K., S. Pande, A.R. Podile. 2005. Biological control of collar rot disease with broadspectrum antifungal bacteria associated with groundnut. Can. J. Microbiol. 51: 123–132

**Kloepper**, J. W., Tuzun, S., Zehnder, G. W., Wei, G. 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-historical precedence. Phytopathology, 87:2, 136-137.

**Kumar**, P., R.C. Dubey, D.K. Maheshwari. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens- Microbiol Res.167:493- 499.

**Kwon**, J.H., T.T. Phuong, C. S. Park. 2009. Occurrence of Fruit Rot of Melon Caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea. Mycobiology. 37:2, 158-159.

**Kwon**, J. H., Ryu, J. S., Chi, T. T. P., Shen, S. S., Choi, O. 2012. Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. Mycobiology, 40:3, 214-216.

**Leclère**, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P. 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. Arch. Microbiol, 186:6, 475-483.

**McCartney**, A. L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. Br J Nutr, 88:S1, s29-s37.

**Milagres** AMF, Machuca A, Napoleão D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J. Microbiol. Meth., 37:1,1-6.

**Monteiro** L 2002. Produção de substâncias bioativasde *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. MSc Thesis, Universidade Federal dePernambuco, Brazil

**Morsy** EM, Abdel-Kawi K, Khalil M 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as bio-control agents against *Fusarium solani* on tomato plants. *Egypt J Phytopathology* 37: 47–57.

**Mukherjee**, P. K., Raghu, K. 1997. *Trichoderma* sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables. *World J Microb Biot* 13:5, 497-499.

**Nalisha**, I., Muskhazli, M., y tampoco Farizan, T. 2006. La producción de compuestos bioactivos por *Bacillus subtilis* contra *Sclerotium rolfsii*. *Malays J Microbiol*, 2:2, 19-23.

**Nitschke**, M., Pastore, G. M. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour. Technol* 97:2, 336-341.

**Ochoa**. J. 1996. Control biológico del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporium*. f. sp. *dianthi*. Mediante el uso de los microorganismos potencialmente antagonistas *Pseudomonas fuorences*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum*. Trabajo de grado (biólogo) Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de biología.

**Ohno**, A., T. Ano, M. Shoda.1995 .Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 517-519.

**Osemwegie**, O. O., Oghenekaro, A. O., Owolo, L. O. 2010. Effects of Pulverized *Ganoderma* Spp., on *Sclerotium Rolfsii* Sacc and Post-harvest Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Fruits Preservation. J Apic Sci* 6:11, 1794-1800.

**Papavizas** GC, Adams PB, Lumsden RD, Lewis JA, Dow RL, Ayers WA, Kantzes JG. 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* 65, 871-877

**Parmeter**, J. R. 1970. *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. Univ of California Press.

- Paster**, N., Droby, S., Chalutz, E., Menasherov, M., Nitzan, R., and Wilson, C. L. 1993. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Microbiol. Res.* 97:1201-1206.
- Patel**, R. M., & Desai, A. J. 1997. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. *J Basic Microbiol*, 37:4, 281-286.
- Pathma**, J., G. R. Rahul., K. R. Kamaraj, R.Subashri, N. Sakthivel. 2011. Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *Biol Control Journal* 25:165-181.
- Peng**, F., Wang, Y., Sun, F., Liu, Z., Lai, Q., Shao, Z. 2008. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *J Appl Microbiol*, 105:3, 698-705.
- Phillips**, D.J., 1984. Mycotoxins as a postharvest problem. In: Moline, H.E. (Ed.), *Postharvest Pathology of Fruits and Vegetables: Postharvest Losses in Perishable Crops*. Agricultural Experimental Station, University of California, Berkeley Publications, NE, pp. 50–54.
- Pleban**, S., Chernin, L., Chet, I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus* Lett *Appl Microbiol*, 25:4, 284-288.
- Prusky**, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol*, 34, 413–434.
- Prusky**, D., Lichter, A. 2008. Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *Eur J Plant Pathol* 121:3, 281-289.
- Prusky**, D., Yakoby, N. 2003. Pathogenic fungi: Leading or led by ambient pH. *Mol. Plant. Pathol* 4, 509– 516.
- Punja**, Z. K. 1985. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annu Rev Phytopathol* 23: 97-127.

**Pusey**, P. L., Wilson, C. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *PI Dis Res*, 68:9, 753-756.

**Qing-Ping**, H., Jian-Guo, X. 2011. A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5:25, 4321-4327.

**Ragazzo** J. A., A Robles, L Lomelí, G Luna, M Calderón. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 17 :1, 5-11,

**Raaijmakers** JM, Vlami M, de Souza JT .2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537–547

**Razafindralambo**, H., Paquot, M., Hbid, C., Jacques, P., Destain, J., Thonart, P. 1993. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high- performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A*, 639:1, 81-85.

**Remesal** González E. 2012. Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rofsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de podredumbre de raíces.

