



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

**Caracterización fisiológica y actividad antagónica de bacterias aisladas de huerta de fresa con manejo orgánico contra hongos fitopatógenos**

**Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

**Presenta:**

Alejandra Torres Lara

Dirigido por:

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Codirigido por:

Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Julio 2020  
**México**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Biología

**Caracterización fisiológica y actividad antagónica de bacterias aisladas de huerta de fresa con manejo orgánico contra hongos fitopatógenos**

**Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

**Presenta:**  
Alejandra Torres Lara

**Dirigido por:**  
Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Presidente

  
Firma

Dra. Ma. Del Rosario Abraham Juárez  
Secretario

  
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime  
Vocal

  
Firma

M en C. Kruskaia Karenia Caltzontzin Fernández  
Vocal

  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Julio 2020  
México

## Resumen

Las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas. Además, algunas de ellas pueden favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas bacterias son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y juegan una función primordial en los cultivos, permiten disminuir el uso de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias obtenidas a partir de muestras de suelo y plantas de fresa (*Fragaria ananassa* var. Camino Real) colectadas de una huerta con manejo orgánico, ubicada en el ejido La Calera, Irapuato Guanajuato. Con base a esto se pretende aprovechar a las bacterias caracterizadas como potenciales agentes de control biológico para diversos cultivos de importancia económica. Para aislar las bacterias se realizaron diluciones seriadas de suelo y raíz para obtener cultivos axénicos dando como resultado 13 bacterias. Se llevaron a cabo pruebas de antagonismo contra seis hongos fitopatógenos que atacan diversos cultivos de importancia económica como son *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Se observó la inhibición del crecimiento de los hongos, además, de disminuir la formación de esclerocios en los últimos dos hongos mencionados. También fueron probados extractos de los metabolitos bacterianos sobre la germinación de esclerocios. Es importante destacar que estas bacterias no inhibieron el crecimiento del hongo benéfico *Trichoderma* sp. La caracterización bioquímica indicó que algunas de las bacterias tienen potencial como PGPB ya que, producen metabolitos secundarios como ácidos orgánicos para la solubilización de fosfatos, y ácido indol acético, la cual es la principal auxina en las plantas, capaz de modular el crecimiento y desarrollo vegetal promoviendo el rendimiento de los cultivos. Este efecto se demostró en plántulas de chile (*Capsicum annuum*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con cultivos bacterianos. La identificación de estas bacterias se realizó por análisis de su secuencia de DNA de la región 16S del RNA ribosomal. Entre los géneros identificados resaltan *Pantoea* spp., *Variovorax* spp. y *Pseudomonas* spp. los cuales son reportados en la literatura como agentes de control biológico y promotores de crecimiento vegetal. Las bacterias caracterizadas cuentan con un alto potencial aprovechable para el sector agrícola, lo cual puede ayudar a disminuir la aplicación de pesticidas y fertilizantes químicos.

Palabras clave: PGPB, antagonismo, metabolitos secundarios, hongos fitopatógenos.

## Summary

Bacteria are part of the large number of microorganisms that exist as control agents for fungal and bacterial diseases. In addition, some of them can favor the growth and development of plants. These bacteria are known as plant growth promoting bacteria (PGPB) and they play a fundamental role in crops, since they allow the decreasing use of chemical fertilizers, increasing yield, shortening cycles and, consequently, reducing environmental pollution. The objective of this work was to isolate and characterize bacteria obtained from soil samples and strawberry plants (*Fragaria ananassa* var. Camino Real) collected from an organically managed orchard, located in the municipality of La Calera, Irapuato Guanajuato. Based on this, it is intended to take advantage of the bacteria characterized as potential biological control agents for various crops of economic importance. To isolate the bacteria, serial dilutions of soil and root were made to obtain axenic cultures, resulting in 13 bacteria. Antagonism tests were carried out against seven phytopathogenic fungi that attack various crops of economic importance such as *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Inhibition of the growth of these fungi was observed, in addition, reduction in the formation of sclerotia in the last two mentioned fungi. Extracts of bacterial metabolites on sclerotia germination were also tested. Interestingly, these bacteria did not inhibit the growth of the beneficial fungus *Trichoderma* sp. Biochemical characterization indicated that some members of the collection are potentially PGPB since they produce secondary metabolites such as organic acids for the solubilization of phosphates, and indole acetic acid. which is the main auxin in plants, capable of modulating plant growth and development, promoting crop performance. This effect was demonstrated in chili (*Capsicum annuum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings inoculated with bacterial cultures. These bacteria were identified by analysis of their DNA sequence from the 16S region. Among the identified genera *Pantoea* spp., *Variovorax* spp. and *Pseudomonas* spp. which are reported in the literature as biological control agents and promoters of plant growth. The characterized bacteria have a high usable potential for the agricultural sector, which can help decrease the application of pesticides and chemical fertilizers.

Key words: PGPB, antagonism, secondary metabolites, phytopathogenic fungi.

## Dedicatoria

A mi familia, mis gatos y mis simbioses.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Agradecimientos

A todos los compañeros de LAMIMO por su apoyo y cooperación.

Al Dr. Toño por toda su paciencia y atención.

A Eve por su amabilidad y disposición.

A la Dra. María del Rosario por ayudarnos a conseguir las muestras de fresa orgánicas y por prestarse a codirigir este trabajo de tesis.

A la Dra. Kruskaia y al Dr. Fidel por su tiempo, guía y comentarios.

Al Dr. Sergio Casas por proporcionarnos la cepa de *Botrytis cinerea*.

Al Dr. Edgardo Ulises Esquivel por el resto de los hongos fitopatógenos empleados en este estudio, y junto con Daniel Sánchez por los hongos del género *Trichoderma*.

Al Dr. Gerardo Nava de la Facultad de Química por aportarnos los oligonucleótidos para poder realizar la identificación molecular de las bacterias.

A Laura Cecilia Gutiérrez y Clara Gutiérrez del Langebio, Irapuato por apoyarnos con la secuenciación de los ITS ribosomal 16 S.

Al proyecto FOFI-UAQ: FNB201819. Efecto antagónico de bacterias presentes en rizósfera de fresa de manejo orgánico contra hongos fitopatógenos que dañan cultivos de interés agrícola. FOFI-UAQ 2018.

## Índice

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos .....	iv
Índice .....	v
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Cultivo de fresa .....	5
2.2 Control biológico.....	5
2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	7
Géneros representativos de PGPB.....	9
2.4 <i>Pseudomonas</i> .....	9
2.5 <i>Pantoea</i> .....	9
2.6 <i>Kluyvera</i> .....	10
2.7 <i>Microbacterium</i> .....	11
2.8 <i>Variovorax</i> .....	11
Mecanismos de acción de las PGPB.....	12
2.9 Antagonismo .....	12
2.10 Ácido Indol Acético.....	13
2.11 Sideróforos.....	14
2.12 Solubilización de fosfatos.....	15
Descripción de hongos fitopatógenos utilizados en este trabajo .....	16
2.13 <i>Alternaria alternata</i> .....	16
2.14 <i>Botrytis cinerea</i> .....	17
2.15 <i>Colletotrichum gleosporoides</i> .....	17
2.16 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	18
2.17 <i>Rhizoctonia solani</i> .....	18
2.18 <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	19
2.19 Esclerocios.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21

4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 General .....	23
5.2 Particulares .....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Obtención de las bacterias.....	24
6.2 Caracterización de colonias microbianas .....	24
6.3 Descripción macroscópica .....	25
6.4 Descripción microscópica.....	25
6.5 Pruebas de antagonismo contra hongos fitopatógenos .....	25
6.6 Pruebas bioquímicas.....	26
6.6.1 Solubilización de fosfatos .....	26
6.6.2 Producción de sideróforos .....	27
6.6.3 Determinación de ácido indol acético .....	27
6.6.4. Actividad quitinolítica .....	27
6.6.5 Prueba de motilidad.....	28
6.7 Resistencia a antibióticos.....	28
6.8 Curva de crecimiento .....	29
6.9 Identificación molecular de las bacterias por el fragmento ribosomal 16S 30	
6.9.1 Extracción del ADN.....	30
6.9.2 Amplificación por PCR del ITS ribosomal 16S.....	31
6.9.3 Purificación de productos de PCR y secuenciación.....	31
6.10 Efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas.....	32
6.11 Extracción de metabolitos secundarios .....	33
6.12 Inhibición de germinación de esclerocios con metabolitos secundarios..	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
7.1 Obtención de las bacterias.....	34
7.2 Caracterización de colonias microbianas .....	35
7.3 Identificación molecular de las bacterias aisladas.....	37
7.4 Prueba de antagonismo contra hongos fitopatógenos .....	39
7.5 Efecto en la germinación de esclerocios con los extractos de metabolitos secundarios.....	48
7.6 Prueba de antagonismo contra el hongo benéfico <i>Trichoderma</i> .....	52
7.7 Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas .....	55
7.7.1 Solubilización de fosfatos .....	55



7.7.2 Producción de sideróforos .....	57
7.7.3 Determinación de ácido indol acético .....	59
7.7.4 Actividad quitinolítica .....	60
7.7.5 Prueba de motilidad.....	61
7.8 Resistencia a antibióticos.....	64
7.9 Curva de crecimiento .....	67
7.10 Efecto promotor del crecimiento vegetal .....	71
8. CONCLUSIONES .....	75
9. BIBLIOGRAFÍA.....	78
10. APÉNDICE .....	91
10.1. Medios de cultivo.....	91
10.1.1 Agar nutritivo (AN) .....	91
10.1.2 Agar Luria-Bertani (LB).....	91
10.1.3 Caldo nutritivo (CN) .....	91
10.1.4 Papa dextrosa agar (PDA).....	91
10.1.5 Pikovskaya (PVK).....	92
10.1.6 Medio Fe-CAS .....	92
10.1.7 Caldo Tripteína Soya enriquecido con triptófano .....	93
10.1.8 Medio de quitina .....	93
10.1.9 Medio SIM.....	93
10.1.10 Agar Mueller - Hinton.....	93
10.2. Reactivos .....	94
10.2.1 Purpura de bromocresol .....	94
10.2.2 Reactivo de Kovac.....	94
10.2.3 Rojo Congo.....	94
10.3 Tablas suplementarias .....	94
10.4 Registro fotográfico .....	95
10.5 Secuencias ensambladas del gen 16S rRNA.....	97

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Descripción morfológica de las bacterias aisladas .....	35
<b>Tabla 2.</b> Identificación molecular de bacterias por análisis tipo BLAST .....	38
<b>Tabla 3.</b> Efecto antagonista sobre los hongos fitopatógenos. ....	47
<b>Tabla 4.</b> Efecto de las bacterias sobre <i>Trichoderma</i> . ....	52
<b>Tabla 5.</b> Prueba de motilidad.....	62
<b>Tabla 6.</b> Caracterización bioquímica de las bacterias. ....	63
<b>Tabla 7.</b> Susceptibilidad de las bacterias con la prueba de disco. ....	66
<b>Tabla 8.</b> Bacterias que presentaron de mayor a menor grado de resistencia ....	67
<b>Tabla 9.</b> Fase exponencial .....	70
<b>Tabla 10.</b> Diámetro del halo de inhibición en mm.....	94
<b>Tabla 11.</b> Curva de crecimiento.....	95

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diluciones seriadas.....	34
<b>Figura 2.</b> Amplicón de la región 16S.....	37
<b>Figura 3.</b> Efecto antagónico contra hongos fitopatógenos.....	39
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de inhibición sobre los hongos fitopatógenos.....	40
<b>Figura 5.</b> Efecto sobre la pigmentación <i>F. oxysporum</i> .....	43
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de los hongos fitopatógenos.....	46
<b>Figura 7.</b> Efecto en la germinación de esclerocios.....	50
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de inhibición sobre <i>Trichoderma</i> .....	53
<b>Figura 9.</b> Efecto sobre el crecimiento de <i>Trichoderma</i> .....	54
<b>Figura 10.</b> Reacción de la solubilización de fosfatos.....	55
<b>Figura 11.</b> Medio Pikovskaya.....	56
<b>Figura 12.</b> Medio Fe-CAS.....	58
<b>Figura 13.</b> Producción de ácido indol acético.....	59
<b>Figura 14.</b> Medio de cultivo con quitina.....	61
<b>Figura 15.</b> Concentración mínima de inhibición de BSAC (2013).....	65
<b>Figura 16.</b> Respuesta ante cada antibiótico por parte de las bacterias.....	67
<b>Figura 17.</b> Fases del crecimiento celular bacteriano.....	68
<b>Figura 18.</b> Curva de crecimiento de biomasa.....	69
<b>Figura 19.</b> Efecto promotor de crecimiento en plántulas de chile y jitomate.....	73
<b>Figura 20.</b> Efecto de los inóculos sobre plántulas de chile y jitomate.....	74

## 1. INTRODUCCIÓN

El componente microbiano del holobionte de la planta, también denominado fitomicrobiota (que comprende todos los microorganismos) o el microbioma de la planta (que comprende todos los genomas microbianos) en la rizósfera, la filósfera y la endosfera, tiene funciones importantes que apoyan el crecimiento y la salud de las plantas (Smith *et al.*, 2017).

Existen bacterias y hongos del fitomicrobioma asociados a diferentes estructuras de las plantas (flores, frutos, semillas, hojas y raíces) (Berg *et al.*, 2016), donde las condiciones pueden variar substancialmente en estas estructuras llevando a especializar a las poblaciones de microorganismos que habitan cada una. Algunas colonizan los tejidos vegetales internos, denominadas endófitas (ej., *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*), mientras que otras no tienen esta capacidad y son designadas como epífitas (ej., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp.). También se encuentran aquellas bacterias capaces de formar estructuras llamadas nódulos, las encontramos en raíces de plantas leguminosas, conocidas como simbióticas (ej., *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.), mientras que las que no poseen esta capacidad se llaman bacterias asociativas (Bécquer *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2009).

Las comunidades microbianas asociadas a las raíces (el rizomicrobioma) son las más pobladas y elaboradas debido a que las raíces forman un sistema que proporciona nichos ecológicos únicos para la microbiota del suelo (Backer *et al.*, 2018). De manera similar, las raíces de las plantas se encuentran también colonizadas internamente por una amplia gama de endófitos bacterianos. El ingreso de estos endófitos ocurre mediante procesos pasivos cuando llegan a romperse las raíces o ya sea por los brotes de raíces laterales. Para que la colonización y transmisión de endófitos sea efectiva requiere de la localización de los recursos de la planta y la habilidad del endófito para colonizarla. Los fila de endófitos más comunes son Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Chloroflexi, Firmicutes y Gemmatimonatedes (Compant *et al.*, 2019).

Las plantas son capaces de ejercer un control en la composición del rizomicrobioma (Zhang *et al.*, 2017), dependiendo de la especie de planta y genotipo pueden producir exudados de raíz como ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, moléculas que actúan como reguladores del crecimiento vegetal, nucleótidos, azúcares, putrescina, esteroides y vitaminas, estos pueden afectar la composición microbiana alrededor de las raíces, causando el llamado efecto rizósfera (Hartmann *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2013). Las plantas pueden incluso producir compuestos que reclutan especies específicas y regulan sus actividades bioquímicas y genéticas (Nelson y Sadowsky, 2015; Massalha *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2017). Por otro lado, las bacterias son capaces de responder con señales y compuestos de “*quorum sensing*” para comunicar cuando las condiciones son aptas para un cambio fisiológico colectivo (Chauhan *et al.*, 2015). Las plantas han evolucionado para responder al *quorum sensing* bacteriano y poder producir análogos, de esta manera mantienen la capacidad de regulación sobre el rizomicrobioma (Massalha *et al.*, 2017). Esta relación coevolutiva evidencia la función del fitomicrobioma sobre el desarrollo y subsistencia vegetal.

Los miembros del microbioma vegetal comprenden microorganismos beneficiosos, neutros o patógenos. Dentro de los benéficos destacan las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Bacteria por sus siglas en inglés PGPB) ya que pueden promover el crecimiento de las plantas por mecanismos directos o indirectos (Backer *et al.*, 2018), ya sea mediante la producción de antibióticos, enzimas líticas, compuestos volátiles inhibidores de patógenos y sideróforos. Algunas bacterias protegen a la planta de los patógenos a través de la modulación del nivel de hormonas vegetales e induciendo resistencia sistémica de la planta (Durán *et al.*, 2018).

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos en plantas dependen de la combinación de múltiples factores como el tamaño de la población del patógeno, la susceptibilidad del huésped, el ambiente favorable y los factores bióticos (como la microbiota de la planta) que determinan colectivamente el resultado de la interacción planta-patógeno (Brader *et al.*, 2017). Se ha demostrado

que las bacterias asociadas al rizomicrobioma de las plantas mejoran la resistencia del huésped contra la infección por patógenos, ya sea a través de interacciones comensales-patógenas o mediante la modulación de la defensa de la planta (Brader *et al.*, 2017). Las prácticas humanas se han convertido en uno de estos factores capaces de alterar dichas interacciones, debido a que pueden influir en la microbiota vegetal tanto en la superficie como al interior del suelo (Backer *et al.*, 2018). La agricultura intensiva ha contribuido a incrementar los cultivos, pero al mismo tiempo ha causado detrimentos físicos y biológicos de los suelos (Durán *et al.*, 2018) debido a la aplicación de los fertilizantes que intentan compensar la pérdida de la fertilidad de la tierra (Sergaki *et al.*, 2018). En los países de clima tropical, por ejemplo, las plantas son todavía más dependientes de esos fertilizantes. Generalmente, las plantas son capaces de utilizar solamente el 50 % del fertilizante aplicado, mientras que el resto no es aprovechado por el sistema suelo-planta causando pérdidas económicas y contaminación ambiental (Saikia y Vanita, 2007). La revolución verde contribuyó no solo en el mejoramiento por cruces de los cultivos, también introdujo fertilizantes orgánicos, pesticidas y herbicidas en los suelos dejando una extensa acumulación de contaminantes (Backer *et al.*, 2018). El uso de microorganismos benéficos como los PGPB puede reducir de manera segura los problemas que enfrenta la agricultura actualmente, además, de los daños ambientales y por ende a la salud que generan las prácticas empleadas comúnmente en la producción agrícola (Hartmann *et al.*, 2008; Backer *et al.*, 2018; Compart *et al.*, 2019).

Hoy en día, la producción de cultivos enfrenta muchos desafíos, como el cambio climático, el desarrollo demográfico y la demanda creciente de producción sostenible. Implementar el uso del fitomicrobioma puede ser una estrategia crucial en la supervivencia de las plantas que crecen en condiciones de estrés (Backer *et al.*, 2018) y satisfacer así las necesidades agrícolas para a su vez cumplir con el reto agroalimentario. Ya que diversos estudios han demostrado como los microorganismos de la rizósfera tienen el potencial de ser aplicados como biofertilizantes o bioplaguicidas, existe un interés creciente por integrarlos como alternativas a los productos químicos en las prácticas agrícolas (Sergaki *et al.*, 2018). Sin embargo, desarrollar un inóculo que contenga los PGPB efectivos con

una larga vida de utilidad y un alto grado de colonización de la rizósfera es el principal desafío. Ya que los PGPB son empleados con frecuencia para inocular plantas sin el manejo adecuado o en cantidades que no permiten la correcta colonización de la rizósfera bajo condiciones de campo. Además de la competencia con la micro y macro biota residente del suelo. Aún con esto, los inóculos se enfrentan a los suelos de los cultivos que son frecuentemente fumigados con biocidas de alto espectro que alteran las interacciones y la estructura de la comunidad microbiana de los suelos, que son fundamentales para la movilización y adquisición de nutrientes esenciales para las plantas (Dangi *et al.*, 2017; Backer *et al.*, 2018). Todo esto propone un reto para implementar el uso de inóculos bacterianos como agentes de control biológico.

El presente trabajo de tesis propone el uso de bacterias provenientes del fitomicrobioma de plantas de fresa, al ser cultivadas en una huerta con manejo orgánico suponen una menor perturbación en las interacciones entre las plantas con su rizósfera. Las especies aisladas han demostrado la capacidad de ser potenciales PGPB que pueden ser aprovechados ya sea utilizando la bacteria como tal o bien sus metabolitos secundarios para desarrollar futuros tratamientos en cultivos de interés económico.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Cultivo de fresa**

*Fragaria* spp. es originaria de las regiones templadas de Europa y América. En Europa se cultivaban principalmente las especies *Fragaria vesca* y *Fragaria alpina*, fue hasta el descubrimiento de América que se encontraron dos nuevas especies de mayor tamaño, una en Chile, *Fragaria chiloensis* y otra en Estados Unidos, *Fragaria virginiana*. Dentro de las más de 160 especies del género *Fragaria* se puede mencionar el híbrido resultante del cruce de *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, dando como resultado *Fragaria ananassa* nombre con el que se conoce todas las variedades de fresa (Kessel, 2012).

En México el cultivo de esta fruta comenzó con variedades originarias de Lyon, Francia, en el estado de Guanajuato; y en 1950, gracias a las demandas de Estados Unidos para completar su abastecimiento durante el invierno estas plantaciones empezaron a tomar mayor auge. Hasta finales de los 80's la producción de fresa ya se había establecido en otros Estados de la Republica, como Michoacán y Baja California. Actualmente el cultivo de fresa nacional aporta 1.14 % del PIB agrícola nacional. El 52.21 % de la producción nacional se destina al mercado externo, por lo que la fresa es un producto exitoso en el comercio internacional. México es el segundo proveedor de fresa fresca al mercado internacional, con 14.83 % del valor de las exportaciones mundiales. En particular, las exportaciones mexicanas representaron 87.79 % de las importaciones de Estados Unidos (SAGARPA, 2017).

### **2.2 Control biológico**

Las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea como en la raíz de las plantas hospederas. Algunas de ellas están presentes en la rizósfera, y pueden favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas (Backer *et al.*, 2018), lo que posteriormente conlleva a la producción o diseño de biofertilizantes. Los géneros con mayores reportes como agentes de control biológico, como supresores de patógenos son: *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia* y



*Paraburkholderia* (Gómez *et al.*, 2017). Y los taxa con mayor antagonismo contra *Fusarium* en escala continental son Acidobacteria, Actinobacteria, y Firmicutes. (Schlatter *et al.*, 2017).

El uso excesivo de pesticidas y fertilizantes químicos en la agricultura moderna ha dado lugar al deterioro en la fertilidad de los suelos y ha conllevado a la selección de microorganismos fitopatógenos resistentes en todo el mundo (Bravo *et al.*, 2006). Para hacer frente a estos problemas, el uso de productos de origen microbiano y fertilizantes orgánicos son una alternativa limpia en el control fitosanitario (Mondino y Vero, 2006). La mayoría de los microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico (Sousa *et al.*, 2009). En la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos regulan de manera natural a las enfermedades (Turner *et al.*, 2013). Dado que éstos poseen diversos mecanismos de acción, se reducen los riesgos de que los microorganismos fitopatógenos adquieran resistencia, lo cual se logra mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Berg *et al.*, 2014).

Por otra parte, se deben considerar otras características específicas del microorganismo antagonista, siendo las más importantes: su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente y efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos (Smith *et al.*, 2015). También, es importante que los agentes de biocontrol cuenten con un alto espectro sobre los antagonistas, además de diversos mecanismos que mejoren el crecimiento vegetal de manera directa, ya sea en la fijación de nitrógeno, solubilización de minerales de fosfato, secreción de hormonas, producción de sideróforos o la capacidad de formar biopelículas (Ahmad *et al.*, 2008). En la literatura los estudios de biocontrol de antagonistas empleando PGPB muestran el uso de una bacteria contra un solo patógeno *in vitro* seguido de su prueba *in vivo* sobre una planta con el mismo patógeno. Sin embargo, en el campo se encuentran

diferentes patógenos que a menudo afectan a un mismo cultivo. Debido a esto, es crucial seleccionar PGPB capaces de controlar múltiples fitopatógenos *in vivo* (Liu *et al.*, 2017).

La actividad de biocontrol en las bacterias puede ser mediada por metabolitos secundarios. Los cuales presentan una diversidad muy grande en cuanto a sus actividades y propiedades; no sólo por la variedad tan amplia que existe de los mismos, sino porque un mismo compuesto puede tener más de una actividad. Una gran proporción de los metabolitos secundarios conocidos tienen actividad antibiótica, esto debido a la capacidad para inhibir procesos metabólicos primarios que son esenciales para el microorganismo. La mayoría actúa como antimetabolito, ya que estructuralmente se asemejan a un metabolito normal permitiéndoles competir por el sitio de unión del mismo e interfiriendo con una actividad vital (Santana *et al.*, 1994).

### **2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Al grupo de bacterias antagonistas de enfermedades y que además potencian el crecimiento vegetal se les denomina de manera general PGPB. Dentro de su amplio espectro de acción podemos encontrar mecanismos indirectos, que son aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes microorganismos fitopatógenos (hongos y bacterias) que interfieren con el desarrollo de la planta y son neutralizados de diversas formas como: competencia por espacio o nutrientes, producción de metabolitos y antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los microorganismos fitopatógenos, producción de sideróforos (los producidos por estas bacterias tienen mayor afinidad por compuestos de hierro) y el incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los microorganismo fitopatógenos (Beattie, 2015; Pii *et al.*, 2015; Bender *et al.*, 2016). Y mediante mecanismos de tipo directo tales como la secreción de compuestos estimulantes los cuales puede incluir la fijación de nitrógeno, producción de hormonas, reducción de etileno en el suelo, solubilización de fosfatos y secreción de sideróforos, entre otros (Pii *et al.*, 2015; Backer *et al.*, 2018).

Se ha establecido que las PGPB, juegan un papel primordial en los cultivos, permiten disminuir el uso de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental (Park *et al.*, 2005). Los PGPB se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico, sin embargo, se debe tener en cuenta que el impacto que tienen las interacciones entre los cultivos y el microbioma, tanto edáfico como asociado a las plantas, sobre la dinámica de los nutrientes puede ser considerable. En este sentido, el incremento de biomasa vegetal debido a la inoculación con PGPB puede afectar los procesos de mineralización de nutrientes, solubilización de fosfatos, fijación biológica de nitrógeno y otros procesos biológicos asociados a la dinámica de los nutrientes en el sistema productivo (García de Salamone *et al.*, 2009). Por ello, se requiere un conocimiento detallado de las interrelaciones que se presentan entre microorganismos agregados al sistema (inoculantes) y los nativos presentes en el suelo y asociados a las plantas.

La intensidad de la asociación planta-bacteria revela la capacidad de estos microorganismos de adaptarse selectivamente al nicho ecológico específico determinado por la planta y su entorno. Esta capacidad determina que las PGPB ocupen y algunas veces desplacen por competencia a otros organismos patógenos o generen una respuesta de inmunidad o resistencia que aumente las defensas de la planta hacia la invasión de patógenos (Pedraza *et al.*, 2010).

La incorporación de organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos que contribuyan a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que permite lograr aumento en el crecimiento radical. Así, se favorece la exploración del suelo y se mejora la accesibilidad al agua y nutrientes limitantes para los cultivos. Como consecuencia, se reducen procesos de pérdida de nutrientes móviles, se atenúan períodos de moderado estrés hídrico y se logra mantener tasas de crecimiento activo del cultivo mejorando su capacidad fotosintética (Díaz-Zorita y Fernández, 2008).

## **Géneros representativos de PGPB**

### **2.4 *Pseudomonas***

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la familia Pseudomonaceae (Gram negativa), han sido utilizadas como PGPB tanto por sus efectos directos (Naiman *et al.*, 2009) como indirectos (Santoyo *et al.*, 2012). Este género es frecuentemente referido por su actividad de PGPB vinculada a efectos indirectos, a través del control de microorganismos patógenos como bacterias, hongos, nematodos y virus, los cuales pueden llegar a reducir considerablemente la producción de cultivos. Producen compuestos antifúngicos que pueden suprimir enfermedades a través de varios mecanismos, que incluyen una mayor capacidad competitiva por los nutrientes disponibles, síntesis de fitohormonas y de vitaminas que estimulan la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, producción de antibióticos, ácido cianhídrico, sideróforos e inducción de resistencia sistémica que hace que puedan tolerar el ataque de diversos microorganismos fitopatógenos del suelo (Ji *et al.*, 2006; Chaves, 2007; Smith *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017; Backer *et al.*, 2018). Por otro lado, varias cepas de *Pseudomonas* han sido caracterizadas como solubilizadoras de fosfato por su capacidad de producir ácidos orgánicos (ácido oxálico, fumárico y cítrico) y enzimas fosfatasas, facilitando la asimilación del P inorgánico y otros nutrientes por parte de la planta (Ferraris y Couretot, 2004).

### **2.5 *Pantoea***

Es una rizobacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Son comunes endófitos del arroz; el género incluye tanto a PGPB como a patógenos de plantas y animales (Kim *et al.*, 2012). Es un grupo diverso y versátil, algunos de sus primeros miembros fueron reconocidos como patógenos de plantas causando agallas, marchitez, podredumbre y necrosis en gran variedad de plantas. Aunque, a menudo se lo considera un patógeno de la planta, la evidencia reciente sugiere que *Pantoea* se está aislando con frecuencia del entorno nosocomial, con un debate considerable sobre su papel en la enfermedad humana. Múltiples estudios reportan frecuentemente haberla aislado de muchos

ambientes acuáticos y terrestres, así como en asociación con insectos, animales y humanos. (Nadarasah y Stavrinides, 2014).

Se ha caracterizado la capacidad de *Pantoea* para sintetizar sideróforos, celulasa, AIA, solubilización de fosfato *in vitro* y la actividad antagonista contra patógenos de plantas. La inoculación de arroz con *Pantoea* incrementa significativamente el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos, indicando su alto potencial para uso como un inoculante comercial (Megías *et al.*, 2016).

Algunas especies son capaces de producir compuestos antimicrobianos los cuales han sido desarrollados como productos de biocontrol, mientras que otros como agentes de bioremediación con la capacidad de degradar herbicidas (Pileggi *et al.*, 2012). Otros aislados han sido aprovechados como inmunopotencializadores para el desarrollo de medicamentos para tratar el melanoma, infecciones, alergias y revertir la inmunosupresión (Nakata *et al.*, 2011). Su versatilidad y plasticidad genética lo convierte en un grupo ideal no solo para explorar un nicho específico por su lábil adaptación y oportunismo, sino también, para el desarrollo de productos médicos, agrícolas y medioambientales comercialmente relevantes (Walterson y Stavrinides, 2015). El hecho de que este microorganismo pueda vivir en hábitats tan variados como pueden ser el suelo, el agua y el interior de una planta, representa una ventaja evolutiva, ya que le brinda una mayor capacidad de respuesta ante variaciones del ambiente que pueden ser de origen abiótico o biótico, y permitiría su posible uso como biofertilizante (Cordero *et al.*, 2008).

## **2.6 *Kluyvera***

Es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, se han reportado algunas especies como PGPB, debido a su capacidad para utilizar ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como única fuente de nitrógeno, lo que le confiere la habilidad de actuar como una ACC-desaminasa, además, de estimular el crecimiento de raíces en las plantas. Al hidrolizar ACC en la germinación de semillas, puede reducir el nivel de ACC y, por lo tanto, el nivel de etileno en las semillas, promoviendo así la germinación (Burd *et al.*, 2000). También, ha sido reportado su efecto como estimulante del alargamiento de la raíz en cultivos de

canola y tomate, donde se observó, que las células de *Kluyvera* tienen la capacidad de unirse a la capa externa de las semillas. Esta biocapa tiene la capacidad de disminuir la toxicidad por metales pesados como el níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), protegiendo las semillas y permitiéndoles germinar. Su efectividad para proteger a las plantas de la inhibición del crecimiento causada por la presencia de altas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$ , es gracias a la producción de sideróforos (Ahemad y Kibret, 2014; Burd *et al.*, 2000). *Kluyvera* tiene potencial para ser empleada en el desarrollo de estrategias de bioremediación en suelos donde los metales pesados excedan el límite de tolerancia por parte de las plantas. Ayudando a las plantas inoculadas a incrementar su habilidad de bioacumulación de metales pesados (Burd *et al.*, 2000).

### **2.7 *Microbacterium***

El género pertenece a la familia Microbacteriaceae, Gram positiva. Miembros del género han sido aislados de una amplia variedad de ambientes incluyendo suelo, insectos, humanos, ambientes marinos, plantas, ente otros. Es un género común de endófitos resistentes a metales pesados, empleado como PGPB debido a su producción de AIA, sideróforos, 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa y su solubilización de fosfato inorgánico (Xue-Min *et al.*, 2019). Presenta un mecanismo de acción directo como la producción de las fitohormonas auxinas, citoquininas y giberelinas, lo cual genera una estimulación en el número de raíces y elongación del tallo (González y Fuentes, 2017).

### **2.8 *Variovorax***

Es una bacteria aeróbica, Gram negativa el género pertenece a la familia Comamonadaceae. Presente en diversos ambientes y está asociada a numerosas biotransformaciones (Satola *et al.*, 2013). Las células forman colonias de color amarillento debido a la producción de carotenoides. Algunas especies son facultativas litoautotróficas empleando  $\text{H}_2$  como fuente de energía, otras son quimiorganotróficas. Sus células son generalmente capaces de producir poli 3-ácido hidroxibutírico como fuente de carbono intracelular por periodos en los cuales el carbono extracelular se encuentra escaso o no accesible (Kim *et al.*, 2006).

Muchas se encuentran asociadas a importantes procesos catabólicos incluyendo la degradación de compuestos tóxicos y químicos pesados (Satola *et al.*, 2013). Diversas especies de *Variovorax* están relacionadas en interacciones mutualistas con plantas y otras especies de bacterias en diversos ecosistemas. El género contiene especies prometedoras para la biorremediación, el control biológico y otras aplicaciones biotécnicas (Wang *et al.*, 2016).

## **Mecanismos de acción de las PGPB**

### **2.9 Antagonismo**

El antagonismo es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Pérez, 2004). Los antagonistas cuentan con diversos mecanismos de control sobre los patógenos y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección al momento de emplearlos. Determinar las interacciones que intervienen entre los antagonistas y los patógenos en la planta es fundamental para el desarrollo de agentes de biocontrol (Michel-Aceves *et al.*, 2008). Algunos de estos mecanismos de acción son la antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas con el patógeno (parasitismo y lisis celular enzimática) e inducción de resistencia sobre el huésped.

1) La antibiosis se considera un proceso de interacción entre organismos el cual es mediado por metabolitos específicos y no específicos que inhiben o destruyen a uno o más organismos. Estos pueden ser agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles, entre otras sustancias tóxicas, que normalmente actúan en bajas concentraciones. Estas sustancias pueden ser producidas sin que derive algún beneficio directo del antagonista (Pérez, 2004; Michel-Aceves *et al.*, 2008).

2) La competencia es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, ya sea por nutrientes o espacio dentro de su

nicho ecológico, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás, generando la escasez o limitación de un elemento, al final se impone uno de ellos (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006; Michel-Aceves *et al.*, 2008).

3) En el parasitismo el organismo antagónico utiliza al patógeno como alimento, generalmente esto implica enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3 glucanasa y proteasas, que rompen las estructuras celulares de los hongos parasitados (Pérez, 2004).

4) La resistencia sistémica adquirida consiste en la excreción de moléculas producidas por los microorganismos antagonistas, con la capacidad de inducir autodefensa en las plantas frente al efecto de los patógenos. Existen dos tipos de resistencia: la constitutiva, propia de la planta y que se expresa en cualquier momento, y la inducida, expresada solo ante determinados estímulos. Las interacciónes planta-patógeno es de dos tipos: compatible, cuando ocurre la enfermedad, e incompatible, cuando la planta resiste la enfermedad (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

### **2.10 Ácido Indol Acético**

Las fitohormonas pueden funcionar como señales moleculares en respuesta a factores medioambientales que de otra manera limitarían el crecimiento vegetal (Fahad *et al.*, 2015). Entre las fitohormonas el ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina en las plantas. Algunas bacterias, como las PGPB, tienen la capacidad de producir diferentes auxinas, entre ellas destaca el AIA que está involucrado en una interacción entre planta-microbioma, donde la función del AIA exógeno es dependiente de los niveles de AIA endógenos en plantas (Ahemad y Kibret, 2014). Las PGPB que producen auxinas pueden inducir sobre las plantas cambios transcripcionales en genes relacionados con la síntesis de hormonas, defensas, pared celular, inducir el alargamiento e incremento de biomasa de raíces, disminuir la densidad y tamaño de los estomas, así como activar la respuesta de los



genes de la síntesis de auxinas que mejoran el desarrollo vegetal (Llorente *et al.*, 2016).

Actualmente se ha descrito que algunas PGPB son capaces de modular los niveles de AIA, mediante rutas metabólicas dependientes del precursor triptófano (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Las plantas superiores exudan, entre otros componentes el aminoácido triptófano, que es el principal precursor para la biosíntesis de AIA microbiano (Spaepen y Vanderleyden, 2011; Ahemad y Kibret, 2014). En respuesta el AIA bacteriano modula el crecimiento y desarrollo de las plantas, principalmente participa en procesos fisiológicos tales como el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido, en respuestas de defensa, formación de xilema y raíz, deformación y aumento de pelos radiculares, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Santhner *et al.*, 2009). Estos efectos son especialmente significativos en los estadios iniciales del desarrollo vegetal ya que son los más vulnerables para el establecimiento de las plántulas.

### **2.11 Sideróforos**

Otros elementos importantes para los cultivos y poco accesibles para las plantas es el hierro (Fe), que puede encontrarse de manera abundante en los suelos, pero su forma química hace que sea inaccesible para las plantas. El hierro es un metal esencial para el metabolismo celular como cofactor de numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración y fotosíntesis (Greenshields *et al.*, 2007). A pesar de su abundancia en la naturaleza, se encuentra escasamente disponible debido a su rápida oxidación de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  y la subsecuente formación de hidróxidos insolubles (Harrington y Crumbliss, 2009). La materia orgánica puede aumentar la disponibilidad de hierro al favorecer el crecimiento de las poblaciones microbianas, las cuales pueden consumir oxígeno en condiciones de anegamiento o descomponer la materia orgánica para liberar el hierro de los compuestos orgánicos en formas asimilables para las plantas (Ahmed y Holmstrom, 2014). Debido a las

reacciones mencionadas previamente que resultan en una baja disponibilidad de hierro, este metal debe ser mantenido en solución por ciertos agentes, como los llamados ligandos (agentes quelantes). Existen dos tipos de ligandos producidos por los seres vivos que forman quelatos con el hierro; los sintetizados por los microorganismos, conocidos como sideróforos microbianos o simplemente sideróforos, y los producidos por las plantas, conocidos como fitosideróforos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Muchas bacterias son capaces de incrementar la accesibilidad del Fe a través de la producción de ácidos orgánicos o sideróforos (Ahmed y Holmstrom, 2014). Los microorganismos con la capacidad de producir sideróforos cuentan con proteínas especializadas llamadas bacterioferritinas, las cuales confieren a las células la habilidad de funcionar como fuentes de almacenamiento de hierro cuando estas crecen en abundancia de este metal (Wandersman y Delepelaire, 2004). Los sideróforos también actúan como control de microorganismos patógenos privándoles de este micronutriente esencial (Ahmed y Holmstrom, 2014; Saha *et al.*, 2016).

## **2.12 Solubilización de fosfatos**

El fósforo (P), después del nitrógeno (N), es el elemento más crítico para la producción agropecuaria; pero su disponibilidad es cada vez más limitada debido a la progresiva insuficiencia de sus fuentes naturales, su relativa escasez edáfica, elevada retención por parte de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y su baja movilidad comparada con la de otros nutrientes (Rubio, 2002).

Los microorganismos realizan la mayoría de los ciclos biogeoquímicos; por tanto, su función es fundamental para mantener el equilibrio de los agroecosistemas. Entre estos microorganismos resaltan los solubilizadores de fosfato, reconocidos promotores de crecimiento vegetal (Rashid *et al.*, 2004). En muchos suelos se encuentran grandes reservas de fósforo insoluble, resultado de la fijación de gran parte de los fertilizantes fosforados aplicados, que no pueden ser asimilados por las plantas. Los microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) utilizan diferentes mecanismos de solubilización, como la producción de ácidos orgánicos, que solubilizan dichos fosfatos insolubles en la zona rizosférica (Nautiyal

*et al.*, 2000). Lo cual ayuda a las plantas a acceder a las reservas no lábiles de P, liberándolo de sus formas recalcitrantes de P inorgánico complementándolo con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Al}^{3+}$  solubilizado por ácidos orgánicos o iones de  $\text{H}^+$  excretados, de igual manera una fitasa producida por los MSF puede liberar el P reactivo de los compuestos orgánicos presentes en el suelo (Backer *et al.*, 2018). Los MSF movilizan el fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces lo cual mejora el crecimiento y productividad al tiempo que las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez *et al.*, 2007). Al utilizar esas reservas de fosfato presentes en los suelos, se disminuye la aplicación de fertilizantes químicos (Backer *et al.*, 2018). A su vez, los ácidos orgánicos producidos por los MSF son capaces de reducir la toxicidad por metales pesados al usar estos compuestos para transformar las especies de metal a sus formas inmóviles o quelándolas para su movilidad hacia los tejidos de las plantas para su futura fito-extracción (Ahemad, 2015).

## **Descripción de hongos fitopatógenos utilizados en este trabajo**

### **2.13 *Alternaria alternata***

Su metabolismo puede ser tanto sapotrófico como endofítico por lo cual puede ser un agente causal de enfermedades en varios cultivos de frutas y verduras (Thomma, 2003). *Alternaria alternata* causa enfermedades en varios cultivos de importancia económica como lo son el brócoli, tomate, chile, papa, naranjas y manzana. Es capaz de producir varios metabolitos secundarios que pueden ser toxinas específicas o no del huésped (Friesen *et al.*, 2008; Meena *et al.*, 2016). Las especies de *Alternaria* son patógenos versátiles que contaminan varias plantas de cultivo, frutas postcosecha, productos alimenticios refrigerados, y que también afectan las diferentes etapas de desarrollo de las plantas (Meena y Samal, 2019).

Existen numerosas toxinas producidas por *Alternaria* que han sido reportadas como citotóxicas, genotóxicas, mutagénicas, fetotóxicas o con actividad teratógena. En las células microbianas y de mamíferos, estas toxinas causan efectos mutagénicos, oestrogénicos y clastogénicos al inhibir la proliferación celular. A

pesar del hecho de que las toxinas de *Alternaria* pueden originarse en casi todos los alimentos y productos alimenticios y que tienen la potencia de exhibir efectos nocivos en la salud humana y animal (Rychlik *et al.*, 2016), actualmente no se cuenta con las regulaciones internacionales o nacionales para prohibir la presencia de las toxinas de *Alternaria* en alimentos y piensos (Menna y Swammala, 2019).

#### **2.14 *Botrytis cinerea***

Es el agente causal de la podredumbre gris también conocida como moho gris, se ha reportado como patógeno de más de 200 especies vegetales distintas, ocasiona graves pérdidas económicas, debido a que *Botrytis cinerea* ataca al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta (Elad *et al.*, 2004). El método más común para su control es el empleo de agentes químicos, sin embargo, esta estrategia tiende a ser cada vez menos recomendable y con mayores restricciones debido a las consecuencias ambientales y daños a la salud que derivan de su aplicación, además de la selección de cepas resistentes a los fungicidas como benzimidazoles y dicarboximidias (Benito *et al.*, 2000). Por ello es importante comprender el ciclo de vida del patógeno para caracterizar los factores de patogenicidad y desarrollar estrategias de control biológico.

#### **2.15 *Colletotrichum gleosporoides***

Es causante de enfermedades prácticamente en todas las cosechas agrícolas del mundo (Whitelaw *et al.*, 2007). Los síntomas típicos de la infección por *Colletotrichum gleosporoides* se denominan 'antracnosis' que se caracterizan por el hundimiento necrosado del tejido donde se producen masas de conidias dentro de un acérvulo (Freeman *et al.*, 2000). La antracnosis se presenta en tejidos de plantas en desarrollo y maduros, afecta frutos durante su desarrollo en el campo, así como frutos maduros durante su almacenaje (Prusky *et al.*, 2001). puede permanecer latente en los cultivos debido a su capacidad de formar esclerocios, esperando que surjan condiciones adecuadas de temperatura y humedad para causar daños, principalmente en los frutos, los que a consecuencia de ello presentan síntomas como manchas oscuras, hundidas, circulares o angulares, con presencia de masas

de conidios de color rosa o salmón (Ceja *et al.*, 2000). Este patógeno se presenta en temporada de lluvias y en condiciones de alta humedad relativa, causando daños en cualquier etapa fenológica, y también en postcosecha (Yakoby *et al.*, 2001). Dentro del país es normalmente controlado con agroquímicos, lo que contrarresta los daños, aunque resultan ser escasamente efectivos debido al desconocimiento de la biología, los hábitos y, principalmente, la distribución espacial de los organismos patógenos (Tapia *et al.*, 2020).

### **2.16 *Fusarium oxysporum***

Es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse y Rep 2009). Es el agente causal de la marchitez vascular. Esta enfermedad afecta al menos 32 países en gran diversidad de condiciones ambientales y diversos cultivos (Amaral *et al.*, 2008). Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Retana *et al.*, 2018). *Fusarium oxysporum* es un organismo muy amplio a nivel de especie, se han clasificado más de 120 diferentes formas especiales (*formae specialis*). Este término está basado en la infección que produce el patógeno en un hospedante específico. Las formas especiales a su vez se subdividen en razas, las cuales han sido descritas al basarse en la habilidad del patógeno de infectar diferentes haplotipos o variedades en una especie hospedante. Debido a su gran variabilidad genética y su amplia distribución, el manejo de esta enfermedad resulta difícil (Pires da Silva *et al.*, 2014).

### **2.17 *Rhizoctonia solani***

Es un importante patógeno de plantas, tiene un amplio rango de hospedadores, atacando los cultivos tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas, incluidos muchos cultivos económicamente importantes. Produce estructuras de resistencia tales como esclerocios, las cuales le permiten sobrevivir

en condiciones adversas. Es el agente causal de la podredumbre de la raíz. Afecta principalmente a las plántulas, ocasiona cortes y fracturas en las raíces, lo cual perjudica las funciones de soporte y absorción de la raíz. Generando pérdida severa de rendimiento vegetal o la muerte de la planta. En el campo las plantas exhiben parches de retraso en el crecimiento o pérdida de plántulas, especialmente en los sistemas de producción sin labranza (Aliferis y Jabaji, 2012; Mutuku y Nose, 2012).

Las infecciones necrotróficas transmitidas por *Rhizoctonia solani* son difíciles de controlar, debido a su longevidad en el suelo, al ser un saprófito facultativo, su capacidad para superar o evadir las defensas de las plantas, la logística, el costo y la eficacia de las aplicaciones de fungicidas. Ya que *R. solani* es capaz de causar enfermedades en más de una especie de huésped, dificulta las medidas de rotación de cultivos. De igual manera, la resistencia a los fungicidas es un problema frecuente, además de que no se ha detectado una resistencia genética nativa ante este patógeno por parte de las plantas (Okubara *et al.*, 2014). Sin embargo, *R. solani* tiene limitaciones para su propagación a larga distancia, ya que no produce esporas asexuales (García *et al.*, 2006).

### **2.18 *Sclerotium rolfsii***

El tizón esclerótico es una enfermedad fúngica importante causada por *Sclerotium rolfsii* durante el período de cultivo temprano y se ha observado en lechos de plantas, en plantas maduras como manchas circulares y en tubérculos como una enfermedad posterior a la cosecha. Es un patógeno fúngico que causa enfermedades graves y que afecta a diversos cultivos en todo el mundo, particularmente en países tropicales y subtropicales (Xie, 2012). Debido a su amplia gama de hospederos, *S. rolfsii* es considerado uno de los patógenos más destructivos del mundo; alrededor de 500 especies de plantas de 100 familias, incluidos tomates, papas, chiles, zanahorias, repollo, batatas, frijoles comunes y nueces (Chandra *et al.*, 2017), se ven afectados por este patógeno. El hongo generalmente infecta la región de los tallos cerca de la superficie del suelo y se extiende sobre toda la planta o frutos y permanece en la superficie del suelo (Mahadevakumar *et al.*, 2016). Es capaz de producir esclerocios en los huéspedes,

lo cual le facilita la supervivencia y pasar el invierno durante mucho tiempo e infectar el mismo cultivo huésped u otros cultivos cercanos (Xu, 2008).