**Rodriguez**, M. P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zaol. Mex.(ns) Número especial*, 1, 53-78.

**Romero**, D., De Vicente, A., Olmos, J. L., Davila, J. C., Pérez-García, A. 2007. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J Appl Microbiol*. 103:4, 969-976.

**Rosenberger**, D.A., Meyer, F.W., 1985. Negatively correlated crossresistance to diphenylamine in benomyl-resistant *Penicillium expansum*. *Phytopathology* 75, 74–79.

**Ruan**, Y., y Braum, V. 1990. Hemolisina como marcador de *Serratia*. *Archivos de la microbiología* , 154:3, 221-225.

**Saharan**, B. S., & Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21, 1-30.

**Sandoval-Chávez**, R. A., Martínez-Peniche, R. Á., Hernández-Iturriaga, M., Fernández- Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., Soto-Muñoz, L. 2011. Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. Rev Chapingo Ser Hortic, 17:2, 161-172.

**Sánchez-Ventura**, S. E., Martínez-Peniche, R. Á., Castillo-Tovar, J., Fernández-Escartín, E. 2008. Antagonismo de levaduras nativas contra la pudrición azul (*Penicillium expansum* LINK) en manzana en poscosecha. Rev Fitotec Mex, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre, pp. 359-366.

**Santamaría** Basulto, F., Díaz Plaza, R., Gutiérrez Alonso, O., Santamaría Fernández, J., Larqué Saavedra, A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya Maradol. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2:5, 631-643.

**Schwyn** B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem., 160:1, 47-56.

**Singh**, V. and B.J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Brit. Mycol. Soc. 83:487- 490.

**Singh** N, Pandey P, Dubey RC, Maheshwari DK. 2008 Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World J Microbiol Biotechnol;24:1669–79.

**Singh**, D. Y Mathur, S. K.1974. *Sclerotium rolfsii* in seeds of bean from Uganda. Seed Sci. Technol. 2: 481-483.

**Stein**, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Biol , 56:4, 845-857.

**Shin**, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H.2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. J. Microbiol. Methods 44:1, 89-95.

**Shu-Mei, Z., Yu-Xia, W., Li-Qiang, M., Jing, L., Xiao-Yu, Z., Xu, C., Jing-Fu, L.** 2012. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6:8, 1747-1755.

**Subash N, Meenakshisundaram M, Unnamalai N, Sasikumar** 2013. C. Effect of trichoderma harizanum to control damping off disease and growth promotion in chilli (*Capsicum annum* ), *Int J Pharm Bio Sci.*; 4:1076 – 1082.

**Tan, Z., Lin, B., Zhang, R.** 2013. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus*, 2:1, 543.

**Tejera H. B. et. al.** 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42:3,131-138,

**Thomashow, L.S. and D.M. Weller,** 1996. Current Concepts in the use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites. In: *Plant-microbe Interactions*, Eds Stacey, G. and M. Keenpp: 187-235.

**Thompson, J. F., Mitchell, G. F., Kasmire. F.** 2002. Enfriamiento de Productos Hortofrutícolas. *En: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas*, Kader (ed) Tercera Edición Universidad de California, EE.UU. pp. 111- 130.

**Tian, S.P., Qin, G.Z., Xu, Y. and Wang, Y.S.** 2004. Application of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Acta Bot Sin* 46, 1324–1330.

**Torres, R; Teixidó, N.; Viñas, I.; Mari, M.; Casalini, L.; Giraud, M.; Usall, J** 2006. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 Formulation for Controlling *Penicillium expansum* Decay on Pome Fruit from Different Mediterranean Regions. *J Food Prot* 69 :11, 2703–2711.

**Tripathi, P., Dubey, N. K., Shukla, A. K.** 2008. *World J Microb Biot*, 24:1, 39-46.

**Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández- Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A.** 2011. Role of the 4- phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Mol Plant Microbe In*, 24:12, 1459-1471.

**Yu, G.Y. y col.** 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 34, 955–963

**Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173:2, 697-703.

**Whipps, J.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rizhosphere. *J Exp Bot.* 52:487-511

**Wills, R. B. H et.al.** 1981. Postharvest. An introduction to the physiology and handling of fruits and vegetables. New South Wales University Press Limited, Kensington, Australia. 150 pp.

**Wilson, C.L., M.E. Wisniewski, et.al.** 1991. Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: Alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot* 10:172-177.

**Wisniewski, M.E., and Wilson, C.L.** 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *Hort Science* 27:94-98.

**Yao, M., Tweddell, R., Desilets, H.** 2002. Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*, 12:5, 235-242.

**Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Wang, J., Fan, S.** 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J Microb Biot*, 29:3, 401-409.

**Zhao, X., Zhou, Z. J., Han, Y., Wang, Z. Z., Fan, J., Xiao, H. Z.** 2013. Isolation

and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiol Res*, 168:9, 598-606.

**Zhao**, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Liu, Y. 2014. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS one*, 9:3, e92486.

**Zhu**, Z., Zhang, G., Luo, Y., Ran, W., Shen, Q. 2012. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. *Bioresour. Technol.*, 112, 254-260.