### **2.19 Esclerocios**

Son estructuras duras en latencia formadas por la agregación de hifas. Un esclerocio comúnmente está conformado por un tejido pseudoparenquimatoso y corteza melanizada que encierra una gran medula de hifas entretejidas. Se forman a partir de micelios que continúan diferenciando y enredándose entre sí para formar un micelio más oscuro y duro que resista ambientes con nutrientes agotados y/o adversos (Lau y Abdullah, 2017; Song, 2018). Son morfológicamente variables y ricas en nutrientes con diámetros que van desde 1 mm a 40 mm, y pueden permanecer inactivos o en latencia cuando se encuentran en circunstancias adversas, como la desecación, ataque microbiano, o la ausencia a largo plazo de un huésped o restos vegetales (Smith *et al.*, 2015; Lau y Abdullah, 2017). Los esclerocios pueden sobrevivir a condiciones que son demasiado hostiles para hifas y esporas vegetativas ordinarias. Se ha reportado que la habilidad de supervivencia de los esclerocios es alrededor de 78 a 100 % en suelos sin cultivar en un periodo de 3 a 5 años. Son resistentes a productos biológicos, químicos y degradación física (Wu *et al.*, 2008). Se han estudiado los mecanismos moleculares implicados en su formación. Revelando estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno), señales de transducción (canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y vías de la proteína quinasa activada por mitógeno), y regulación de la expresión génica (expresión diferencial de importantes enzimas o genes de proteínas estructurales) (Sun *et al.*, 2020).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente el panorama global experimenta mayor demanda en la producción de cultivos, tanto para satisfacer las necesidades alimenticias de la población humana como de rastrojo para el ganado, sin mencionar materia prima para diversas industrias. Esta demanda es debido a la creciente población humana y los hábitos occidentales de consumo. Las estrategias habituales en el sector agrícola han ocasionado el deterioro de suelos, la contaminación de cuerpos de agua, daños a la salud humana, pérdida de biodiversidad y tala excesiva. Dichas estrategias consisten en el uso frecuente de agroquímicos y biocidas. Aunado a esto, se suman las consecuencias del cambio climático que suponen un estrés sobre los cultivos. Es crítico emplear nuevas estrategias para el manejo de plagas y la fertilización de los suelos que no impliquen las mismas consecuencias, acumuladas en décadas de explotación de los suelos. Es por esto, que la propuesta por usar microorganismos pertenecientes al fitomicrobioma de las plantas sugieren un método seguro y eficaz para suplir gradualmente el uso de químicos. Sin embargo, el empleo de estos organismos aun representa un reto al momento de seleccionar y administrar las especies adecuadas y en las condiciones efectivas.

Para ello, se requieren diversos estudios antes de incorporar nuevas cepas bacterianas al ecosistema. Por su parte, una vez realizadas las pruebas correspondientes la aplicación de estos organismos conlleva varias ventajas por sobre las estrategias empleadas comúnmente. Como lo son: 1) los bajos costos, ya que su producción representa un gasto menor al de los químicos; 2) una cepa puede combatir diversos fitopatógenos, además, de que genera presión biológica que no permite se seleccionen patógenos resistentes; 3) no empobrece los suelos, ni generan residuos en el ambiente, y 4) pueden ejercer tanto mecanismos de control de plagas como de promotores del desarrollo vegetal, reduciendo el uso de fertilizantes.

Por lo tanto, este trabajo pretende aportar nuevas alternativas de microorganismos aislados de las cercanías del Estado para ser empleados como posibles agentes de control biológico y aprovechar sus capacidades como PGPB.



#### **4. HIPÓTESIS**

Las bacterias endófitas y del suelo de la huerta de fresa con manejo orgánico, antagonizan hongos fitopatógenos de cultivos de importancia económica, además de poseer características fisiológicas que permiten promover el crecimiento vegetal.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

Identificar bacterias con potencial como agentes de control biológico y caracterizar los mecanismos fisiológicos relacionados con la capacidad de promover el crecimiento vegetal y antagonizar hongos fitopatógenos.

### 5.2 Particulares

- 1.- Determinar la identidad de las bacterias de interés por medio de la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr.
- 2.- Determinar el efecto antagónico de las bacterias seleccionadas contra los hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*.
- 3.- Evaluar las características fisiológicas relacionadas con la capacidad de promover el crecimiento vegetal.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Obtención de las bacterias**

Para este proyecto de tesis se utilizaron seis criotubos que contenían una mezcla de bacterias incluidas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO) en la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada (UMBA), perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto. Dichas muestras fueron obtenidas a partir de muestras de suelo y de raíz de plantas de fresa (*Fragaria ananasa* variedad Camino Real) provenientes de una huerta de fresa con manejo orgánico, ubicada en El Ejido La Calera, Irapuato, Gto., del año 2015.

Para ello previamente se prepararon diluciones seriadas de las muestras en condiciones de esterilidad. Se tomaron 10 g de las raíces, se lavaron con hipoclorito de sodio al 2 %, se enjuagaron con agua destilada estéril y se maceró el tejido vegetal para obtener bacterias endófitas, la solución se suspendió en 90 mL de agua destilada estéril. De las muestras de suelo se tomaron 10 g homogenizados y se adicionaron 90 mL de agua destilada estéril. Las soluciones se homogenizaron en vórtex. Se tomó 1 mL de la suspensión con pipeta estéril y se transfirió a 9 mL de agua destilada estéril, este proceso de dilución se repitió tres veces, para obtener diluciones seriadas ( $10^{-5}$ ). Se sembró en placas de agar nutritivo (AN, ver apéndice 10.1.1) y agar Luria-Bertani (LB, ver apéndice 10.1.2), usando perlas de vidrio para su distribución y se incubaron a 37 y 28 °C durante 24 horas (Gowsalya *et al.*, 2014).

### **6.2 Caracterización de colonias microbianas**

De los criotubos se sembró una alícuota de la muestra en placas de medio de cultivo LB y AN, según correspondiera. Se estirió con asa bacteriológica y se incubó a 28 y 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se observó la morfología colonial de las bacterias aisladas. Fueron seleccionadas aquellas que presentaron distinta morfología colonial para realizar la descripción macroscópica y microscópica.

### **6.3 Descripción macroscópica**

Se describió la morfología de la colonia, tamaño, color, borde, acompañada de registros fotográficos.

### **6.4 Descripción microscópica**

Se realizó tinción de Gram para determinar la morfología de las células bacterianas, así como el tipo de agregación, mediante observación microscópica con el objetivo 100x.

### **6.5 Pruebas de antagonismo contra hongos fitopatógenos**

Las bacterias fueron sembradas en Caldo Nutritivo (CN, ver apéndice 10.1.3) a 28 °C por 48 horas en agitación constante (150 rpm). Se cortaron discos de papel celofán estéril para ser utilizados en cajas de Petri (90 mm x 15 mm), el disco se colocó en condiciones asépticas sobre el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA, ver apéndice 10.1.4). Posteriormente se distribuyeron de forma homogénea 80 µL del cultivo sobre el celofán con un hisopo estéril, se incubó a 28 °C por 48 horas. Se retiró el papel celofán con pinzas (flameadas para esterilizar continuamente) y en el centro de la caja se inoculó un disco de micelio de 1 mm de diámetro de los hongos fitopatógenos (Karimi *et al.*, 2012; Naureen *et al.*, 2009): *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gleosporoides.*, *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*. Para observar si las bacterias interferían con el crecimiento de otros organismos benéficos de la rizósfera, se realizó el mismo procedimiento con los hongos *Trichoderma atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. harzianum*. Como control se inocularon los hongos en medio PDA sin tratamiento. Se incubaron a temperatura ambiente con luz. Los cultivos se mantuvieron en incubación por una semana o hasta que el crecimiento del hongo control llenase la caja. Con la ayuda de un Vernier se midió el crecimiento de la colonia (Arzate-Vega *et al.*, 2006). Fueron realizadas tres réplicas de estas pruebas.

La variable a considerar fue el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de los fitopatógenos calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(D1 - D2) / D1] \times 100$$

Donde:

D1 = diámetro de la colonia control de los hongos creciendo en cajas con PDA libre de inhibidores.

D2 = diámetro de la colonia de los hongos creciendo en cajas donde antes crecieron las bacterias sobre el papel celofán.

(Worasatit *et al.*, 1994).

Con el programa Excel se analizaron los porcentajes de inhibición entre los tratamientos para determinar la efectividad de los compuestos producidos por las bacterias.

## **6.6 Pruebas bioquímicas**

Para determinar las características enzimáticas y metabólicas de las bacterias sujeto de estudio se realizaron pruebas con diferentes medios de cultivos o condiciones selectivas. Fueron realizadas tres réplicas de cada experimento.

### **6.6.1 Solubilización de fosfatos**

A partir de cultivos líquidos de bacterias en CN (24 horas de incubación a 28 °C), se tomaron 80 µL para siembra en superficie por duplicado en cajas de Petri, usando el medio específico Pikovskaya (PVK, ver apéndice 10.1.5), que contiene fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como única fuente de P, además de púrpura de bromocresol al 0.04 % (ver apéndice 10.2.1) como indicador para observar si la colonia acidifica el medio de cultivo (Pikovskaya, 1948). Las muestras se incubaron a 28 °C y se observaron durante 5 días. La capacidad de solubilización se determinó observando la presencia de un halo de transparencia alrededor de la colonia.

### 6.6.2 Producción de sideróforos

Se inocularon 30  $\mu$ L de cultivo líquido de cada bacteria en el medio sólido Cromo Azurol Sulfonato CAS Agar (ver apéndice 10.1.6), el cual consiste en cuatro soluciones. La solución uno que funciona como indicadora contiene  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  mezclado con CAS (Cromo azurol S) y HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimetilamonio). La solución dos está preparada a partir de sales donde se diluye PIPES (piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico] )  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH de 6.8 ajustado con una solución de KOH al 50 %. La solución tres que contiene la fuente de carbono como glucosa, manitol y elementos traza. Y la solución cuatro que consiste en casaminoácidos al 10 % esterilizados por filtración. Cada solución se esteriliza por separado (Alexander y Zuberer, 1991). Las placas se incubaron de tres a cinco días a 28 °C. Se evaluó la producción de sideróforos, a partir de halos de coloración naranja como indicador generado por la quelación del hierro.

### 6.6.3 Determinación de ácido indol acético

A partir de cultivos de las bacterias de interés (AN crecido a 28 °C por 24 horas previamente), con la ayuda de un palillo de madera estéril se inoculó el medio de cultivo líquido de tripteína soya enriquecido con triptófano (ver apéndice 10.1.7) y se incubó durante 48 horas a 28 °C en agitación constante. La determinación de la producción del AIA se realizó mediante el método colorimétrico, utilizando 2 mL del reactivo de Kovacs (ver apéndice 10.2.2), que consiste en ácido clorhídrico y p-dimetilaminobenzaldehído (Boué *et al.*, 2011), la pigmentación rosa a rojo en el medio fue considerada como positivo. Como control positivo se empleó la bacteria *Escherichia coli* y como negativo *Salmonella* sp.

### 6.6.4. Actividad quitinolítica

Se preparó quitina coloidal siguiendo la metodología empleada por Salas-Ovilla y colaboradores (2018), para ello se utilizaron 10 g de quitina en polvo mezclada con 100 mL de HCl concentrado, se almacenó a 4 °C durante 24 horas. Al día siguiente se añadieron 100 mL de agua destilada, se dejó reposar durante cinco minutos a temperatura ambiente, posteriormente la solución fue filtrada con papel filtro (Whatmann 3MM). El sedimento obtenido fue lavado con agua destilada

y filtrado múltiples veces hasta obtener una pasta cremosa de color blanco. Se almacenó en un frasco de vidrio a 4 °C.

Se preparó medio mínimo de sales enriquecido con extracto de levadura al 1 %, al cual se le adicionó la quitina coloidal quedando con una concentración al 1 % (ver apéndice 10.1.8). Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M (Shivalee *et al.*, 2016). Se inocularon 20 µL de cultivo de la bacteria de interés (crecida en CN a 28 °C durante 24 horas). Se incubaron las cajas a 28 °C durante cinco días. Para visualizar el halo de hidrólisis se añadió una solución de rojo Congo al 5 % (ver apéndice 10.2.3) sobre la placa. Se buscó la presencia de un halo de decoloración alrededor de la colonia.

#### **6.6.5 Prueba de motilidad**

Se inocularon las bacterias de interés por medio de una punción con asa microbiológica en el medio SIM (ver apéndice 10.1.9). La presencia de turbidez y crecimiento sobre la punción se consideró como resultado positivo (Herrera, 2008).

#### **6.7 Resistencia a antibióticos**

La sensibilidad a antibióticos se realizó siguiendo la metodología de Bauer-Kirby (1959). Para ello en agar Mueller Hinton (ver apéndice 10.1.10) se inocularon 80 µL de cultivo líquido de las bacterias (CN, incubado durante 24 horas a 28 °C). Se distribuyó de forma homogénea el cultivo con ayuda de un hisopo estéril humedecido con agua destilada estéril. Como control positivo se inoculó a *Escherichia coli*. Se colocaron 4 discos de papel filtro (Whatmann 3MM) de 0.4 cm de diámetro, distribuidos equidistantes sobre la placa. En la superficie de cada disco se adicionaron 20 µL de los siguientes antibióticos: kanamicina (50 mg/mL), cloranfenicol (34 mg/mL), ampicilina (100 mg/mL) y gentamicina (10 mg/mL) respectivamente, todos a una concentración de 25 % (100 µL de antibiótico en 300 µL de H<sub>2</sub>O). Se incubaron por 24 horas a 28 °C.

Con la ayuda de un Vernier se midieron los halos de inhibición de las colonias bacterianas alrededor de los discos con antibiótico. Se compararon los resultados con el método de prueba de susceptibilidad de disco estandarizado por la British Society for Antimicrobial Chemotherapy y la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BSAC, 2013). Se realizaron 2 réplicas de este experimento.

### 6.8 Curva de crecimiento

En CN se inocularon las bacterias de interés por 24 horas a 28 °C en agitación constante (150 rpm). Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm con el espectrofotómetro BioMate 3S de la marca Thermo. Se ajustó la densidad óptica para cada cultivo de bacterias a 0.009. Con la siguiente ecuación:

$$DOx = \frac{(35 \text{ mL}) (0.009)}{DOc} = X \text{ mL}$$

Dónde: DOx = Densidad óptica ajustada  
DOc = Densidad óptica del cultivo  
X = Cultivo necesario para el ajuste de DO

Una vez obtenido el ajuste de la absorbancia se agregaron los  $\mu\text{L}$  de cultivo necesario y se aforó a 35 mL con CN. De cada cultivo ajustado se tomó 1 mL de muestra en tubos de plástico de 2 mL de capacidad, que corresponden a diferentes tiempos de incubación: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 48, 60 y 72 horas. Para cada tiempo se incubaron tres tubos para así obtener el promedio de la absorbancia. Los tubos se incubaron a 28 °C con agitación constante de 150 rpm. Una vez concluido el tiempo de incubación se realizó la lectura de absorbancia de cada cultivo, promediando los triplicados. Se usó como control el medio de cultivo CN como lectura del blanco. Los datos fueron analizados con el programa Excel para realizar una curva de absorbancia. Fueron realizadas tres réplicas de este experimento.



## **6.9 Identificación molecular de las bacterias por el fragmento ribosomal 16S**

El gen 16S ARNr es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, el más utilizado en estudios de filogenia y taxonomía de procariotas, especialmente en bacterias; se encuentra altamente conservado y presenta algunas áreas comunes con otros organismos. Su estructura y función ha permanecido constante por lo cual es una estructura fácil de secuenciar y actualmente existen bases de datos amplias de este gen (Rodicio y Mendoza, 2004). El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma (Woese *et al.*, 1985), secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio y Mendoza, 2004).

### **6.9.1 Extracción del ADN**

Se cultivaron las bacterias en CN por 24 horas a 28 °C en agitación constante (150 rpm), los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos. En condiciones de esterilidad se descartó el sobrenadante, mientras que la pastilla de células restante se mantuvo en congelación a -20 °C. Se empleó el Kit Fungal/Bacterial DNA miniprep de la marca Zymo ([https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d6007\\_quick-dna\\_fungalbacterial\\_microprep\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d6007_quick-dna_fungalbacterial_microprep_kit.pdf)) para llevar a cabo la extracción. EL ADN se visualizó en gel agarosa al 1 % en el fotodocumentador Gel Doc XR+ de BIO-RAD. Se cuantificó el ADN por medio de la lectura de 1 µL en el nanodrop Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

### 6.9.2 Amplificación por PCR del ITS ribosomal 16S

Se realizó la amplificación de la región 16S rRNA con los siguientes oligonucleótidos: 8F AGAGTTGATCCTTGGCTCAG y 1510R CGGTTACCTTGTTACGACTT (donados por el Dr. Gerardo Nava, Facultad de Química, UAQ). Esperando bandas de amplificación de aproximadamente 1,500 pb (Clavijo *et al.*, 2012).

Para la reacción de PCR se usaron las siguientes concentraciones: 9.35  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de grado molecular, 1.25  $\mu$ L de Buffer DreamTaq DNA Polymerase de la marca Thermo Fisher (<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Flyers/dreamtaq-polymerase-flyer.pdf>), 0.25  $\mu$ L de dNTPs (10 mM), 0.25  $\mu$ L de cada oligonucleótido y 0.15  $\mu$ L de la enzima DreamTaq. Se realizó la amplificación en el termociclador T100 de la marca BIO-RAD. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial 94 °C x 3', 35 ciclos de desnaturalización 94 °C x 30'', alineamiento 58 °C x 30'', extensión 72 °C x 1' 30'' un ciclo de extensión final 72 °C x 5'. Los productos de amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1 %, teñido con 6  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio. La banda de amplificación se visualizó en el fotodocumentador Gel DOC XR+/BioRad.

### 6.9.3 Purificación de productos de PCR y secuenciación

Se realizarán tres reacciones de PCR de cada bacteria con un volumen de 25  $\mu$ L las cuales se juntaron para obtener un volumen final de 75  $\mu$ L de cada bacteria. Se visualizó la banda en gel de agarosa al 1 %, para confirmar la correcta amplificación del fragmento.

Para purificar los productos de PCR utilizó el kit Zymoclean Large Fragment DNA Recovery de la casa comercial Zymo ([https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4045\\_d4046\\_zymoclean\\_large\\_fragment\\_dna\\_recovery\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4045_d4046_zymoclean_large_fragment_dna_recovery_kit.pdf)). Los productos purificados se secuenciaron en el Langebio, Cinvestav-Irapuato. Una vez obtenidas las secuencias, se limpiaron y concatenaron con el programa SeqMan del software Lasergene, para posteriormente realizar un análisis en la base de datos Blast server for bacterial

identification, Ribosomal Database Project, BiBi Database (Mignard y Flandrois, 2006).

### **6.10 Efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas**

Las bacterias 747 y 748 fueron seleccionadas para observar el efecto promotor del crecimiento vegetal, en la germinación y desarrollo radicular de plántulas de chile serrano (*Capsicum annuum*) y jitomate río grande (*Solanum lycopersicum*).

Para ello se inocularon en el medio líquido CN durante 24 horas a 28 °C. Se midió la absorbancia de los cultivos a 600 nm para ajustar la densidad óptica de ambos a 0.4 nm en 20 mL de CN. Para sanitizar las semillas de chile y jitomate se dejaron reposar por 10 minutos en una solución de NaClO al 5 % con agitación constante (150 rpm). Se decantó la solución y las semillas se sumergieron en H<sub>2</sub>O destilada estéril, se agitó en vortex por dos minutos y se decantó nuevamente, este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las semillas se colocaron en los cultivos ajustados a la DO. Como control positivo se colocaron semillas en CN sin inocular y como control negativo en agua destilada. Se dejaron reposar durante dos horas a 150 rpm.

En charolas de germinación se colocó peat moss humedecido con agua potable. Se distribuyeron cuatro semillas por pozo, en filas de 10 pozos por tratamiento. Durante 19 días se regaron con agua potable y tomaron notas del desarrollo cada tercer día, y al día ocho se inocularon 2 mL de los cultivos bacterianos correspondientes en las plantas con el tratamiento; 2 mL de CN y agua potable en los controles correspondientes.

Las plántulas fueron retiradas de la tierra con cuidado de no romper las raíces. Las raíces se sumergieron en agua para retirar el exceso de tierra y se secaron con una sanita. Se midió con un Vernier la altura de los tallos y raíces, se fotografiaron y por último se pesaron. Con ayuda del programa Excel se analizaron los resultados haciendo un análisis de varianza para comparar las diferencias entre los controles y los tratamientos. Fueron realizadas 3 réplicas de este experimento.

### **6.11 Extracción de metabolitos secundarios**

Se prepararon cajas de Petri (90 mm x 15 mm) con medio AN, se inoculó con 200  $\mu$ L de cultivo líquido (CN incubado por 24 horas a 28 °C) de la bacteria de interés (dos cajas por cepa). Se incubaron por 48 horas a 28 °C. Posteriormente, el agar se fraccionó para ser depositado en frascos Schott (200 mL) y se congelaron a – 80 °C durante toda la noche, esto con el fin de lisar las células bacterianas. Al día siguiente, se agregaron 20 mL de agua destilada estéril más 40 mL de acetato de etilo para recuperar los metabolitos producidos por las bacterias. Los frascos se mantuvieron en agitación a 150 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Se recuperó la fase líquida superior en tubos cónicos de 50 mL estériles. Y se colocaron en baño maría a 60 °C dentro de la campana de extracción para evaporar el acetato. Los tubos se cubrieron con papel aluminio, para proteger el contenido de la luz. El tubo cónico se pesó antes y después de tener el extracto para determinar la cantidad de extracto recuperado. El extracto se disolvió con metanol puro para obtener una proporción de mg/ $\mu$ L. Los extractos se conservaron en oscuridad a – 20 °C hasta su uso.

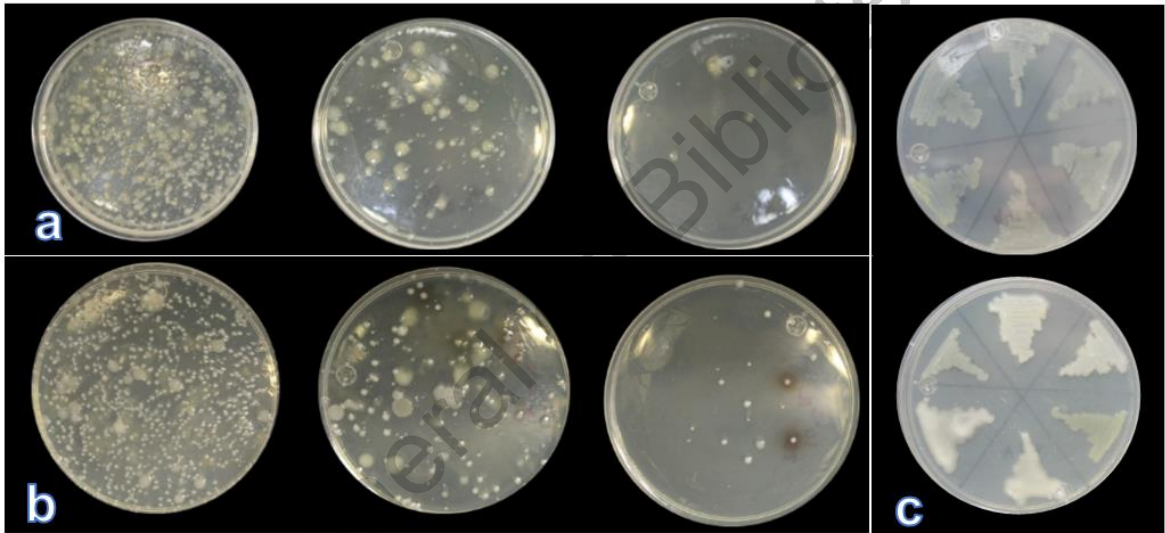
### **6.12 Inhibición de germinación de esclerocios con metabolitos secundarios**

En PDA se inocularon seis esclerocios de cada uno de los siguientes hongos: *C. gleosporoides*, *R. solani* y *S. rolfsii*. A cada esclerocio se le adicionaron 10  $\mu$ L del extracto de cada bacteria. Como blanco se adicionaron 10  $\mu$ L de metanol puro a un grupo de esclerocios, en el otro control se mantuvieron los esclerocios sin ningún tipo de tratamiento. Los esclerocios fueron incubados a temperatura ambiente con presencia de luz durante cuatro días. Se fotografiaron los cultivos para comparar el crecimiento del micelio.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención de las bacterias

A partir de los cultivos conservados en los seis criotubos, se seleccionaron las colonias que presentaron una morfología que las diferenciara como color, borde, tamaño y consistencia (Figura 1). A estas se les realizó la tinción Gram. Con base en su morfología celular y colonial se identificaron 13 bacterias diferentes las cuales se encuentran ya incluidas en el cepario de las instalaciones de LAMIIMO, conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Catalogadas como: 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752a y 752c.



**Figura 1.** Diluciones seriadas de las muestras procesadas de raíz de fresas (a). y suelo (b); de izq. a der.  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$  crecidas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  en AN. Colonias seleccionadas para realizar tinción Gram (c).

Los tipos de muestras, el tratamiento de las muestras y la composición nutricional de los medios de cultivo son factores críticos que influyen fuertemente en el número de organismos obtenidos. Esto se debe a que la distribución de las poblaciones bacterianas no es homogénea en las muestras y en cada organismo que tiene diferentes requerimientos nutricionales (Rashad *et al.*, 2015).

## 7.2 Caracterización de colonias microbianas

En la Tablas 1 se muestra y describe la morfología colonial de las bacterias aisladas, mientras que en el apéndice 10.4 se muestran los registros fotográficos de las tinciones Gram, pertenecientes a cada bacteria.

**Tabla 1.** Descripción morfológica de las bacterias aisladas

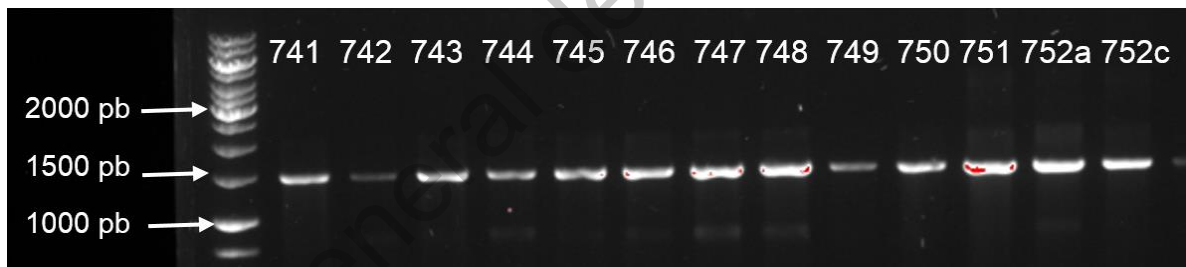
Bacteria	Forma	Color	Superficie	Consistencia	Gram	Fotografía
741	Irregular	Blanco	Brillosa	Viscosa	-	
742	Irregular	Blanco	Brillosa	Creмоса	-	
743	Irregular	Blanco amarillento	Opaca	Creмоса	-	
744	Irregular	Blanco	Brilloso	Viscoso	-	
745	Irregular	Amarillo Claro	Opaco	Creмосo	-	
746	Irregular	Amarillo Claro	Transparente	Firme	-	

747	Circular	Amarillo	Transparente	Firme	-	
748	Irregular	Blanco amarillento	Opaca	Firme	-	
749	Irregular	Blanco amarillento	Opaca	Firme	-	
750	Irregular	Amarillo Claro	Opaco	Firme	-	
751	Irregular	Amarillo Claro	Opaco	Firme	-	
752a	Irregular	Amarillo intenso	Opaco	Viscoso	+	
752c	Irregular	Amarillo Claro	Opaco	Firme	-	

### 7.3 Identificación molecular de las bacterias aisladas

Para la identificación molecular de las bacterias aisladas se realizó la amplificación del gen de RNAr 16S utilizando los oligonucleótidos 8F AGAGTTGATCCTTGGCTCAG y 1510R CGGTTACCTTGTTACGACTT. Los productos de PCR obtenidos fueron de 1,500 pb (Figura 2).

Al utilizar el gen 16S rRNA como único marcador molecular, se logró designar a las bacterias hasta nivel de género. Sin embargo, pese a que la identificación bacteriana a través del gen 16S ribosomal ha sido ampliamente utilizada; es bien sabido que especies bacterianas cercanas no pueden ser diferenciadas mediante el uso de este gen debido a su alta tasa de conservación (Kämpfer y Glaeser, 2012), por lo que se ha propuesto el empleo del análisis de secuencias multilocus mediante el uso de otros genes como marcadores moleculares como *rpoB*, *rpoD*, *gyrB* permitiendo así la identificación hasta el nivel de especie (Yamamoto *et al.*, 2000; Ait *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Amplicón de la región 16S. Se amplificó un fragmento de 1500 pb de la región 16S del ARNr con los oligonucleótidos 8F y 1510R. Se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis 100 mV por 40 minutos.

La secuencia obtenida de los genes de ARNr 16S de los aislados presentaron niveles de homología con las secuencias correspondientes de cepas registradas en el GenBank que variaron entre 96 y 100 %. Se identificaron cinco géneros diferentes siendo el más común *Pseudomonas* con 8 bacterias, seguido por *Pantoea* con dos bacterias, el resto de los géneros con un solo representante fueron *Kluyvera*, *Microbacterium* y *Variovorax*. Pertenecientes a cuatro familias diferentes Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae, Microbacteriaceae y Comamonadaceae.



Representantes de dos filos Proteobacteria y Actinobacteria (Tabla 2). Las secuencias obtenidas se muestran en el apéndice 10.5.

**Tabla 2.** Identificación molecular de bacterias por análisis tipo BLAST

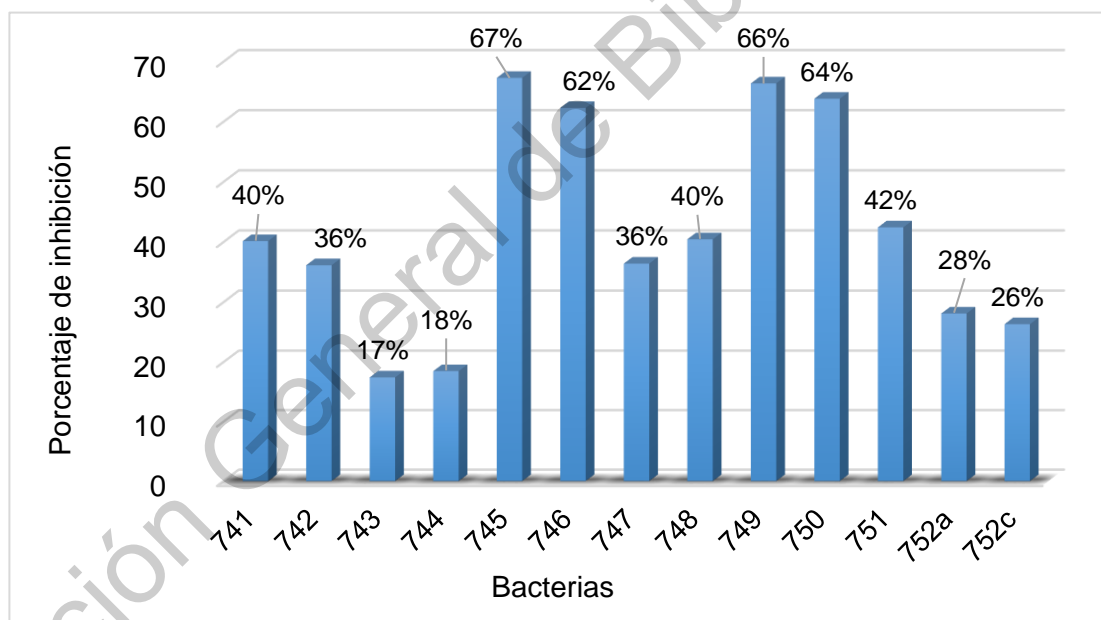
Bacteria	Filo	Familia	Género	Similitud
741	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.71 %
742	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.93 %
743	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.93 %
744	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.93 %
745	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	96.75 %
746	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	100.00 %
747	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	99.76 %
748	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	99.93 %
749	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.78 %
750	Proteobacteria	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas</i>	99.93 %
751	Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	96.28 %
752a	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	96.68 %
752c	Proteobacteria	Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	100.00 %

En diversos estudios se reporta que una comunidad rizosférica constituida por Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes es bastante dinámica en las raíces, ya que asimilan la mayor parte del carbón liberado por las plantas (Zhang *et al.*, 2017; Pascale *et al.*, 2020). También, mayor abundancia de los filos Actinobacteria y Proteobacteria, es encontrada en suelos con supresores específicos del hongo fitopatógeno *Fusarium* asociado a cultivos de fresa (Cha *et al.*, 2016). En un estudio similar llevado a cabo por Pérez-Fragero *et al.* (2020), se aislaron bacterias provenientes de la rizósfera y endófitas de plantas de fresa y blueberry en Sevilla, España. Donde reportan 20 bacterias con potencial como

PGPB por su capacidad de producir AIA, sideróforos, solubilizar fosfatos e inhibir patógenos por medio de enzimas líticas. Entre los géneros reportados resaltan, por su similitud con los identificados en este trabajo, *Pseudomonas* spp. y *Pantoea* sp.

#### 7.4 Prueba de antagonismo contra hongos fitopatógenos

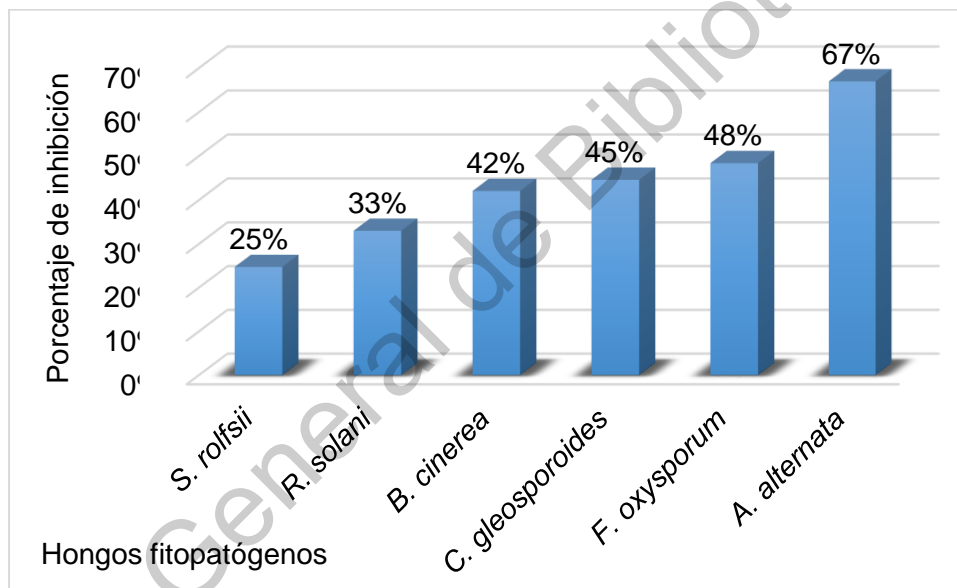
Se determinó el efecto antagónico ejercido contra los hongos fitopatógenos *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gleosporoides*., *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* ejercido por la colección de bacterias. Las bacterias que mostraron el mayor efecto inhibitorio de manera general contra todos los hongos mencionados fueron: 745, 746, 749 y 750, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*, con un porcentaje de inhibición superior al 60 % (Figura 3 y 6, Tabla 3).



**Figura 3.** Efecto antagónico contra hongos fitopatógenos. Se muestra el promedio de porcentaje de inhibición de crecimiento producido por cada una de las bacterias objeto de estudio contra los hongos fitopatógenos empleados.

Diversas especies de *Pseudomonas* han sido ampliamente reportadas como antagonista con efecto indirecto sobre los fitopatógenos, es decir, por su capacidad de producir diversos antibióticos tales como fenazinas, lipopéptidos, sideróforos, el 2-4 diacetilfloroglucinol (DAPG) y compuestos volátiles como la dimetihexadecilamina (DMHDA) y el ácido cianhídrico (HCN) (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013; Hernández-León *et al.*, 2015).

El hongo cuyo crecimiento fue mayormente inhibido fue *A. alternata* hasta casi un 67 %, seguido por *F. oxysporum* con 48 %. Mientras que los que presentaron mayor resistencia fueron *S. rolfsii* y *R. solani* con un 24 y 33 % respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos causado por el efecto antagónico de la colección de bacterias.

Hernández-Salmerón y colaboradores (2018), reportan la capacidad de algunos fitopatógenos, entre ellos *R. solani*, de regular negativamente la expresión de los genes *phlD* y *hcnC*. El gen *hcnC* codifica la subunidad C de la sintasa de ácido cianhídrico o HCN sintasa, que cataliza la reacción para la formación del HCN a partir del aminoácido glicina, el cual es un factor de virulencia conocido en las especies de *Pseudomonas* (Laville *et al.*, 1998). Por otra parte, el gen *phlD* forma

parte del operón biosintético del compuesto DAPG, un antibiótico ampliamente reportado en el biocontrol de hongos fitopatógenos (Yang y Cao, 2012). Por lo que es posible que debido a esta regulación en la síntesis de estos compuestos no se logró inhibir en un porcentaje más alto el crecimiento en *R. solani*.

A pesar de no lograr un amplio efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. rolfsii* y *R. solani*, se observó que la mayoría de las bacterias estudiadas ocasionaron inhibición en la formación del número de esclerocios producidos por estos hongos, este efecto se observó en ambas especies por las siguientes bacterias: 741, 742, 743, 744, 745, 746, 748, 749, 750, 751 y 752c; mientras que las bacterias 747 y 752a solamente fueron efectivas contra y únicamente sobre *R. solani*. Este dato es de suma importancia, puesto que los esclerocios son estructuras de resistencia, las cuales permiten que el hongo pueda resistir situaciones adversas; y posteriormente tener la capacidad de germinar cuando las condiciones sean las adecuadas (Smith *et al.*, 2015).

El método empleado para analizar la capacidad antagónica de las bacterias, consistió en crecer las bacterias sobre una capa de celofán que permitiese ingresar en el medio de cultivo a los metabolitos difusibles por la membrana permeable del celofán. Además, las cajas Petri fueron selladas con plástico autoadherible durante su incubación por 48 horas. Como describe Fernando y Linderman (1994), en su método para probar el efecto de compuestos volátiles orgánicos (por sus siglas en inglés VOC), producidos por bacterias, el sellar las cajas impide que los VOCs escapen de la caja de Petri. Así, al momento de inocular los fitopatógenos cierta cantidad de VOCs permanecen dentro de la caja, aun cuando los cultivos bacterianos no tuvieron un enfrentamiento presencial o activo con los patógenos.

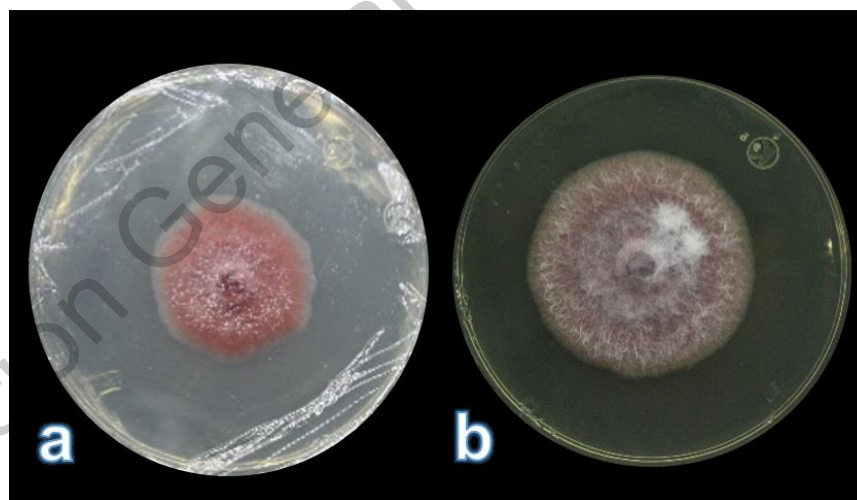
Los VOCs producidos por las bacterias antagonistas, generalmente son sustancias lipófilas con una alta presión de vapor capaz de pasar libremente a través de las membranas biológicas y son liberadas hacia la atmosfera o en el suelo (Pichersky *et al.*, 2006). Las cuales actúan como señales de comunicación inter e intra organizmicas. Juegan un rol primordial en la interacción entre organismo que comparten el mismo nicho ecológico (Popova *et al.*, 2014). Dichos VOCs pueden

ser difusibles en el medio de cultivo, así como a través de la tierra. Giorgio y colaboradores (2015), reportan el uso de VOCs producidos por *Pseudomonas* spp. Entre ellos el dimetil disulfido y dimetil trisulfido, con la capacidad de inhibir la germinación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Los compuestos mencionados han sido sugeridos en otros estudios (Kai et al., 2009) como agentes de protección vegetal, ya que actúan en el control de hongos fitopatógenos y nematodos (Cosemans, 2005). Mediante fotografías de la ultraestructura micelial, Giorgio y colaboradores corroboraron que las hifas presentaban alteraciones y pérdidas de la membrana, ocasionando consecuentemente la permeabilidad de las células debido a la exposición a los VOCs, de esta manera comprueban que las membranas mitocondriales son el blanco de los VOCs. Estas perturbaciones en la integridad estructural del micelio restringen la capacidad de formar esclerocios (Kamal et al., 2015). Los VOCs producidos por las bacterias objeto de estudio, posiblemente son los responsables de disminuir la producción de esclerocios en *R. solani* y *S. rolfsii* en este experimento. Un efecto similar a los reportados por Fernando et al., (2005), Rack et al., (2011), Kamal et al., (2015) y Mulner et al., (2019). La acción de los VOCs bacterianos sobre la producción de los esclerocios es importante para el control de estos patógenos de suelos, que tienen la capacidad de sobrevivir por años en condiciones adversas.

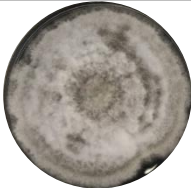
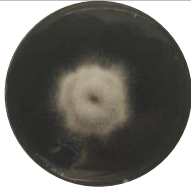






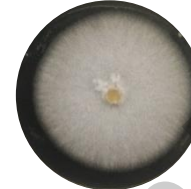



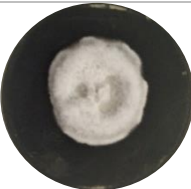












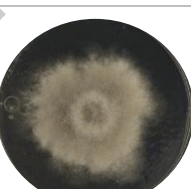




Por otro lado, Mehmood y colaboradores (2020), cuestionan la interacción planta-patógeno de los esclerocios, ya que reportan que la presencia de los esclerocios de *S. sclerotiorum* aportan un elemento alimenticio como materia orgánica en suelos de cultivo, lo cual puede llegar a fomentar la diversidad microbiana, tanto de bacterias PGPB como hongos benéficos, entre ellos *Trichoderma*. Además, de ejercer un efecto de competencia contra otros fitopatógenos a los cuales suprime su presencia en los suelos. Está documentado que los esclerocios de varios hongos pueden ser ricas fuentes de carbohidratos, grasas, proteínas, quitina, fibra y minerales como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$ , lo cual los convierte en candidatos potenciales para varios propósitos, incluyendo el uso como fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano (Yap et al., 2013; Kong et al., 2016). Es por esto que se ha observado que suelos carentes de materia orgánica,

pero con la presencia de esclerocios de *S. sclerotiorum* germinando, proveen las condiciones favorables por sí mismos al actuar como materia orgánica después de su degradación por microorganismos. (Huang *et al.*, 2002). De esta manera, replantean la necesidad de comprender y evaluar el rol de los esclerocios en los ecosistemas. Entender la ecología de los patógenos de cultivos en el mantenimiento de las condiciones de los suelos, que pueden llegar a ser benéficos para construir una sana comunidad de microorganismos en la rizósfera es requerido para mitigar la emergencia de nuevas enfermedades en los cultivos.

Cabe mencionar, que conforme se realizaron las réplicas de este experimento, fue notoria la pérdida gradual de pigmentación en el hongo *F. oxysporum* (Figura 5), posiblemente ya sea debido a los compuestos volátiles o no volátiles, producidos por las bacterias. Dicha alteración puede tener significancia no sólo en el metabolismo del hongo sino en la virulencia del mismo, ya que se ha demostrado que su coloración rosada a púrpura es gracias a la síntesis de un potente antimicrobiano, la naftoquinona (Baker *et al.*, 1990; Medentsev y Akimenko, 1998).

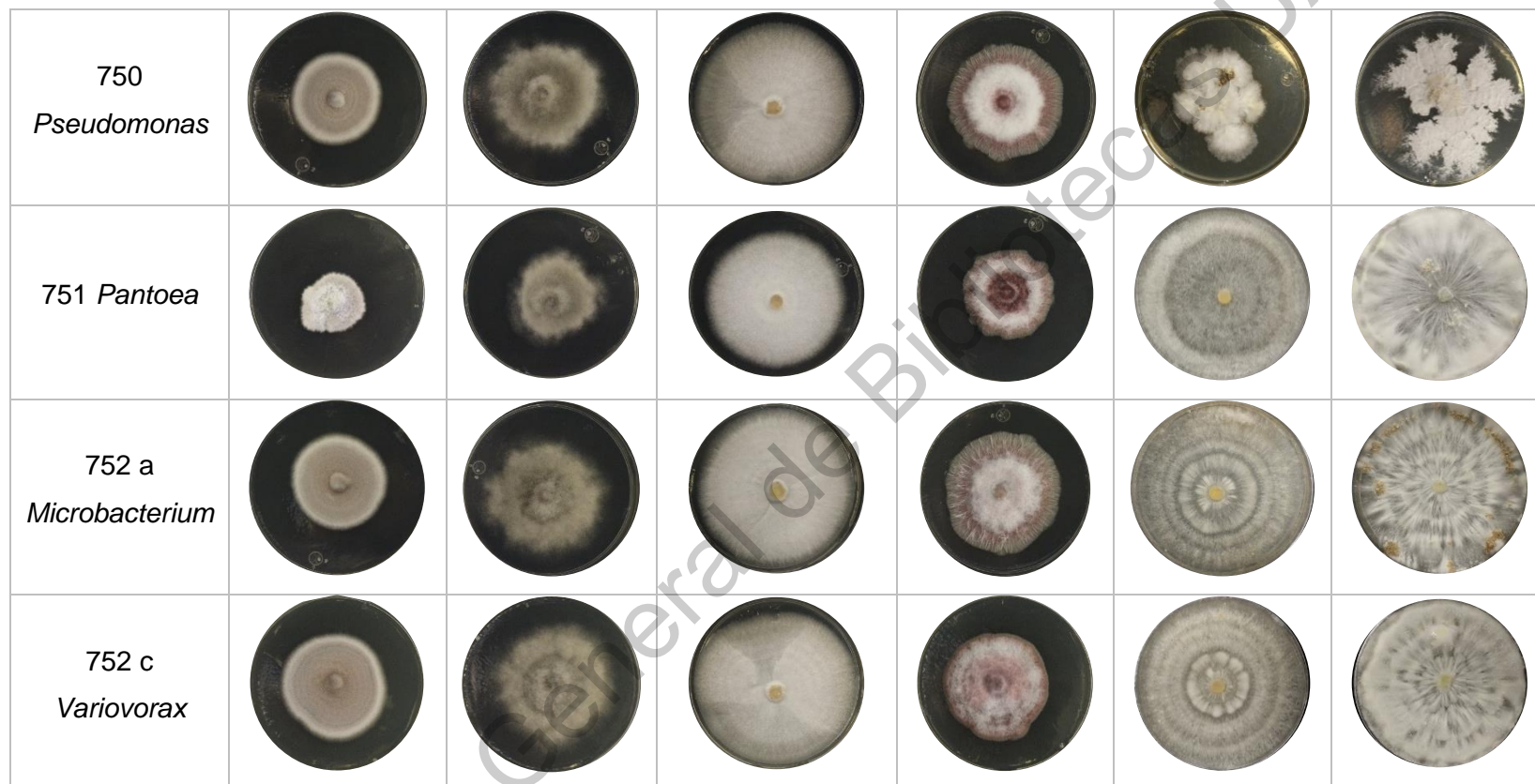


**Figura 5.** Efecto de la exposición de las bacterias sobre la pigmentación del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Como ejemplo se muestran diferentes cultivos del hongo expuestos a los metabolitos de la bacteria 745 (*Pseudomonas* sp.). Réplica realizada en octubre del 2018 (a), mientras que la réplica realizada en septiembre del 2019 (b), muestra reducción en la pigmentación rosa.

Bacteria	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gleosporoides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
Control						
741 <i>Pseudomonas</i>						
742 <i>Pseudomonas</i>						
743 <i>Pseudomonas</i>						
744 <i>Pseudomonas</i>						

745 <i>Pseudomonas</i>						
746 <i>Pseudomonas</i>						
747 <i>Pantoea</i>						
748 <i>Kluyvera</i>						
749 <i>Pseudomonas</i>						





**Figura 6.** Crecimiento de los hongos fitopatógenos ante el efecto antagonista bacteriano. Cultivos en PDA a los siete días de crecimiento a temperatura ambiente. Se realizaron tres replicas del ensayo.

**Tabla 3.** Efecto antagonista sobre los hongos fitopatógenos.

Bacteria	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. gleosporoide</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>	% Promedio de inhibición
741	56.90	56.36	50.00	48.15	29.41	0.00	40.14
742	56.90	23.64	55.00	51.85	29.41	0.00	36.13
743	50.00	-4.55	26.67	32.41	0.00	0.00	17.42
744	55.17	-15.45	26.67	44.44	0.00	0.00	18.47
745	82.76	61.82	51.67	59.26	77.65	70.59	67.29
746	82.76	54.55	53.33	53.70	76.47	52.94	62.29
747	68.97	49.09	46.67	53.70	0.00	0.00	36.40
748	68.97	76.36	45.00	50.00	2.35	0.00	40.45
749	82.76	54.55	53.33	61.11	67.65	78.82	66.37
750	77.59	63.64	50.00	43.52	71.76	76.47	63.83
751	72.41	59.09	48.33	62.96	11.76	0.00	42.43
752 a	48.28	25.45	28.33	19.44	29.41	17.65	28.09
752 c	39.40	26.56	30.14	17.84	31.22	19.80	27.49

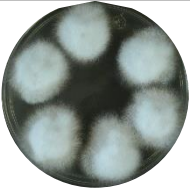

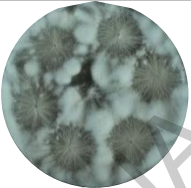
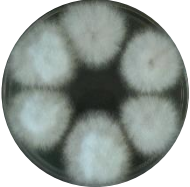


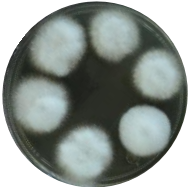



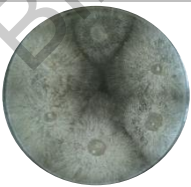


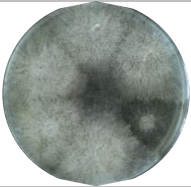

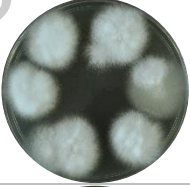








Porcentaje de inhibición causado por cada bacteria sobre cada hongo y el promedio de su efecto sobre todos los hongos fitopatógenos.

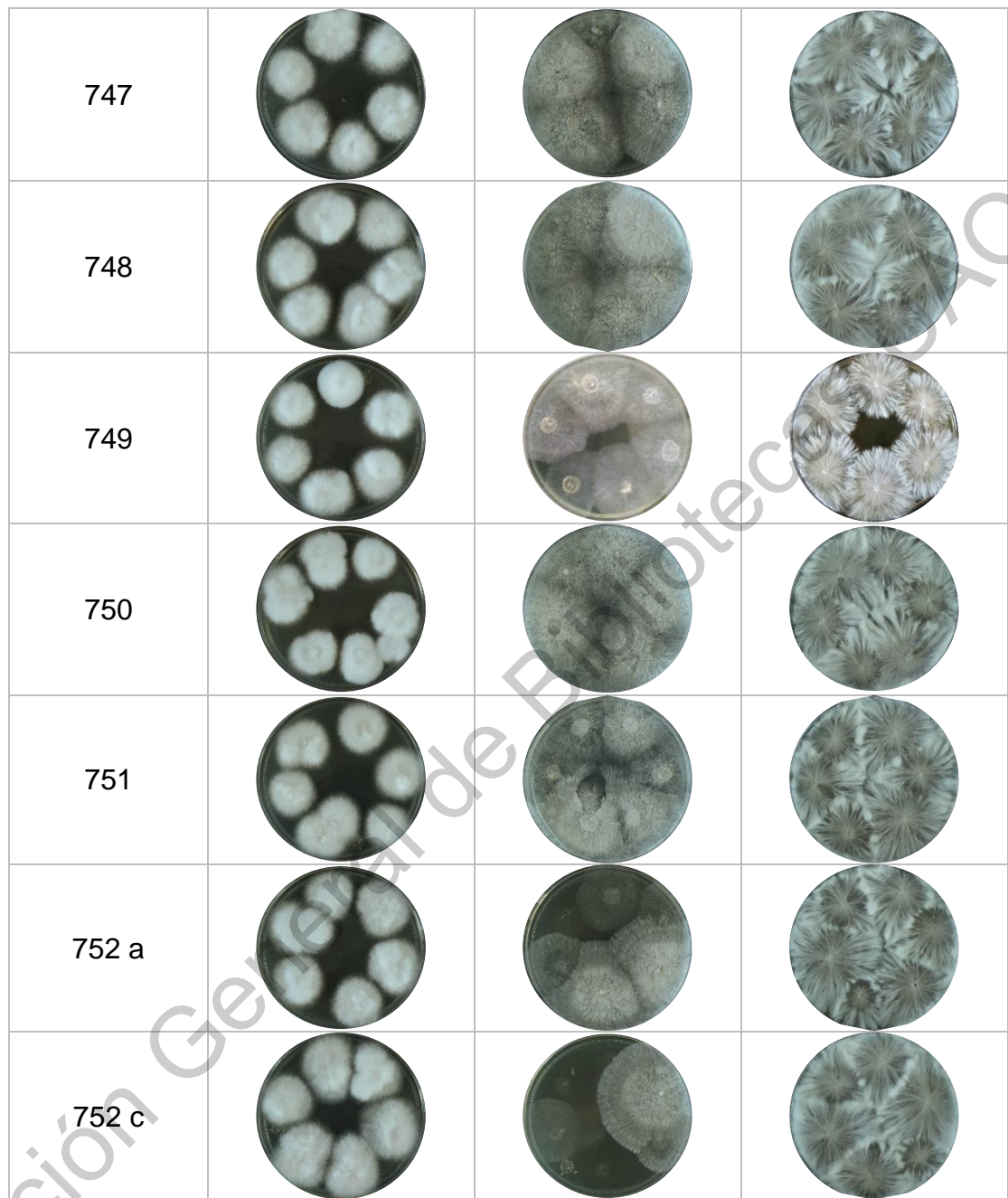
## 7.5 Efecto en la germinación de esclerocios con los extractos de metabolitos secundarios

Ya que los esclerocios son estructuras de resistencia que generan un importante problema en los cultivos de importancia económica, es necesario buscar herramientas que mitiguen el problema de los fitopatógenos resistentes y sus estructuras de latencia, como es el caso de los esclerocios, de la manera menos nociva para el medio ambiente y la salud humana. Pese a lo discutido en el apartado anterior por Mehmood y colaboradores (2020), las interacciones entre patógeno-planta-suelo-ambiente aún no están del todo comprendidas, en cuanto al ámbito ecológico.

Debido a la inhibición observada en la producción de esclerocios sobre los hongos *R. solani* y *S. rolfsii*, en el experimento anterior (Figura 6), se buscó determinar algún efecto inhibitorio sobre la germinación de los esclerocios, incluyendo ahora a los esclerocios producidos por *C. gleosporoides*. A partir de los compuestos extraídos de los cultivos bacterianos, con acetato de etilo.

Como se muestra en la Figura 7, los compuestos extraídos no produjeron efecto alguno en la germinación de los esclerocios de *C. gleosporoides*. No obstante, sobre los esclerocios de *R. solani*, con las bacterias 746 (*Pseudomonas*), 747 (*Pantoea*), 752a (*Microbacterium*) y 752c (*Variovorax*), fue posible observar una ligera disminución o retraso en la germinación del micelio, en comparación con los controles. Por otro lado, respecto a *S. rolfsii*, las bacterias 741 y 749 (*Pseudomonas*) parecen ser las únicas que causaron perturbación en la germinación. Cabe destacar, que se observó durante el seguimiento de los 4 días de germinación sobre *R. solani* y *S. rolfsii*, que los cultivos con los tratamientos bacterianos, llegaron a retrasar ligeramente la germinación con respecto a los controles, sin embargo, al cuarto día igualaron el crecimiento.

Extracto de bacteria	<i>C. gleosporoides</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
Sin ningún tratamiento			
Con metanol			
741			
742			
743			
744			
745			
746			



**Figura 7.** Efecto en la germinación de esclerocios por los metabolitos producidos por las bacterias antagónicas. Se utilizaron esclerocios de *C. gleosporoides* *R. solani* y *S. rolfsii* para determinar el efecto en su germinación producido por los compuestos recuperados en el extracto con acetato de etilo de las bacterias estudiadas. Se emplearon seis esclerocios de cada hongo por caja, a los cuales se les agregó 10  $\mu$ L del compuesto extraído. Las placas se fotografiaron al cuarto día de inoculación.

El ligero efecto inhibitorio observado, pudiera atribuirse ya sea a que no se encontraban los compuestos en la concentración adecuada, o que el método de extracción empleando acetato de etilo, no fuera el ideal para extraer los compuestos con efecto antibiótico y el uso de compuestos con diferente polaridad podría representar una alternativa. Con relación a lo reportado en el experimento de antagonismo (apartado 7.4 página 41), se menciona que los metabolitos difusibles en el medio de cultivo y VOCs liberados por las bacterias, redujeron la producción de esclerocios sobre *R. solani* y *S. rolfsii* (Figura 6), posiblemente por daños ocasionados en la membrana del micelio lo cual impide o dificulta la capacidad de formar esclerocios. De esta manera, con lo evidenciado en este experimento se conjetura que la capacidad antagonista de las bacterias aisladas recae en producir antibióticos, enzimas líticas, VOCs, o metabolitos secundarios con la capacidad de dañar la estructura micelial, pero no con la capacidad de dañar estructuras de resistencia como los esclerocios, los cuales se caracterizan por ser un tejido pseudoparenquimatoso y de corteza melanizada propiedades que les confieren resistencia a múltiples compuestos químicos y daños físicos (Lau y Abdullah, 2017). La melanina es una macromolécula compuesta de varios tipos de monómeros fenólicos o indólicos que son resistentes a condiciones ambientales adversas, como luz visible o ultravioleta, metales tóxicos o enzimas líticas y microorganismos antagonistas (Butler y Day 1998). Esta propiedad es la que dificulta llevar a cabo un control exitoso de los esclerocios en los cultivos.

En un estudio llevado a cabo por Fernando y colaboradores (2005), para inhibir la germinación de esclerocios provenientes de *S. sclerotiorum*, se emplearon diversas especies de *Pseudomonas*, además, de diferentes VOCs aislados de las mismas bacterias. Reportan obtener mejores resultados inhibiendo la germinación de esclerocios al emplear a las bacterias antagonistas, que con los VOCs aislados, indicando que la interacción de los antagonistas con los patógenos pudiera ser la clave para suprimir la germinación. Sin embargo, en la literatura se reporta que los estudios más efectivos de control biológico contra la germinación de esclerocios consisten en el micoparasitismo (Smolińska y Kowalska, 2018) por parte de

*Coniothyrium minitans* (Zeng et al. 2012) y *Trichoderma* (Smolinska et al. 2016), como los más eficaces.

## 7.6 Prueba de antagonismo contra el hongo benéfico *Trichoderma*

Considerando el efecto antagonista de las bacterias observado en la colección de hongos fitopatógenos, decidimos analizar el efecto de seis de las bacterias (747, 748, 749, 750, 751 y 752a) en el crecimiento de un hongo benéfico como es el caso de *Trichoderma*, para ello se utilizaron tres especies *T. atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. harzianum* reportadas ampliamente como agentes de biocontrol (Harman, 2006). En este caso se registró inhibición causada únicamente por las bacterias 749 y 750 (*Pseudomonas*) con un 24.7 y 66.6 % respectivamente. Por su parte, la bacteria 750 causó efecto negativo sobre el crecimiento de las tres especies de *Trichoderma*, mientras que la 749 sólo afectó a *T. harzianum* (Tabla 4, Figuras 8 y 9). Un efecto observado sobre los hongos expuestos a los metabolitos bacterianos difusibles en el medio de cultivo fue el incremento en la producción de cuerpos fructíferos (Figura 9).

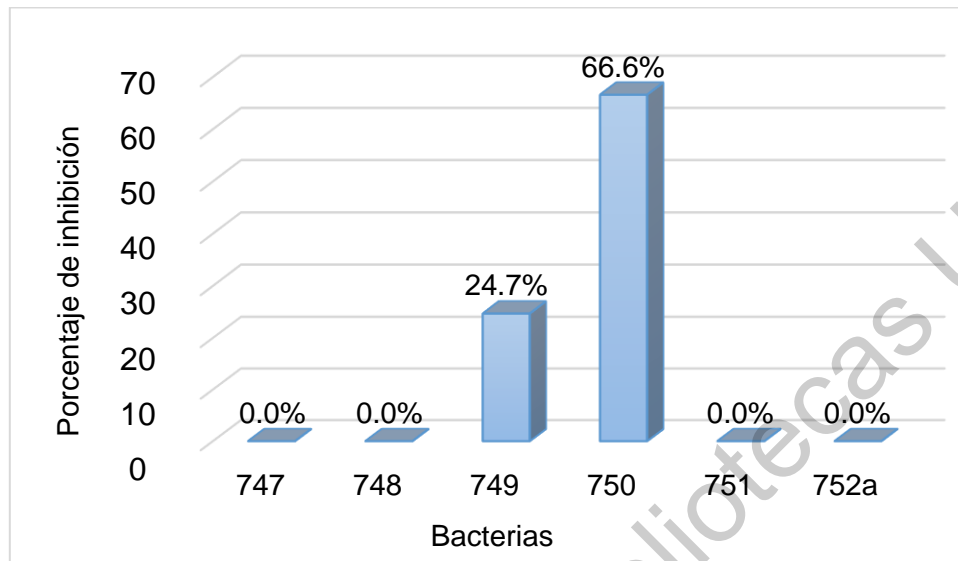
**Tabla 4.** Efecto de las bacterias sobre *Trichoderma*.

Bacterias	<i>T. atroviride</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. harzianum</i>	% Promedio de inhibición
747	0	0	0	0
748	0	0	0	0
749	0	0	74.11	24.70
750	87.05	24.70	88.23	66.66
751	0	0	0	0
752a	0	0	0	0

Porcentaje de inhibición generado por seis de las bacterias sobre el hongo *Trichoderma*.

Se ha reportado que las esporas de los AMF (hongos formadores de micorrizas arbusculares, por sus siglas en inglés), como *Trichoderma* se pueden encontrar asociadas a bacterias del suelo AMFB (bacterias del suelo asociadas a los hongos formadores de micorrizas arbusculares, por sus siglas en inglés) tales como *Pseudomonas*. Así, algunas bacterias pueden contribuir aumentando la








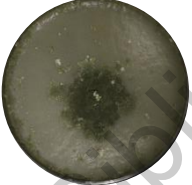
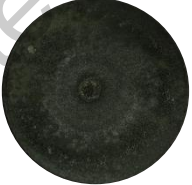
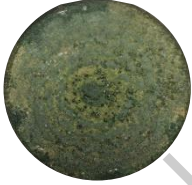



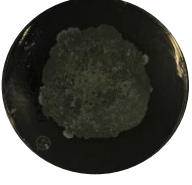



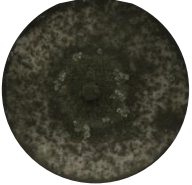

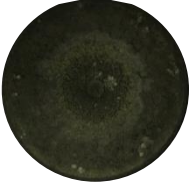

capacidad de los AMF para inhibir los patógenos, adquirir nutrientes minerales y modificar el crecimiento de las raíces de plantas (Cano, 2011).



**Figura 8.** Porcentaje de inhibición sobre los hongos benéficos del género *Trichoderma*, efectuado por seis de las bacterias objeto de estudio.

Los resultados de este experimento confirman que la aplicación de tratamientos para el control biológico y promoción del crecimiento vegetal, haciendo uso de la mezcla de las bacterias de estudio, a excepción de la 750 y 749, junto con los hongos benéficos del género *Trichoderma* pueden incluso potencializar el efecto de ambos. Como lo han reportado Chandanie *et al.*, (2009), al coinocular a los AMF *Glomus mosseae*, *Penicillium simplicissimum* y *T. harzianum* en plantas de pepino, lo cual aumentó el porcentaje de colonización radical, mostrando sinérgicamente un mayor crecimiento de las plantas y en los niveles de protección contra fitopatógenos, que al ser inoculados de manera independiente. Por otra parte, Akhtar y Siddiqui (2008), coinocularon al hongo *G. intraradices* con las PGPB *Rizhobium* sp. y *Pseudomonas straita* en plantas de garbanzo, mostrando que la presencia de las bacterias aumentó la colonización de raíces por *G. intraradices*. causando también una reducción significativa en la incidencia de nematodos patógenos. También, se ha observado que los exudados de las AMF estimulan el crecimiento de las PGPB (Gera y Cook, 2005).



Bacteria	<i>T. atroviride</i>	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. harzianum</i>
Control			
747			
748			
749			
750			
751			
752a			

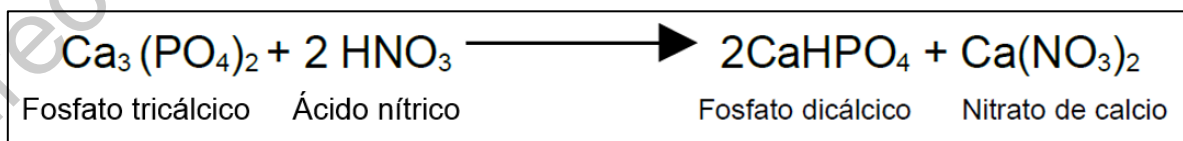
**Figura 9.** Efecto sobre el crecimiento de los hongos benéficos frente a los metabolitos provenientes de las bacterias seleccionadas. Se realizaron tres replicas del ensayo.

## 7.7 Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas

Cada tipo de bacteria vive en condiciones ambientales diferentes adaptada al medio lo mejor posible. Por ende, no todos los géneros utilizan los mismos sustratos como fuentes de energía. Esta diversidad es útil para caracterizar la diversidad de enzimas implicadas en el metabolismo y obtención de energía de cada microorganismo (Sergaki *et al.*, 2018). Debido a esto, es que se emplearon medios de cultivo selectivos para identificar diversos perfiles bioquímicos, rastreando en las bacterias la capacidad de sintetizar o degradar diversos compuestos que les confieran la habilidad de ser empleadas como PGPB.

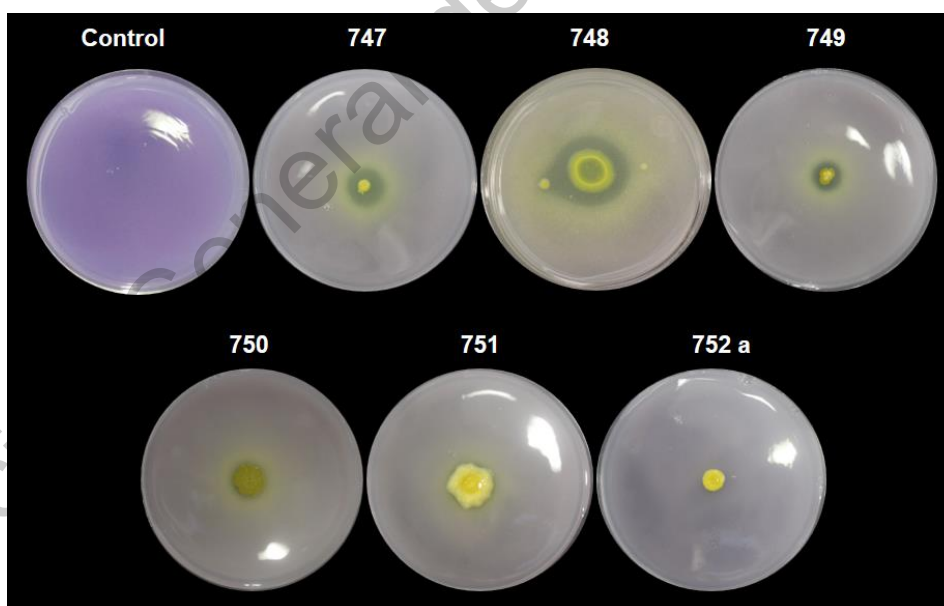
### 7.7.1 Solubilización de fosfatos

Los cultivos crecidos en medio PVK con fosfato tricálcico como única fuente de carbono dieron como resultado cinco bacterias capaces de solubilizarlo (Tabla 6), estas fueron: 747, 748, 746 y 749 (*Pantoea* sp., *Kluyvera* sp., y dos *Pseudomonas* sp.). Y dos más mostraron menor capacidad para solubilizarlo 742 y 743 (*Pseudomonas* sp.) (Figura 11). El ensayo realizado en medio PVK consiste en aislar microorganismos capaces de solubilizar el fosfato tricálcico por medio de ácidos orgánicos de bajo peso molecular excretados por las células, tales como el oxálico, cítrico, láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético. Estos compuestos actúan por medio de los grupos carboxílicos quelando cationes unidos a fosfato convirtiéndolos en formas solubles (Figura 10) (Rashid *et al.*, 2004). Aunque la producción de ácidos orgánicos es uno de los mayores factores responsables de este proceso, no es el único mecanismo empleado por microorganismos para solubilizar fosfatos.



**Figura 10.** Reacción de la solubilización de compuestos inorgánicos del fósforo por producción de ácidos orgánicos exudados por bacterias. Fuente Useche et al. (2004).

Únicamente bacterias con esta capacidad pueden aprovechar la fuente de carbono presente en el medio PVK, lo cual se confirma al observarse un halo claro alrededor de la colonia. Adicional a esto, fue añadido púrpura de bromocresol (BCP o 5', 5''-dibromo-o-cresolsulftaleína pKa 6.3) al medio de cultivo, debido a que al ser un compuesto halocrómico, es decir, cambia el color de la solución al reaccionar con el pH, ayuda a determinar visualmente cualquier alteración en el pH (Agrawal y Kotasthane, 2012). La pigmentación amarillenta de las colonias y del medio circundante indica una disminución en el valor de pH, esto debido a la producción de ácidos orgánicos. De acuerdo con Chuang *et al.* (2007), la formación microbiana de halos de solubilización en medios suplementados con fosfato tricálcico, como la evidenciada en este estudio, se debe principalmente a la liberación de ácido glucónico, permitiendo la disolución y disponibilidad del P, como ocurre en el suelo. Mientras que Sharan *et al.* (2008) indican que la capacidad de solubilización de fosfato por microorganismos del suelo se ve afectada por factores adversos como el estrés hídrico, el pH (mayor a 8 y menor a 5) y, el alto contenido de sales.



**Figura 11.** Medio Pikovskaya inoculado con seis de las bacterias pertenecientes a los diferentes géneros identificados. El halo transparente alrededor de la colonia indica la solubilización del fosfato tricálcico. La pigmentación amarilla muestra la capacidad de las bacterias para acidificar el medio de cultivo. Se realizaron tres replicas del ensayo.

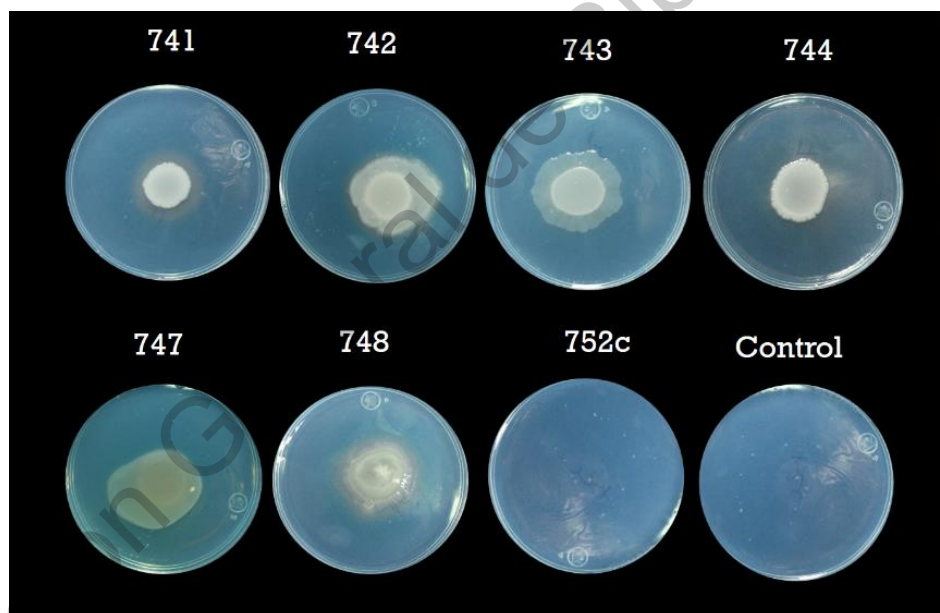
Entre las bacterias reportadas en la literatura como productoras de ácidos orgánicos solubilizadoras de fosfato resaltan: *Kluyvera cryocrescens*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus* sp. (Vásquez et al., 2000); *Pantoea* sp., *Enterobacter nakasaki* y *Burkholderia cepacia* (Lara et al., 2011). Lo cual corresponde con lo reportado en este ensayo donde *Pantoea*, *Kluyvera* y *Pseudomonas* demostraron tal capacidad.

### 7.7.2 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos fue ensayada en siete de las trece bacterias de estudio, siendo cultivadas en el medio sólido Fe-CAS. Sin embargo, no se observó el cambio de color azul a naranja que corroborase la producción de sideróforos. Cabe mencionar, que las bacterias 741 (*Pseudomonas* sp.) y 748 (*Kluyvera* sp.), formaron un halo transparente alrededor de su colonia, de alrededor de 2 mm de diámetro (Figura 12). Pese a esto, dicho resultado no puede ser interpretado como positivo. Ya que se trata de un medio de cultivo con cierto grado de dificultad en su preparación, debido a que los elementos traza son muy sensibles a reaccionar con residuos en la cristalería, alteraciones leves de pH, concentración de  $\text{FeCl}_3$  o por la pureza de los reactivos empleados. Es posible, que la solución indicadora que compone al medio, la cual consiste en el Cromo Azurol Sulfonato (CAS) con la fuente de hierro mezclado con Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio (HDTMA), se viera alterada debido a la esterilización o al ser incorporada al resto de las soluciones, y de esta manera ocasionando que la propiedad reactiva del medio se disipara. Tal como mencionan Louden y colaboradores (2011), variaciones en el pH pueden alterar el complejo CAS / Fe evitando que el CAS cambie de color con la eliminación del hierro. Debido a esto, es conveniente repetir este experimento para futuras investigaciones.

El medio de cultivo Fe-CAS es usualmente empleado para la determinación cualitativa de sideróforos. Ya que cuenta con muy bajas concentraciones de hierro ( $1\text{mM FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), lo cual favorece la síntesis de sideróforos en los organismos que cuentan con dicha capacidad (Bhattacharya, 2010). De esta manera, el  $\text{Fe}^{2+}$  presente en el interior de la célula microbiana, se disocia de las proteínas represoras

que se encuentran unidas al ADN para impedir la síntesis de los sideróforos ante altas concentraciones de hierro. Las PGPB que producen sideróforos utilizan el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ --sideróforo para incorporar este metal al interior celular mediado por un receptor específico localizado en la membrana bacteriana y una vez dentro de las células, se deposita en un sitio específico por un proceso que involucra un intercambio de ligandos que puede estar precedido o no por la reducción del  $\text{Fe}^{2+}$  o por la hidrólisis del sideróforo (Rives, *et al.*, 2007). Este secuestro de hierro disminuye su disponibilidad en el medio para otros microorganismos carentes de este sistema y que en ocasiones son patógenos para las plantas (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012), como se ha reportado con *F. oxysporum* y *R. solani* (Sayyed y Patel, 2011). Bacterias ampliamente reportadas con esta capacidad son *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Solanki *et al.*, 2013).



**Figura 12.** Medio Fe-CAS. Se muestran siete de las bacterias inoculadas, a los tres días de incubación a 28 °C. La producción de sideróforos es indicada por la reacción involucrada en el secuestro de hierro del CAS (Cromo Azurol Sulfonato) por el efecto quelante de los sideróforos, tornando la coloración azul a naranja (Schwyn y Neilands, 1987). Se realizaron tres replicas del ensayo.

### 7.7.3 Determinación de ácido indol acético

En este ensayo cinco bacterias mostraron un resultado positivo a la prueba de ácido indol acético (Figura 13), 748 (*Kluyvera* sp.), 747 y 751 (*Pantoea* sp.), mientras que 745 y 743 (*Pseudomonas* sp.) mostraron una pigmentación tenue que puede interpretarse como un resultado intermedio, es decir, producen AIA en menor cantidad (Tabla 6). Cabe destacar que, al medio de cultivo utilizado para determinar la auxina, se le adicionó triptófano que induce a la producción de ésta; numerosos estudios han demostrado que el AIA es sintetizado a partir del triptófano (Vega-Celedón *et al.*, 2016). Al no contar con el reactivo de la auxina AIA para realizar la curva de patrón con el fin de cuantificar la hormona producida por las bacterias, este experimento sólo indica resultados cualitativos para la síntesis de AIA.



**Figura 13.** Producción de ácido indol acético. Se muestra la producción de AIA en el medio de cultivo soya triptófano. Se observa el anillo que corresponde a la producción del AIA al reaccionar con el reactivo de Kovacs. Control negativo *Salmonella* sp. como control positivo *E. coli*. Se realizaron tres replicas del ensayo.

Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de romper y desaminar el triptófano, vía la molécula intermediaria ácido indol piruvico provocando la síntesis de indol. Las triptofanasas catalizan la reacción de desaminación, al remover el grupo amino de la molécula de triptófano. Como coenzima de la reacción se requiere al fosfato de piridoxal. La prueba de indol mediada con el reactivo de Kovacs se basa en la formación de un pigmento rosa cuando el indol liberado reacciona con el 4-dimetilaminobenzaldehído, ello es debido a la presencia de escatol, también conocido como metil-indol o indol

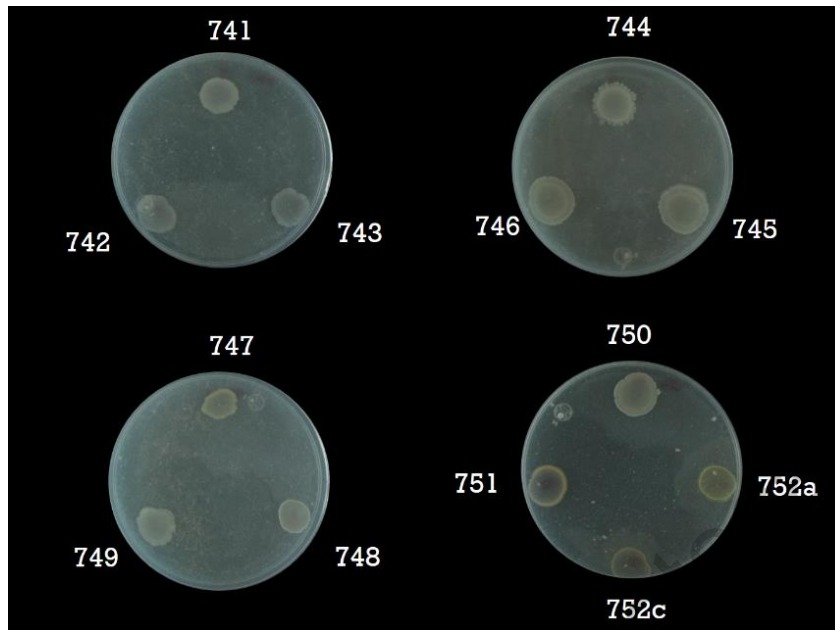
metilado, otro posible producto de la degradación del triptófano. (Gadebusch y Gabriels, 1959).

La producción de AIA microbiano está ampliamente documentada en las PGPB (Cakmakci *et al.*, 2020). La vía de síntesis de AIA utilizada por las PGPB es la indol-3-piruvato (IPA). Esta vía tiene como primera etapa la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPA) por una aminotransferasa. En la segunda etapa el IPA se descarboxila a ácido indol-3- acetaldehído (AIAld) por la indol- 3- piruvato descarboxilasa (IPDC), siendo esta la etapa limitante de la síntesis. En la etapa final, el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (Spaepen *et al.*, 2007). El gen *ipdC* que codifica para la enzima IPDC ha sido caracterizado en algunas bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Pantoea* sp. (Patten y Glick, 2002; Couillerot *et al.*, 2013).

#### **7.7.4 Actividad quitinolítica**

Las bacterias cultivadas en presencia de la quitina coloidal como única fuente de carbono, no mostraron un crecimiento significativo. La adición de rojo Congo sobre las colonias no reveló halos de transparencia (Figura 14), lo cual indica que ninguna de las bacterias aisladas en este proyecto de tesis cuenta con la enzima quitinasa capaz de degradar la quitina coloidal presente en el medio de cultivo (Tabla 6). Con este resultado se infiere que el efecto antagónico que presentan sobre los hongos fitopatógenos no es generado por la actividad de enzimas quitinolíticas. O bien, que se requiere la presencia del hongo para que se active la expresión génica de las quitinasas.

La actividad antagónica de diversos microorganismos esta correlacionada con la producción de quitinasas. por esta razón la quitina es usada para activar a los microorganismos quitinolíticos capaces de afectar a diversos hongos (Salas-Ovilla *et al.*, 2019). Las quitinasas son proteínas glicosilhidrolasas (EC 3.2.2.14) que rompen los enlaces -1,4 de las unidades de N-acetilglucosamina, catalizando la degradación de la quitina (Deeba *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Medio de cultivo con quitina. La ausencia de halos transparentes alrededor de las colonias muestra que ninguna de las bacterias cuenta con enzimas quitinolítica. Fueron realizadas tres replicas.

Barboza-Corona y colaboradores (1999), reportan que bacterias con actividad quitinolítica, mediada por quitinasas codificadas por el gen *ChiA*, juegan un papel secundario nutricionalmente, es por esto que algunas bacterias que cuentan con dicho gen, no necesariamente lo emplean para obtener recursos, ya que cuentan con otras capacidades metabólicas que les facilitan obtener recursos. También, sugieren que el pH es un factor requerido para la producción de quitinasas, ya que se ha visto que la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, requiere condiciones alcalinas como las encontradas en lepidópteros y dípteros para la activación de las quitinasas (Barboza-Corona et al., 1998).

#### 7.7.5 Prueba de motilidad

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de motilidad en el medio semisólido SIM, el cual cuenta con una cantidad reducida de agar proporcionando una estructura semisólida que permite la detección de la motilidad bacteriana.



**Tabla 5.** Prueba de motilidad

Bacteria	Movilidad	Bacteria	Movilidad
<i>Pseudomonas</i> 741	+/-	<i>Kluyvera</i> 748	-
<i>Pseudomonas</i> 742	+/-	<i>Pseudomonas</i> 749	+/-
<i>Pseudomonas</i> 743	+/-	<i>Pseudomonas</i> 750	+/-
<i>Pseudomonas</i> 744	+/-	<i>Pantoea</i> 751	-
<i>Pseudomonas</i> 745	+/-	<i>Microbacterium</i> 752 a	-
<i>Pseudomonas</i> 746	+/-	<i>Variovorax</i> 752 c	-
<i>Pantoea</i> 747	-		

Para la motilidad se consideró positiva la presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.

En este ensayo se reporta que las bacterias del género *Pseudomonas* aisladas de la huerta de fresa mostraron motilidad intermedia, ya que su crecimiento sobre el medio de cultivo logro generar turbidez de manera tenue. La movilidad ofrece una ventaja para la supervivencia de las bacterias en su ambiente natural. Les permite buscar condiciones favorables y competir eficazmente con otros microorganismos. Además, de contribuir en la formación de biofilms, lo cual ayuda en el establecimiento de las interacciones simbióticas con sus huéspedes en la asociación planta-bacteria (Eberl *et al.*, 2007; Ottemann y Miller 1997). La motilidad es una característica deseable en las PGPB ya que, al ser inoculadas en los cultivos, la capacidad de movimiento les brinda una ventaja para competir y establecerse en la rizósfera, de esta manera el inoculo tiene mejores posibilidades de ejercer su papel como PGPB. Bacterias como *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Bacillus* se han reportado con motilidad, (Mavrodi *et al.* 2006; MacEachran y O´Toole, 2007). A pesar de que el resto de las bacterias no presentó motilidad, es conveniente realizar más pruebas para determinar su capacidad de supervivencia en condiciones de campo, ya sea por la capacidad de formar biofilms o secretar compuestos que les permitan competir con otros microorganismos.

**Tabla 6.** Caracterización bioquímica de las bacterias.

Cepa	Género	Solubilización de fosfatos	Sideróforos	AIA	Actividad quitinolítica	Prueba de motilidad
741	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	+/-
742	<i>Pseudomonas</i>	+/-	-	-	-	+/-
743	<i>Pseudomonas</i>	+/-	-	+/-	-	+/-
744	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+/-
745	<i>Pseudomonas</i>	-	-	+/-	-	+/-
746	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	+/-
747	<i>Pantoea</i>	+	-	+	-	-
748	<i>Kluyvera</i>	+	-	+	-	-
749	<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	+/-
750	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+/-
751	<i>Pantoea</i>	-	-	+	-	-
752a	<i>Microbacterium</i>	-	-	-	-	-
752c	<i>Variovorax</i>	-	-	-	-	-

Fueron empleados diferentes medios selectivos para determinar la capacidad de las bacterias aisladas como PGPB. La simbología + representa que dieron positivos ante el experimento. – indica que el resultado fue negativo. +/- indica que el resultado fue intermedio.

## 7.8 Resistencia a antibióticos

Se determinó la resistencia para cada una de las bacterias utilizando antibióticos de amplio espectro. Un betalactámico (ampicilina), dos aminoglucósidos (gentamicina y kanamicina), así como un fenicol (cloranfenicol). Los resultados de la prueba se presentan en la Tabla 10, apéndice 10.3, donde se muestran el diámetro en mm de la zona de inhibición del crecimiento producido por los antibióticos sobre el crecimiento de las bacterias. Para interpretar estos datos se recurrió a la BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy a través de la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) que indica las medidas estandarizadas para asignar la potencial susceptibilidad ante diversos antibióticos (Figura 15). Es así, que la interpretación de la inhibición se presenta en la Tabla 7, donde se reportaron a los organismos ya sea el caso como susceptibles (S), intermedio (I) o resistentes (R). En la Tabla 8 se encuentran agrupadas las bacterias en orden de mayor a menor grado de resistencia presentada.

Cabe mencionar, que en la Figura 15 se muestra marcado en rojo los antibióticos empleados en este experimento, sin embargo, ya que no se encontró la medida estandarizada para la kanamicina, se aplicaron los valores para la amikacina (subrayado en azul). Esto debido, a que la amikacina es derivada de la kanamicina; ambos antibióticos pertenecen al mismo grupo, los aminoglucósidos, los cuales son agentes antimicrobianos estructuralmente relacionados, con la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas bacterianas a nivel de los ribosomas. Son empleados principalmente para tratar infecciones causadas por bacterias aerobias Gram negativas (Kawaguchi *et al.*, 1972).

Antibiotic	MIC breakpoint (mg/L)			Disc content (µg)	Interpretation of zone diameters (mm)		
	R >	I	S ≤		R ≤	I	S ≥
<b>Aminoglycosides</b>							
Amikacin	16	16	8	30	15	16-18	19
Gentamicin	4	4	2	10	16	17-19	20
<b>Gentamicin Topical only</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>19</b>	<b>-</b>	<b>20</b>
Tobramycin	4	4	2	10	17	18-20	21
<b>Penicillins</b>							
Amoxicillin	8	-	8	10	14	-	15
Ampicillin	8	-	8	10	14	-	15
<b>Miscellaneous antibiotics</b>							
Chloramphenicol	8	-	8	30	20	-	21

**Figura 15.** Concentración mínima de inhibición (Minimum inhibitory concentration por sus siglas en inglés MIC) y puntos de corte de diámetro. En rojo los antibióticos empleados y en azul uno similar a la kanamicina perteneciente al mismo grupo y con similar efecto. Modificado de BSAC (2013).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema creciente en estos días. El aumento en el uso de antibióticos en el cuidado de la salud y la agricultura, a su vez, han contribuido a agravar este problema. Esta resistencia se adquiere por un cambio en la composición genética de los microorganismos que puede ocurrir por una mutación o por la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos entre organismos en el medio ambiente (Spain y Alm, 2003). Casi todos los mecanismos de resistencia bacteriana conocidos están codificados en plásmidos y trasposones (Silver y Waldeerhaug 1992). Diversos estudios con PGPB resistentes a antibióticos reportan que la resistencia múltiple a los antibióticos está asociada a un alto grado de tolerancia a metales pesados (Thacker et al., 2007; Wani *et al.*, 2009; Wani y Onokwue, 2014; Singh *et al.*, 2015). Se ha sugerido que, en condiciones ambientales de estrés metálico, los microorganismos resistentes a los metales y a los antibióticos se adaptarán más rápidamente por la propagación de factores R que por la mutación y la selección natural (Silver y Misra, 1988). Es debido a lo anterior que las bacterias que presentaron resistencia a diversos antibióticos tienen mayor potencial para ser empleadas como PGPB en condiciones de campo, ya que se aumentan las posibilidades de que el inoculo pueda sobrevivir y competir con el

resto de los microorganismos ya adaptados a la presencia de compuestos nocivos, tales como los pesticidas y fertilizantes acumulados en los suelos de los cultivos.

**Tabla 7.** Susceptibilidad de las bacterias según los índices de BSAC (2013), para la prueba de disco.

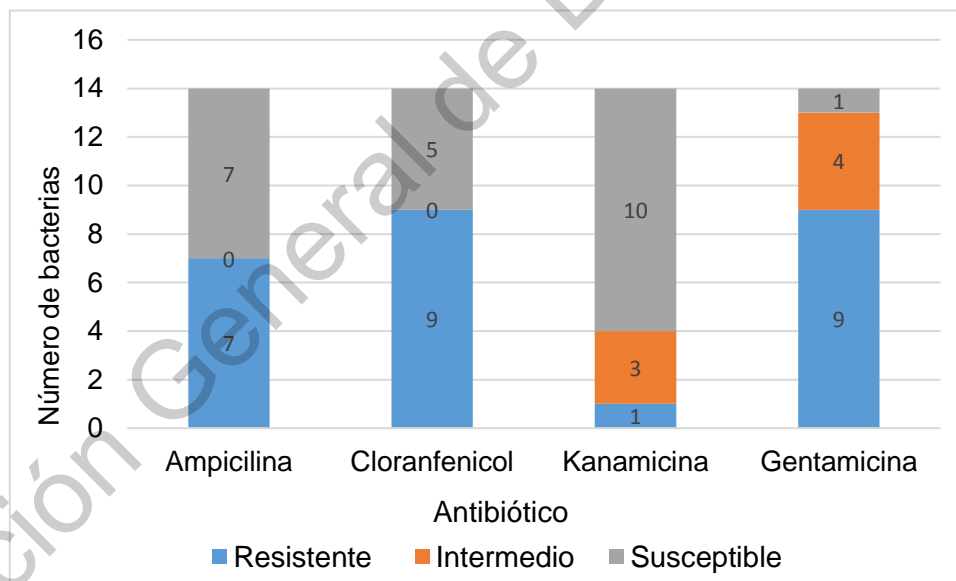
Bacteria	Ampicilina	Cloranfenicol	Kanamicina	Gentamicina
<i>Pseudomonas</i> 741	R	R	S	R
<i>Pseudomonas</i> 742	R	R	I	R
<i>Pseudomonas</i> 743	R	R	S	R
<i>Pseudomonas</i> 744	R	R	R	S
<i>Pseudomonas</i> 745	S	S	S	R
<i>Pseudomonas</i> 746	S	S	S	R
<i>Pantoea</i> 747	S	R	S	S
<i>Kluyvera</i> 748	S	S	S	I
<i>Pseudomonas</i> 749	R	S	S	R
<i>Pseudomonas</i> 750	R	R	S	R
<i>Pantoea</i> 751	R	R	I	R
<i>Microbacterium</i> 752a	S	R	S	S
<i>Variovorax</i> 752c	S	R	S	S
<i>E. coli</i>	S	S	I	R

R; indica resistencia al antibiótico, S; representa que la bacteria es sensible al antibiótico, I: representa una respuesta intermedia al antibiótico. Se realizaron dos replicas del ensayo.

**Tabla 8.** Bacterias que presentaron de mayor a menor grado de resistencia

Resistencia	Bacterias
Resistente a 3 e intermedio a 1	742, 751
Resistente a 3 y susceptible a 1	741, 743, 744, 750
Resistente a 2 y susceptible a 2	749
Resistente a 1 y susceptible a 3	745, 746, 747, 752a, 752c
Susceptible a 3 e intermedio a 1	748

Se realizó un histograma del efecto causado por cada antibiótico sobre las bacterias (Figura 16). En la cual se observa que de las bacterias estudiadas el 50 % mostró resistencia a la ampicilina, 64 % al cloranfenicol y la gentamicina, mientras que, sólo una bacteria (*Pseudomonas* sp. 744) fue resistente a la kanamicina. El género que mostró mayor resistencia a los antibióticos fue *Pseudomonas*.



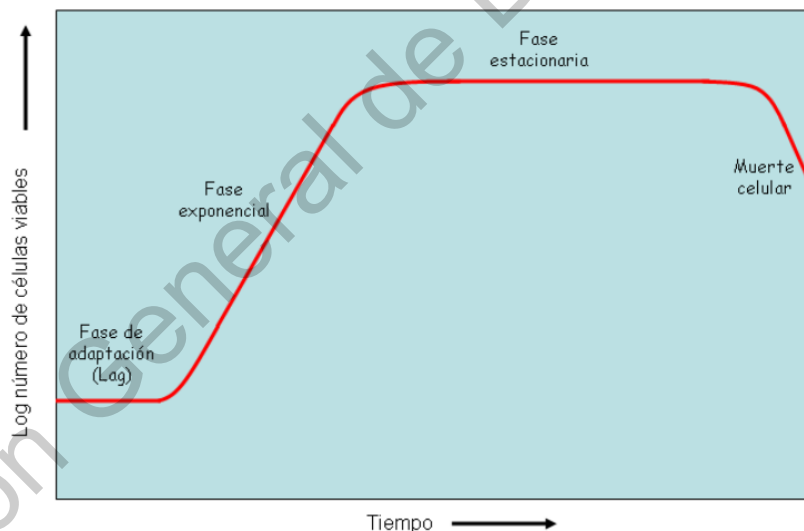
**Figura 16.** Respuesta ante cada antibiótico por parte de las bacterias

### 7.9 Curva de crecimiento

Con este experimento se buscó observar si las bacterias aisladas tienen potencial para ser empleadas en biotecnología, en cuanto a la velocidad de crecimiento celular y tiempo de generación. El conocimiento de cómo se expande

la población celular es útil para el diseño de métodos de control para el crecimiento microbiano y para estimar los productos que se pueden llegar a formular.

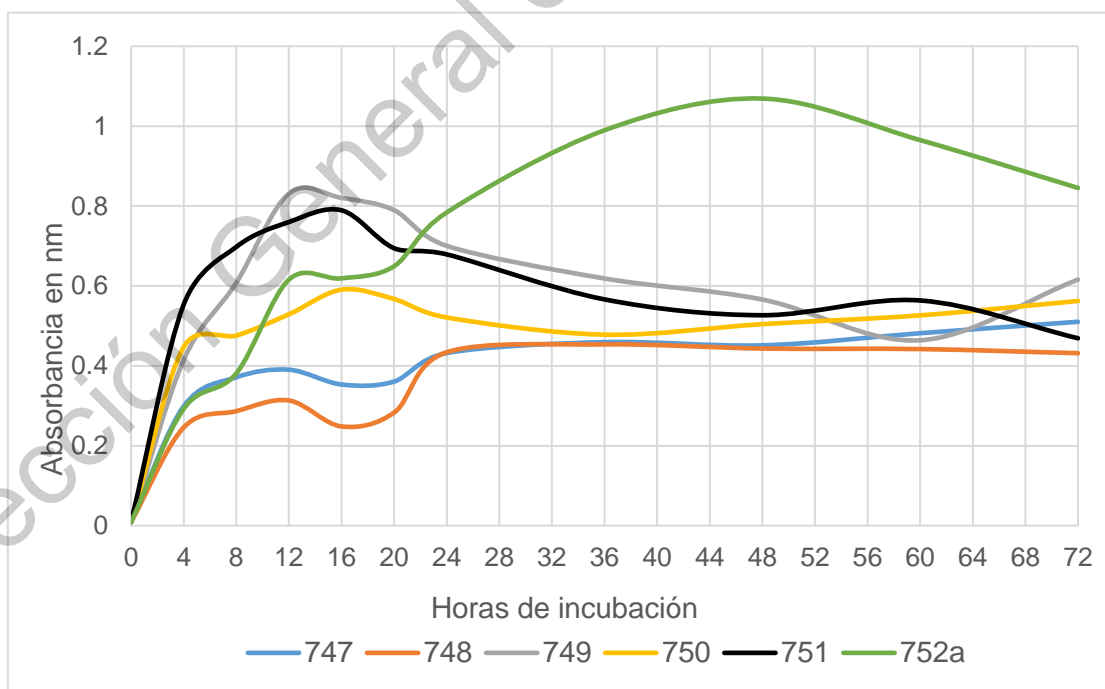
Como se muestra en la Figura 17 la producción de biomasa consta de diferentes fases: a) fase de adaptación que representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional; b) fase exponencial o de crecimiento balanceado, representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente; c) fase estacionaria. representa el periodo de crecimiento nulo. Se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía; y c) fase de muerte, después de alcanzar el mayor punto de producción de biomasa, la población se mantiene constante y comienza a disminuir debido a los limitantes nutricionales y las células pierden viabilidad (Prats *et al.*, 2006; 2008).



**Figura 17.** Fases del crecimiento celular bacteriano. Tomado de López (2016).

En este ensayo la producción de biomasa fue evaluada en seis de las trece bacterias caracterizadas, durante 72 horas a 150 rpm a 28 °C en CN. Las lecturas de absorbancia promediadas se reportan en la Tabla 11, apéndice 10.3. Los valores fueron graficados como se muestran en la Figura 18. En la Tabla 9 se muestra la hora de incubación en la cual cada bacteria presentó la máxima lectura de biomasa.

La bacteria 747 (*Pantoea* sp.) crece exponencialmente hasta las 24 horas donde su curva parece estacionarse hasta las 72 horas. De manera similar, la bacteria 748 (*Kluyvera* sp.) crece exponencialmente hasta las 24 horas, donde se establece su crecimiento, alrededor de los 0.4 nm de absorbancia, hasta las 72 horas. La 749 (*Pseudomonas* sp.) por su parte, crece exponencialmente hasta las 12 horas, donde alcanza su máximo volumen de biomasa, para posteriormente empezar a descender. En la 750 (*Pseudomonas* sp.) la curva alcanza su máximo pico a la hora 16 de incubación, después se reduce ligeramente su biomasa y se mantiene alrededor de los 0.5 nm de absorbancia hasta la hora 72. La 751 (*Pantoea* sp.) de manera similar a la 749 alcanza su máximo crecimiento de manera exponencial hasta las 16 horas, después su curva empieza a disminuir gradualmente hasta las 72 horas. Por último, en la bacteria 752a (*Microbacterium* sp.) su fase exponencial llega hasta las 48 horas donde empieza a decrecer hasta las 72 horas. Como se reporta en este ensayo, las velocidades de crecimiento pueden variar, por condiciones ambientales tales como temperatura y composición del medio o por las características genéticas de cada bacteria (Elfwing *et al.*, 2004).



**Figura 18.** Curva de crecimiento de biomasa registrado en la absorbancia a 600 nm de los cultivos bacterianos. Fueron realizadas tres replicas.



Un patrón observado en el crecimiento de los cultivos, fue un descenso y un estrechamiento de la distribución de biomasa al entrar en la fase estacionaria. Se sugieren varios procesos biológicos que operan a nivel celular para explicar esta observación. Nystrom (2004) destaca dos de ellos: en primer lugar, la tasa de crecimiento disminuye debido a las condiciones de inanición ocasionando la disminución de la biomasa. En segundo lugar, en condiciones de inanición, las bacterias pueden recurrir a la autodigestión o al crecimiento críptico para obtener energía adicional y sobrevivir, lo que también produce una disminución de la masa bacteriana. En consecuencia, se encuentra una disminución en la masa media en cultivos bacterianos durante la fase estacionaria, a pesar de que se conserva la biomasa total y el número de bacterias.

**Tabla 9.** Fase exponencial

Bacteria	Hora de máxima densidad óptica	nm
747	72	0.5103
748	36	0.4537
749	12	0.8313
750	16	0.5907
751	16	0.7893
752a	48	1.0690

Se muestran las horas de incubación en las cuales cada bacteria presenta mayor número de biomasa al ser cultivadas en CN a 28 °C con agitación constante de 150 rpm.

Las bacterias analizadas mostraron pasar del crecimiento exponencial a una fase estacionaria, donde la curva de absorbancia mostró una tendencia hacia el aplanamiento con cierta regularidad, a las pocas horas de incubación. Esto puede representar una ventaja a la hora de producir metabolitos secundarios. Ya que es en la fase estacionaria cuando las células bacterianas tienen inaccesibilidad de suplementos y comienzan a formar metabolitos secundarios. Este período también puede ser referido como la Idiofase. Los productos producidos en esta fase pueden estar vinculados a la tasa de crecimiento. El inicio del metabolismo secundario en muchos casos puede correlacionarse con condiciones nutricionales que limitan el crecimiento. Este comportamiento requiere la existencia de mecanismos

regulatorios que prevengan la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis durante la fase de crecimiento exponencial (Santana *et al.*, 1994; Sikander *et al.*, 2018).

Pasadas las 72 horas no se alcanza a visualizar en la curva un comportamiento de muerte celular. Para futuros experimentos es recomendable aumentar las horas de incubación en la caracterización del crecimiento de las bacterias aisladas, esto ayudaría a identificar con mayor claridad cuando inicia cada fase y modelar la curva más eficazmente.

### **7.10 Efecto promotor del crecimiento vegetal**

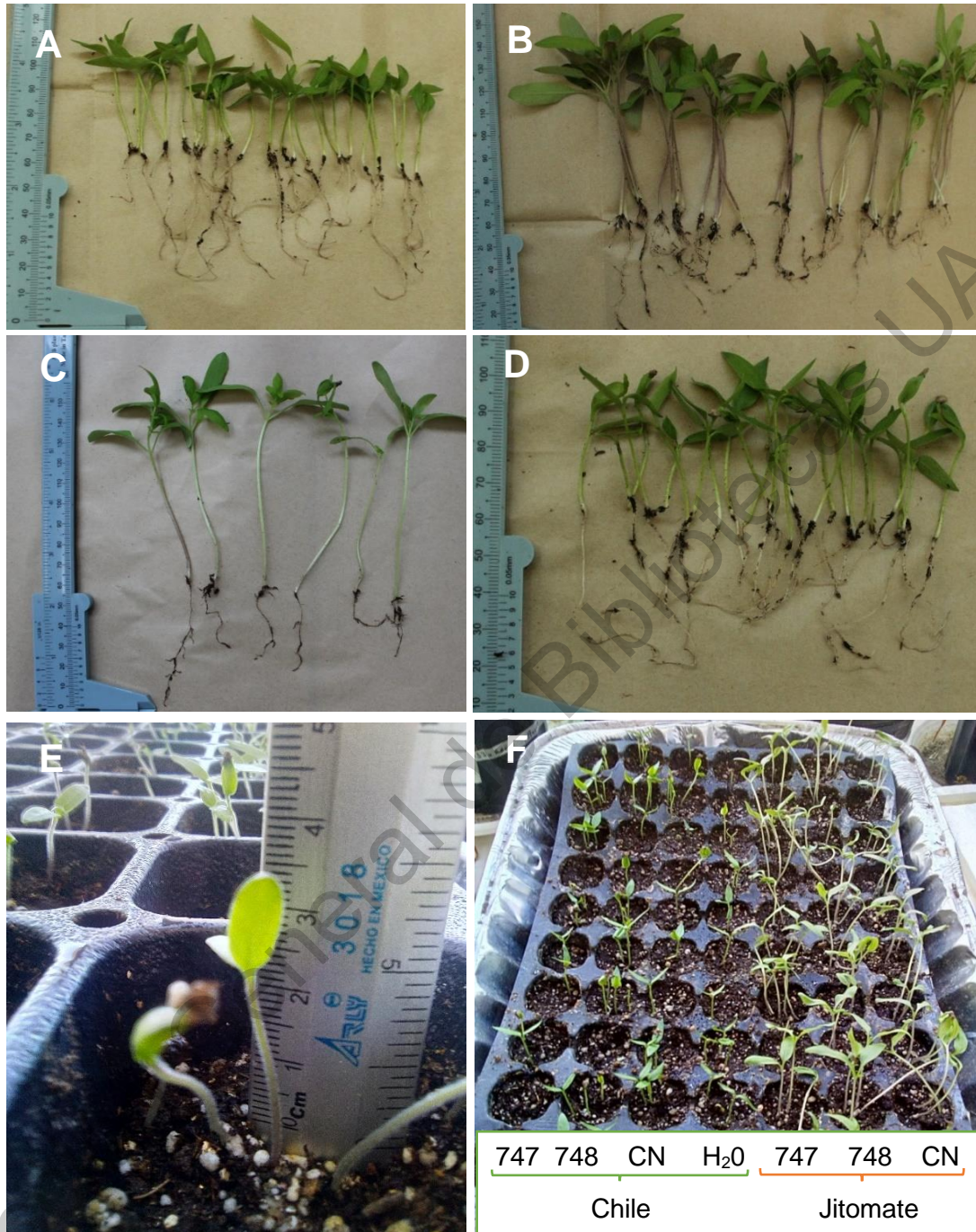
Para investigar si algunas de las bacterias seleccionadas tienen capacidad para promover el crecimiento vegetal, fueron seleccionadas las bacterias *Pantoea* sp. 747 y *Kluyvera* sp. 748, para observar su efecto promotor sobre plántulas de chile y jitomate durante 19 días. Esto debido a que ambas mostraron resultados positivos en las pruebas de producción de auxinas y solubilización de fosfatos (Tabla 6). Ya que se ha reportado que PGPB con ambas capacidades generan un efecto mayor de captación de nutrientes y promueven en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Ahmad *et al.*, 2008).

En la Figura 20 se muestran los resultados del efecto causado por las bacterias. Se reporta que, los inóculos bacterianos mostraron en ambas especies vegetales un aumento en el tamaño de la raíz lo cual se ve reflejado en la biomasa, como se observa en la Figura 19. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en el análisis de varianza ( $gl= 19$ ,  $F= 6.705$ ,  $p = 0.002$ ), siendo la 747 (*Pantoea* sp.) el tratamiento más efectivo para la promoción de crecimiento vegetal. Cabe destacar, que las semillas inoculadas con las bacterias germinaron un día antes que los controles.

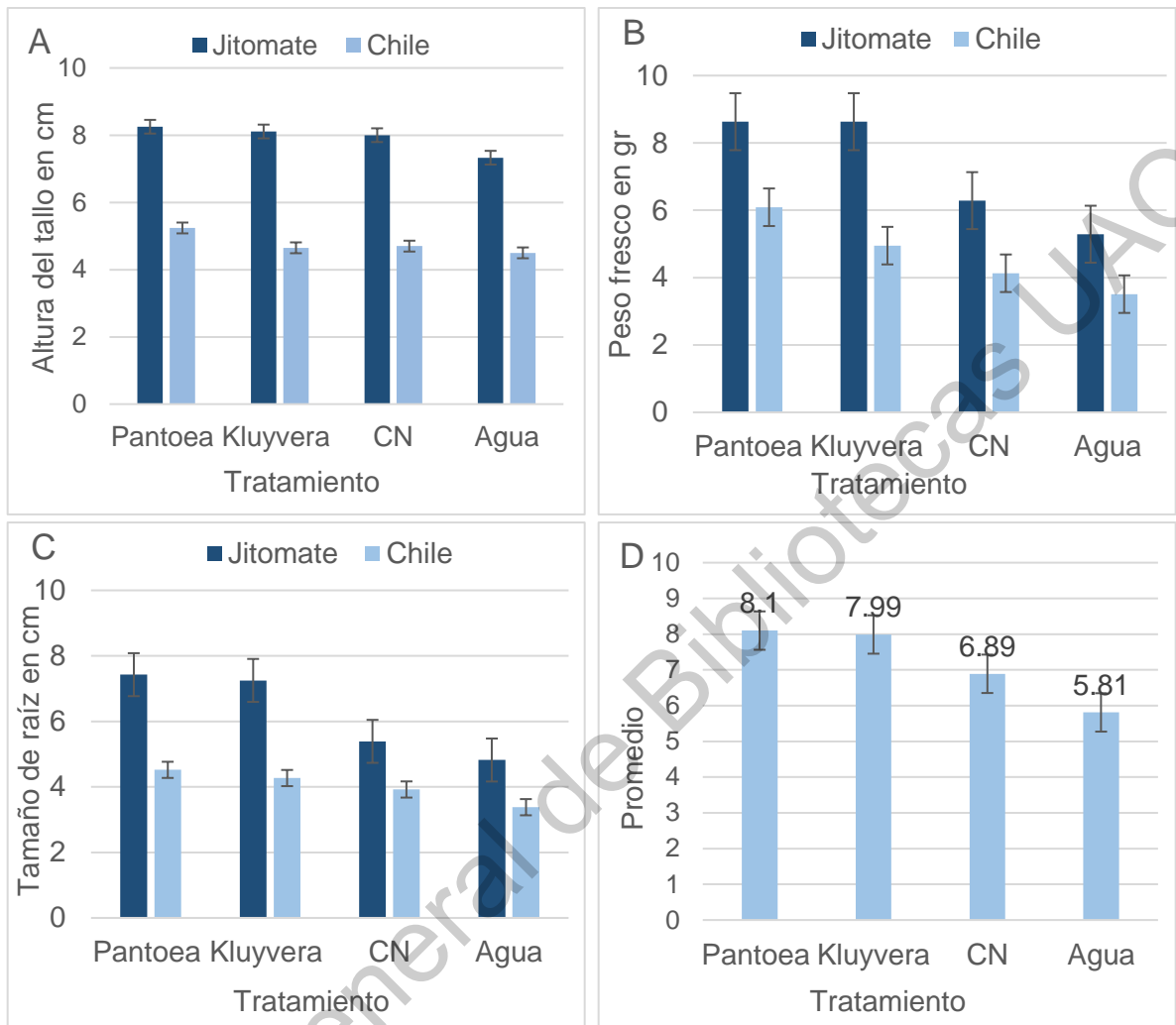
La mayor promoción del crecimiento radical de las plantas inoculadas con los endófitos pudo deberse a la producción de AIA, debido a que es el principal metabolito que induce el crecimiento de las plantas al aumentar la división celular en las raíces y la diferenciación de tejidos, efectos que se ven reflejados en una

mayor formación de biomasa (Santner *et al.*, 2009). Sin embargo, varios autores mencionan que algunas concentraciones de AIA producida por bacterias, pueden llegar a perturbar el crecimiento vegetal, tal es el caso de *Agrobacterium tumefaciens* que produce hasta  $78 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  de AIA, provocando la enfermedad conocida como "agalla de la corona" que se caracteriza por tumores en raíces, tallos y ramas de diversas especies (Wahyudi *et al.*, 2011). Por lo que la concentración del AIA necesaria para estimular el crecimiento de las plantas depende de cada especie.

Walpola y Yoon (2013), reportan que *Pantoea agglomerans* que solubiliza fosfato, sintetiza AIA, sideróforos, amonio, cianuro de hidrógeno y la enzima ACC desaminasa, coinoculada con *Burkholderia anthina*, incrementó el crecimiento de plantas de tomate. Resultados similares fueron reportados por Medina *et al.*, (2014), con cepas aisladas de cultivos de chile habanero en Yucatán. En cuanto al efecto de la solubilización de fosfato en plantas de jitomate El-Yazeid y Abou-Aly (2011), mostraron que las rizobacterias *Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus megaterium*, mejoraron significativamente diferentes parámetros de crecimiento de las plantas de jitomate (grosor del tallo, número de ramas y área foliar), contenido de pigmentos fotosintéticos, contenido mineral ( $\text{N}^+$ ,  $\text{P}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{+2}$ ), contenido total de azúcares, carbohidratos y proteína cruda en las hojas, así como la producción temprana y total de frutos. Resultados similares a los presentados en este experimento son reportados por Syed-Ab-Rahman y colaboradores (2019), con semillas de chile inoculadas con *Acitenobacter sp.* y *Bacillus amyloliquefacien*, donde muestran que no sólo la síntesis de AIA y ácidos orgánicos solubilizadores de fosfato promueven el crecimiento vegetal, sino los VOCs producidos por las bacterias y difusibles a través de la tierra ejercen un efecto promotor al incrementar los pelos radiculares, el tamaño de la raíz primaria y el desarrollo de raíces adventicias. Conforme a esto Gutiérrez-Luna *et al.*, (2010), mencionan que posiblemente las plantas responden a los VOCs alterando la arquitectura de su sistema radicular durante la relación de sus simbiontes y las rizobacterias asociadas, maximizando así los sitios de interacción. Esto indica que posiblemente las bacterias 747 y 748, son capaces de ejercer un efecto similar causado por la liberación de VOCs.



**Figura 19.** Estudio del efecto promotor de crecimiento en plántulas de chile y jitomate por las bacterias 747 *Pantoea* y 748 *Kluyvera*. A) Plántulas de chile inoculadas con la bacteria 747. B) Plántulas de jitomate inoculadas con la bacteria 748. C) Plántulas de jitomate sin inocular, tratadas sólo con agua potable como control. D) Plántulas de chile inoculadas con CN, control. E) Medición cada tercer día de las plántulas y conteo de la germinación. F) Charola de germinación, a la izq. los tratamientos con plántulas de chile y a la der. las de jitomate, en la primera semana de tratamiento. Se realizaron tres replicas de este experimento.



**Figura 20.** Efecto de los inóculos provenientes de 747 (*Pantoea* sp.) y 748 (*Kluyvera* sp.) en plántulas de jitomate y chile a los 19 días: A) Altura promedio del tallo de las plántulas; B) Peso promedio fresco de la biomasa; C) Tamaño promedio de las raíces. D) Promedio total del efecto de los tratamientos. Como controles se utilizó CN y agua.

## 8. CONCLUSIONES

Las bacterias aisladas de la rizósfera y endófitas de plantas de fresas cultivadas bajo manejo orgánico, tienen capacidad antagonista *in vitro* contra cuatro especies de hongos fitopatógenos *A. alternata* hasta casi un 67 %, seguido por *F. oxysporum* con 48 %, *C. gleosporoide* 44.5 % y *B. cinerea* en un 42 %, pese a no inhibir satisfactoriamente el crecimiento de *R. solani* (33 %) y *S. rolfsii* (24 %), se observó una importante inhibición en la producción del número de esclerocios. Entre las bacterias más eficientes en la actividad antagónica resaltaron 745, 746, 749 y 750, identificadas como *Pseudomonas* spp. Con un porcentaje de inhibición mayor al 60 %. Se necesitan más pruebas para confirmar el mecanismo de acción que ejercen contra los fitopatógenos, ya que en este estudio la actividad quitinolítica y la producción de sideróforos no fueron concluyentes. Se conjetura que metabolitos secundarios como antibióticos y o compuestos volátiles orgánicos son los responsables del antagonismo. Los extractos obtenidos con acetato de etilo no mostraron el efecto esperado sobre la germinación de esclerocios, es posible que el solvente no haya sido el indicado o el método empleado. A futuro se espera aplicar un método más efectivo, además, de realizar pruebas para lograr identificar las moléculas presentes en el extracto. De esta manera se podrá concluir cuales son los mecanismos de acción de las bacterias para mitigar a los patógenos.

Algunas bacterias cuentan con características de actividad promotora de crecimiento (producción de AIA y solubilización de fosfatos por medio de ácidos orgánicos). Lo cual fue evidenciado en la estructura radicular de plántulas de chile y jitomate inoculadas con *Pantoea* (747) y *Kluyvera* (748). Es conveniente, realizar pruebas en campo, para recopilar mayor información sobre la interacción planta-suelo-microorganismos-ambiente, de esta manera se podrán plantear estrategias para modular el desarrollo de inóculos que estimulen con mayor eficacia la productividad vegetal. También, es importante considerar el uso de las bacterias coinoculadas con el hongo benéfico *Trichoderma* para obtener un efecto sinérgico. Ya que las pruebas realizadas determinaron que únicamente dos bacterias del género *Pseudomonas*, fueron ligeramente antagonistas, a diferencia del resto que inclusive promueven la producción de cuerpos fructíferos, lo cual puede ser bastante

favorecedor para una mejor promoción del crecimiento vegetal. De igual manera, es importante realizar ensayos para determinar el posible efecto sinérgico entre dos o más bacterias coinoculadas.

La eficiencia de las bacterias PGPB, como biofertilizante depende de su capacidad de supervivencia, competencia e interacción con otros microorganismos en el medio ambiente (particularmente el suelo), así como su capacidad para promover el crecimiento de las plantas. Es debido a esto que las pruebas de susceptibilidad a antibióticos, otorgaron una visión sobre la capacidad de resistencia a compuestos nocivos, como pudieran ser los residuos acumulados en la aplicación de diversos agroquímicos, a los cuales se enfrentarían en condiciones de campo. Con el mismo fin, se realizó la prueba de motilidad, para dar noción de la capacidad de supervivencia y competencia que tendrían las bacterias al ser inoculadas en los cultivos. Las bacterias del género *Pseudomonas* (741, 742, 743, 744, 745, 746, 749 y 750) presentan esta capacidad y a pesar de que el resto de las bacterias aisladas no mostraron motilidad, existen otros mecanismos que son favorables a la hora de establecerse en los suelos de cultivo y asociarse con sus simbioses, como lo es la capacidad de formar biofilms, producir metabolitos secundarios y/o liberar VOCs que les permitan defenderse y competir con otros microorganismos, además, de responder a las diversas interacciones y adversidades encontradas en la rizósfera. Un atributo para la producción de inoculo, que exhibieron las bacterias aisladas, fue la reportada en la curva de crecimiento celular. Donde las bacterias muestreadas manifestaron una capacidad de reproducción que alcanzó rápidamente la fase estacionaria, en la cual se refleja la idiofase o la fase donde se producen los metabolitos secundarios. Esto implica una ventaja para la producción de inóculos o productos derivados de las bacterias. Ya que cuentan con un potencial para ser empleadas para desarrollar diversos productos biotecnológicos. Que puedan ser aplicados incluso en poscosecha, como es el caso de *Botrytis cinerea*, el cuál es el principal agente causal de la pérdida del fruto de fresa tanto en precosecha como en poscosecha.

Es fundamental realizar experimentos de invernadero para determinar la facultad de las bacterias aisladas de promover el crecimiento vegetal y al mismo tiempo controlar a los fitopatógenos, teniendo en cuenta todos los aspectos abordados en este trabajo de tesis, en cuanto a la producción de inóculo y las características identificadas de cada bacteria.

Un aspecto importante a considerar es que a menudo, las cepas utilizadas como biofertilizantes son introducidas a regiones donde no pueden competir con la microbiota local o no se adaptan a las condiciones del clima y suelo. Conforme a esto, es que recae la importancia de investigaciones como la llevada a cabo para este trabajo de tesis, ya que contribuyen al conocimiento de microorganismos autóctonos, provenientes de las cercanías del Estado. Se espera que, a futuro, éstas bacterias puedan ser utilizadas en la preparación de productos biofertilizantes, para mejorar la productividad de los cultivos de la región, especialmente sustituyendo o minimizando la utilización de productos químicos. De esta manera, las bacterias aisladas o sus productos, pueden llegar a ser empleados en diversos cultivos del Estado, o sus cercanías, como es el caso de la huerta de fresa de la cual fueron aisladas.

En la actualidad el empleo de agentes de control biológico y PGPB ha tomado mayor relevancia en el mundo. A pesar de esto, México un importante productor y exportador de diversos productos agrónomos para consumo humano y animal, continúa sosteniendo su producción haciendo uso de diversos agroquímicos. Lo cual repercute consecuentemente en el medio ambiente, la salud humana y la disponibilidad de recursos naturales, además de generar patógenos resistentes. Numerosos estudios realizados como el presente, hacen un esfuerzo por sumar y dar cuenta del potencial que implica el uso de microorganismos aislados de los suelos autóctonos, para cambiar la situación agrónoma actual y a futuro contar con diversas estrategias de manejo que sean inocuas y aporten un mayor acercamiento a las interacciones de las plantas cultivadas con sus simbioses.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, S. Safaie, N. Sadeghi, A. y Shamsbakhsh, M. 2020. Tissue-specific synergistic bio-priming of pepper by two *Streptomyces* species against *Phytophthora capsici*. PLoS ONE 15(3): e0230531.
- Agrawal, T. y Kotasthane, A. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springer. Plus. 2012, 1:73.
- Aguado-Santacruz, G. Moreno-Gómez, B. Jiménez-Francisco, B. García-Moya, E. y Preciado-Ortiz, R. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Rev. Fitotec. mex (35):1
- Ahemad, M. 2015. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. 3 Biotech 5, 111–121.
- Ahemad, M. y Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. J. King Saud Univ. Sci. 26, 1–20.
- Ahmad, F. Ahmad, I. y Khan, M. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol. Res. 163:173-181.
- Ahmed, E. y Holmstrom, S. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microb. Biotechnol. 7. 196–208.
- Ait, T. Ageron, E. Grimont, F. y Grimont P. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. Res Microbiology. 156. (5-6): 763-773.
- Akhtar, M. y Siddiqui, Z. 2008. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium sp.* and *Pseudomonas straita*. Crop Prot. 27:410-417.
- Alexander, D. y Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils. 12:39-45.
- Aliferis, A. y Jabaji S. 2012. FT-ICR/MS and GC-El/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection, PLoS ONE (7) e42576.
- Amaral, D. Magalhaes, M. Vilela, L. y Vanusa, M. 2008. Differential gene expression induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* infection in tomato. Pesq Agrop Bras. 43(8): 1017-1023.
- Arzate-Vega, J. Michel-Aceves, A. Domínguez-Márquez, V. y Santos-Eméstica, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma spp.* sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e Invernadero. Rev. Mex.Fitopat. 24, (2): 98-104.
- Backer, R. Rokem, S. Ilangumaran, G. Lamon, J. Praslickova, D. Ricci, E. Subramanian, S. y Smith, D. 2018. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. Front. Plant Sci. 9:1473.
- Baker, R. Tatum, J. y Nemeč, S. 1990. Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Fusaria*. Mycopathologia 111: 9-15.
- Barboza-Corona, J. Bautista-Justo, M. e Ibarra, J. 1998. Chitinolytic activity of *Bacillus thuringiensis* and potential use in the biological control of pest. Acta Universitaria 8: 57–65.

- Barboza-Corona, J. Contreras, J. Velázquez-Robledo, R. Bautista-Justo, M. Gómez-Ramírez, M. Cruz-Camarillo, R. e Ibarra, J. 1999. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 21: 1125–1129.
- Bauer, P. y Kirby, W. 1959. Single disc antibiotic sensitivity testing of *Staphylococci*. *A.M.A. Arch. Intern. Med.* 104: 208–216.
- Beattie, G. 2015. Microbiomes: curating communities from plants. *Nature* 528: 340–341.
- Bécquer, C. Salas, B. Archambault, D. Slaski J. y Anyia A. 2008. Selección de rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá, inoculados en maíz (*Zea mays*, L.). Fase I: invernadero. *Pastos y Forrajes* 31 (3): 229-246.
- Bender, S. Wagg, C. y van der Heijden, M. 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends Ecol. Evol.* 31: 440–452.
- Benito, E. Arranz, M. y Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinérea*. *Rev Iberoam Micol.* 17: 43-46.
- Berg, G. Grube, M. Schloter, M. y Smalla, K. 2014. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front. Microbiol.* 5: 148.
- Berg, G. Rybakova, D. Grube, M. y Koberl, M. 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* 67: 995–1002.
- Bhattacharya, A. 2010. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) quelation. *Cey. J. Sci. Bio. Sci.* 39 (2): 147-155.
- Boué, E. Croulet, B. Belkis, A. de la Torre, R. Betancourt, A. y Sánchez, R. 2011. Evaluación de reactivo de Kovac modificado. *Rev. Información Científica.* 70(2).
- Brader, G. Compant, S. Vescio, K. Mitter, B. Trognitz, F. Ma, L. y Sessitsch, A. 2017. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annu Rev Phytopathol.* 55:61–83.
- Bravo, J. del Rincón, C. Galindo, E. Patiño, M. Serrano, L. García, R. Pereyra, B. Alcázar, P. y Luna, O. 2006. Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. Cuernavaca, México. *Revista, Latinoamericana de Microbiología.* 48(2). 113 -120.
- BSAC. 2013. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.bsac.org.uk>
- Burd, G. Dixon, D. y Glick B. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol.* 46: 237-245.
- Butler, M. y Day, A. 1998. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.* 44:1115–1136.
- Çakmakçı, R. Mosber, G. Milton, A. Alatürk, F. y Ali, B. 2020. The effect of auxin and auxin-producing bacteria on the growth, essential oil yield, and composition in medicinal and aromatic plants. *Current Microbiology.* 77: 564–577.
- Cano, A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2): 15 – 31.
- Ceja, L. Téliz. D. Osada, S. y Morales, J. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del Estado de Michoacán, México. *Rev Méx Fito.*, 18: 79-86.
- Cha, J. Han, S. Hong, H. Cho, H. Kim, D. Kwon, Y. Kwon, S. Crusemann, M. Lee, Y. Kim, J. Giaever, G. Nislow, C. Moore, B. Thomashow, L. Weller, D. y Kwak, Y. 2016. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. *ISME J.* 10: 119–129.

- Chandanie, W. Kubota, M. y Hyakumachi, M. 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Applied Soil Ecology*. 41:336-341.
- Chandra, P. Eom, J. Hwang, S. Sang-Sik, N. Hyeong-Un, L. Joon-Seol, L. Gyeong-Dan, Y. Yong-Gu, K. Kyeong-Bo, L. San, G. y Jung-Wook, Y. 2017. Phylogenetic placement and morphological characterization of *Sclerotium rolfsii* (Teleomorph: *Athelia rolfsii*) Associated with Blight Disease of *Ipomoea batatas* in Korea. *Mycobiology*. 45(3): 129–138.
- Chauhan, H. Bagyaraj, D. Selvakumar, G. y Sundaram, S. 2015. Novel plant growth promoting rhizobacteria—prospects and potential. *Appl. Soil Ecol.* 95: 38–53.
- Chaves, M. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis presentada en opción al Título Académico de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 85.
- Chuang, C. Kuo, Y. Chao, C. y Chao, W. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. In: *Biol. Fert. Soils*. 43: 575-584.
- Clavijo, C. Chipana, V. Centeno, J. Zúñiga, D. y Guillén, C. 2012. Isolation, characterization and identification of diazotrophic bacteria in the rhizosphere of *Olea europea* “olive” crop in Tacna, Peru. *Ecología Aplicada*, 11(2).
- Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clement, C. y Barka, A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Env. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Compant, S. Samad, A. Faist, H. y Sessitsch, A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Advan. Res.* 19: 29–37.
- Coosemans, J. 2005. Dimethyl disulphide (DMDS): A potential novel nematicide and soil disinfectant. *Acta Hort.* 698: 57-64.
- Cordero, E. Ortega-Rodés, P. y Ortega, E. 2008. Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10 (1): 111-121.
- Couillerot, O. Ramírez-Trujillo, A. Walker, V. von Felten, A. Jansa, J. Maurhofer, M. Défago, G. Prigent-Combaret, C. Comte, G. Caballero-Mellado, J. y Moëne-Looco, Y. 2013. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum–Pseudomonas–Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:4639–4649.
- Coyne, M. y Rasskin, M. 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Editorial panamericana. 180 - 185.
- Dangi, S. Tirado-Corbalá, R. Gerik, J. y Hanson, B. 2017. Effect of long-term continuous fumigation on soil microbial communities. *Agronomy* 7:37.
- Deeba, F. Abdullah, S. Irfan, M. e Iqbal, Q. 2016. Chitinase production in organisms: a review. *Punjab University Journal of Zoology* 31 (1):101-106.
- Dennis, C. y Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Production of nonvolatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society* 57:25-39.
- Díaz-Zorita, M. y Fernández, C. 2008. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. En: Cassán F, Garcia de Salamone IE (eds.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. 155-166.

- Durán, P. Tortella, G. Viscardi, S. Barra, P. Carrión, V. Mora, M. y Pozo, M. 2018. Microbial community composition in take all suppressive soils. *Front. Microbiol.* 9:2198.
- Eberl, L. von Bodman, S. y Fuqua, C. 2007. Biofilm on plant surfaces. En: *The biofilm mode of life: mechanism and adaptation*. Kjelleberg, S. y Givskov, M. Ed. Horizon Bioscience, Lyngby, Denmark. 215-233.
- Edi-Premono, M. Moawad, M. y Vleck, P. 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian J. Crop. Sci.* 11: 13–23.
- El-Yazeid, A. y Abou-Aly, H. 2011. Enhancing growth, productivity and quality of tomato plants using phosphate solubilizing microorganisms. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5: 371-379.
- Elad, Y. Williamson, B. Tudzynski, P. y Delen, N. 2004. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic 223-241.
- Elfving, A. LeMarc, Y. Baranyi, J. y Ballagi, A. 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:675–678.
- Fahad, S. Hussain, S. Bano, A. Saud, S. Hassan, S. Shan, D. Khan, A. Khan, F. Chen, Y. Wu, C. Tabassum, A. Chun, M. Afzal, M. Jan, A. Jan, T. y Huang, J. 2015. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 4907–4921.
- Fernando, D. y Linderman, R. 1994. Inhibition of *Phytophthora vignae* and root rot of cowpea by soil bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture* 12: 1–14.
- Fernando, D. Ramarathnama, R. Krishnamoorthy, A. y Savchuk, S. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37: 955–964.
- Ferraris, G. y Courerot, L. 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas spp*) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 9:37-39.
- Freeman, S. Minz, D. Jurkevitch, E. Maymon, M. y Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopath.* Saint Paul. 90 (6): 608-614.
- Friesen, T. Faris, J. Solomon, P. y Oliver, R. 2008. Hostspecific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell Microbiol* 10: 1421–1428.
- Gadebusch, H. y Gabriels, S. 1956. Modified stable Kovacs's reagent for detection of indol. *Am. J. Cli. Pathol.*, 26: 1373.
- García de Salamone, I. Ortega, E. Gatica, M. Di Salvo, L. Vilches, M. Zubillaga, M. y Urquiaga, S. 2009. Effect of *Azospirillum* inoculation on N-cycling microorganisms associated with rice and wheat crops. En: 16th Nitrogen workshop, connecting different scales of nitrogen use in agriculture. Turin, Italy. 97-112.
- García, VG. Onco, MP. y Susan, VR. 2006. Revisión de biología y sistemática de la forma género *Rhizoctonia*. *Español J Agricultor Res.*4: 55-79.
- Gera, H. y Cook, R. 2005. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi nematode interactions. *Basic and Applied Ecology.* 6: 489-503.
- Giorgio, A. De Stradis, A. Lo Cantore, P. y Lacobellis, N. 2015. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* 6:1056.
- Gómez, R. Bruijn, I. Postma, J. y Raaijmakers, J. 2017. Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Front Microbiol.* 8: 2529.

- González, H. y Fuentes, N. 2017. Mechanism of action of five-plant growth promoter's microorganism. *Rev. Cienc. Agr.* 34(1).
- Gowsalya, A. Ponnusami, V. y Sugumaran, K. 2014. Isolation of bacteria from soil sample for Exo Polysaccharide production. *International J. ChemTech Res.*6. (5): 2925-2928.
- Greenshields, L. Guosheng, L. Feng, J. Selvaraj, G. y Wei, Y. 2007. The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol. Plant Pathol.* 8: 411-421.
- Gutiérrez-Luna, F. López-Bucio, J. Altamirano-Hernández, J. Valencia-Cantero, E. de la Cruz, H. y Macías-Rodríguez, L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis.* 51 (1): 75–83.
- Harman, G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopath.* 96:190-194.
- Harrington, J. y Crumbliss, M. 2009. The redox hypothesis in siderophore mediated iron uptake. *Biometals* 22:679-689.
- Hartmann, A. Rothballer, M. Schmid, M. Lorenz, J. y Hiltner, M. 2008. A pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 3. (12):7–14.
- Hernández-León, R. Rojas-Solís, D. Contreras-Pérez, M. Orozco-Mosqueda, C. Macías-Rodríguez, M. Reyes-de la Cruz, L. y Santoyo, G. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control.* 81:83- 92.
- Hernández-Salmerón, J. Hernández-Flores, B. Rocha-Granados, M. Loeza-Lara, P. y Santoyo, G. 2018. Hongos fitopatógenos modulan la expresión de los genes antimicrobianos phlD y hcnC de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* UM270. *Biotecnica.* 20. (2): 110-116.
- Herrera. C. Koutsoudis, M. Wang, X. y von Bodman, S. 2008. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of stewart's wilt disease development on maize. *MPMI.* 21. (10): 1359-1370.
- Huang, H. Erickson, R. Chang, C. Moyer, J. Larney, F. y Huang, J. 2002. Organic soil amendments for control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol. Bull.*11:207–214.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology. [asmscience.org](http://asmscience.org)
- Ji, P. Campbell, H. Kloepper, J. Jones, J. Suslow, T. y Wilaon, M. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control.* 36:358-367.
- Kai, M. Hautein, M. Molina, F. Petri, A. Scholz, B. y Pechulla, B. 2009. Bacterial volátiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:1001-1012.
- Kamal, M. Lindbeck, K. Savocchia, S. y Ash, G. 2015. Biological control of sclerotinia stem rot of canola using antagonistic bacteria. *Plant Pathology.* 64: 1375–1384.
- Kämpfer, P. y Glaeser, S. 2012. Prokaryotic taxonomy inn the sequencing era-the poluphasic approach revisited. *Environ. Microbiol.* 14. (2): 291-317.
- Karimi, K. Amini, J. Harighi, B. y Bahramnejad, B. 2012. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus spp.* against *Fusarium* wilt of chickpea. *AJCS* 6 (4): 695-703.
- Kawaguchi, H. Naito, T. Nakagawa, S. y Fujisawa, K. 1972. BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *The journal of antibiotics.* 25. (12): 695-708.

- Kessel, D. 2012. Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultrop* 33(3).
- Kim, B. Weon, H. Yoo, S. Lee, S. Kwon, S. Go, S. y Stackebrandt, E. 2006. *Variovorax soli* sp. nov., isolated from greenhouse soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2899–2901.
- Kim, H. Lee, J. Kang, B. Rong, X. McSpadden, B. Gardener, B. Ji, H. Park, S. y Kim, C. 2012. Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* B1-9, a nonpathogenic plant growth-promoting bacterium. *J Bacteriol* 194. (3): 729.
- Kim, H. Sang, Y. Jeun, B. Hwang, M. y Kim, M. 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling *Phytophthora* blight of pepper. *Crop Prot.* 27:436-443.
- Klindworth, A. Pruesse, E. Schweer, T. Peplies, J. Quast, C. Hom, M. y Glockner, F. 2013. Evaluación de los cebadores de PCR del gen del ARN ribosomal 16S general para estudios de diversidad basados en secuenciación clásica y de próxima generación. *Nuc.Aci.Res.*41:1.
- Kong, B. Tan, N. Fung, S. Pailoor, J. Tan, C. y Ng, S. 2016. Nutritional composition, antioxidant properties, and toxicology evaluation of the sclerotium of Tiger Milk Mushroom *Lignosus tigris* cultivar. *E. Nutr. Res.* 36:174–183.
- Lara, C. Esquivel, L. y Negrete, J. 2011. Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. *Biotecnología del sector agropecuario y agroindustrial.* 9(2): 114- 120.
- Lau, B. y Abdullah, N. 2017. Sclerotium-forming mushrooms as an emerging source of medicinals: current perspectives. En: Petre M. *Mushroom biotechnology: developments and applications.* Elsevier, San Diego: 111–136
- Laville, J. Blumer, C. von Schroetter, C. Gaja, V. Défago, G. Keel, C. y Haas, D. 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology.* 180:3187-3196.
- Liu, K. Newman, M. McInroy, J. Hu, C. y Kloepper, J. 2017. Selection and assessment of plant Growth-promoting rizobacteria for biological control of multiple plant diseases. *Phytopathology.* 107 (8): 928-936.
- Llorente, B. Alasia, M. y Larraburu, E. 2016. Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* culture of *Handroanthus ochraceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant. *N. Biotechnol.* 33: 32–40.
- López, L. 2016. Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. Conacyt. [https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia\\_de\\_conocimientos\\_Liz\\_Lopez\\_2015.pdf](https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia_de_conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf)
- Louden, B. Haarmann, D. y Lynne, A. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education.* 51-53.
- MacEachran, D. y O'Toole, G. 2007. Do not fear commitment: the initial transition to a surface lifestyle by *Pseudomonads*. En: *The biofilm mode of life: mechanism and adaptation.* Kjelleberg, S. y Givskov, M. Ed. Horizon Bioscience, Lyngby, Denmark. 23-36.
- Mahadevakumar, S. Yadav, V. Tejaswini, G. y Janardhana, R. 2016. Morphological and molecular characterization of *Sclerotium rolfsii* associated with fruit rot of *Cucurbita maxima*. *Eur J Plant Pathol.* 145 : 215–219.

- Massalha, H. Korenblum, E. Tholl, D. y Aharoni, A. 2017. Small molecules below ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *Plant J.* 90: 788–807.
- Mavrodi, O. Mavrodi, D. Park, A. Weller, D. y Tomashow, L. 2006. The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Microbiology* 152: 863-872.
- Medentsev, G. y Akimenko, V. 1998. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemsry*. 47 (6):935-959
- Medina, N. Chimal, J. Borges, G. Zúñiga, A. y Godoy, H. Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana*, 32. (4): 273-281.
- Meena, M. y Samal, S. 2019. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicology Rep.* 6:745–758.
- Meena, M. Zehra, A. Dubey, M. Aamir, M. Gupta, V. y Upadhyay, R. 2016. Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME), *Front. Plant Sci.* 7:1408.
- Megías, E. Megías, M. Ollero, F. y Hungría, M. 2016. Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG521, a rice plant Growth-Promoting bacterial endophyte isolated from the Guadalquivir marshes in Southern Spain. *Genome Announc.* 4(1): e01681-15.
- Mehmood, M. Zhao, H. Cheng, J. Xie, J. Jiang, D. y Fu, Y. 2020. Sclerotia of a phytopathogenic fungus restrict microbial diversity and improve soil health by suppressing other pathogens and enriching beneficial microorganisms. *J. Environmental Management* 259. 109857.
- Mendes, R. Garbeva, P. y Raaijmakers, J. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 37:634–63.
- Meyer, J. y Abdallah, M. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Michel-Aceves, A. Otero, S. Martínez, R. Ariza, F. Barrios, A. y Rebolledo, M. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. Guerrero, México. *Revista, Avances en Investigación Agropecuaria*, 12 (3): 55-68.
- Michielse, C. y Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10(3):311-324.
- Mignard, S. y Flandrois, J. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods.* 67: 574–581.
- Mondino, P. y Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos en plantas. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158.
- Mulner, P. Bergna, A. Wagner, P. Serajli, O. Gastottenmayn, B. Dietel, K. Grosch, R. Cernava, T. y Berg, G. 2019. Microiota associated with Sclerotia of Soilborne fungal pathogens – A novel source of biocontrol agents producing bioactive volatiles. *Phytobiomes. Journal.* 3:125-136.
- Mutuku, J. y Nose, A. 2012. Changes in contents of metabolites and enzyme activities in rice plants responding to *Rhizoctonia solani* Kuhn infection: activation of glycolysis and connection to phenylpropanoid pathway, *Plant Cell Physiol.* 53: 1017–1032.
- Nadarasah, G. y Stavrinides, J. 2014. Quantitative evaluation of the host colonizing capabilities of the enteric bacterium *Pantoea* using plant and insect hosts. *Microbiology.* 160: 602–15.
- Naiman, A. Latronico, A. García de Salamone, I. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology* 45: 44-51.

- Nakata, K. Inagawa, H. y Soma, G. 2011. Lipopolysaccharide IPPA1 from *Pantoea agglomerans* prevents suppression of macrophage function in stress-induced diseases. *Anticancer Res.* 31: 2437–40.
- Naureen, Z. Price, A. Hafeez, F. y Roberts, M. 2009. Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop Protection* 28: 1052-1060.
- Nautiyal, S. Bhadauria, S. Kumar, P. Lal, H. Mondal, R. y Verma, V. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils C. *FEMS Microbio. Letters* 182: 291-296.
- Nelson, M. y Sadowsky, M. 2015. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front. Plant Sci.* 6: 491.
- Nossa, C. Oberdorf, W. Yang, L. Aas, A. Paster, J. Desantis, Z. Brodie, L. Malamud, D. Poles, A. y Pei, Z. 2010. Diseño de los cebadores del gen 16S rRNA para 454 pirosecuenciaciones del microbioma intestinal humano. *WJG.* 16: 4135–4144.
- Nystrom, T. 2004. Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 161–181.
- Okubara, P. Dickman, M. y Blechl, A. 2014. Aspectos moleculares y genéticos del control de los patógenos necrotróficos transmitidos por el suelo *Rhizoctonia* y *Pythium*. *Plant Sci.* 228: 61-70.
- Ottemann, K. y Miller, J. 1997. Roles for motility in bacterial host interactions. *Mol. Microbiol.* 24: 1109-1117.
- Parada-Rojas, C. Quesada-Ocampo, L. Analysis of microsatellites from transcriptome sequences of *Phytophthora capsici* and applications for population studies. *Scientific Rep.* 8: 5194.
- Park, M. Chungwoo, K. Yanga, J. Hyoung-Seok, L. Wansik, S. Seunghwan, K. y Tongmin, S. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res.* 160 (2):127-33.
- Parra, G. y Ristaino, J. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Dis.* 85: 1069–1075.
- Pascale, A. Proietti, S. Pantelides, I. y Stringlis, I. 2020. Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. *Front. Plant Sci.* 10:1741.
- Patten, C. L. y Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology.* 68 (8): 3795-3801.
- Pedraza, R. Teixeira, K. Fernández, S. García de Salamone, I. Baca, B. Azcón, R. Baldani, V. Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria.* 11(2).155-164
- Pérez, C. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. La Habana, Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127-284.
- Pérez, E. Sulbaran, M. Ball, M. y Yarzabal, L. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil. Biol. Biochem* 39: 2905–2914.
- Pérez-Fragero, C. Camacho, M. y Cárdenas, R. 2020. Characterization of plant growth promoting bacteria isolated from red fruits. studies on growth promotion and fruit quality in strawberries plants. *Biosaia.* Núm. 9. Universidad Pablo de Olavide. <https://www.upo.es/revistas/index.php/biosaia/article/view/4760>



- Pichersky, E. Noel, J. y Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311:808–811.
- Pii, Y. Mimmo, T. Tomasi, N. Terzano, R. Cesco, S. y Crecchio, C. 2015. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growthpromoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol. Fertil. Soils* 51: 403–415.
- Pikovskaya R. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- Pileggi, M. Pileggi, S. Olchanheski, L. da Silva, P. Munoz, G. Koskinen, W. Barber, B. y Sadowsky, M. 2012. Isolation of mesotrone degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere*. 86: 1127–32.
- Pires da Silva, F. Vechiato, M. y Harakava, R. 2014. EF-1 $\alpha$  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum and *F. oxysporum* f. sp. Phaseoli reveals polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology* 39 (1): 064-073.
- Popova, A. Koksharova, O. Lipasova V. Zaitseva, J. Karkova-Zhukotskaya, O. Eremina, S. Mironov, A. Chermin, L. y Khmel, I. 2014. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganism, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Res. Int.* 1-11.
- Prats, C. Girdi, A. Ferrer, J. López, D. y Vives-Rego, J. 2008. Analysis and lbM simulation of the stages in bacterial lag phase: Basis for an updated definition. *J. Theor Biol.* 252, (1): 56-68.
- Prats, C. López, D. Giro, A. Ferrer, J. y Valls, J., 2006. Individual-based modelling of bacterial cultures to study the microscopic causes of the lag phase. *J. Theor. Biol.* 241: 939–953.
- Prusky, D. Mcevoy, J. Leverentz, R. y Conway, W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology*, Saint Paul, 91.(11): 1105-1113.
- Rakh, R. Raut, L. Dalvi, M. y Manwar, M. 2011. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. montellii* 9. *Recent Research in Science and Technology*. 3(3): 26-34.
- Rashad, F. Hayam, M. Ayatolla, S. El-Zayat, A. Ahlam, M. 2015. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research* 175:34-47.
- Rashid, M. Khalid, S. Ayub, N. Alam, S. y Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganism (PSM) under *in vitro* conditions. *Pak Jou of Bio Sci.* 7 (2): 187-196.
- Retana, K. Ramirez-Coche, J. Castro, O. y Blanco-Meneses, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en costa rica. *Agronomía Costarricense* 42(1): 115-126.
- Rives, N. Acebo, Y. y Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.
- Rodicio, M. y Mendoza, C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22 (4):238-45.
- Rodríguez, C. y Martín, H. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis presentada en opción a los Títulos Académicos de Microbiólogo Agrícola-Veterinario y Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 61.

- Rojas, D. Garrido, M. y Bonilla, R. 2009. Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium sp.* Strain. *Revista Corpoica - Ciencia y Tec Agropecuaria* 10(1):70-80.
- Rubio, G. 2002. Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 19:23.
- Rychlik, M. Lepper, H. Weidner, C. y Asam, S. 2016. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management, *Food Control* 68: 181–185.
- Sagarpa. 2017. Planeacion agricola nacional 2017-2030. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Saha, M. Sarkar, S. Sarkar, B. Sharma, B. Bhattacharjee, S. y Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 3984–3999.
- Saikia, S. y Vanita, J. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma. *Current Science* 92(3):317-322.
- Salas-Ovilla, R. Gálvez-López, D. Vázquez-Ovando, A. Salvador-Figueroa, M. y Rosas-Quijano, R. 2019. Isolation and identification of marine strains of *Stenotrophomona maltophilia* with high chitinolytic activity. *PeerJ* 7:e6102.
- Santana, C. Segura, D. y Sánchez, S. 1994. Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 36:139-158.
- Santner, A. Calderon-Villalobos, L. y Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology.* 5 (5): 301–307.
- Santoyo, G. Orozco-Mosqueda, M. y Govindappa, M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 855–872.
- Satola, B. Wübbeler, H. y Steinbüchel, A. 2013. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:541–560.
- Sayed, R. y Patel, P. 2011. Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-a-vis organophosphorus fungicide. *Indian J Microbiol.* 51(3): 266-272.
- Schlatter, D. Kinkel, L. Thomashow, L. Weller, D. y Paulitz, T. 2017. Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology*;107: 1284–97.
- Schwyn, B. y Neilands, J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 160: 47–56.
- Sergaki, C. Lagunas, B. Lidbury, I. Gifford, M. y Schäfer, P. 2018. Challenges and approaches in microbiome research: From fundamental to applied. *Front. Plant Sci.* 9:1205.
- Sharan, A. Darmwaln, S. y Gaur, S. 2008. *Xanthomonas campestris*, a novel stress tolerant, phosphate-solubilizing bacterial strain from saline-alkali soils. *World J Microbiol. Biotechnol.* 24:753-759.
- Shivalee, A. Divatar, M. Sandhya, G. Ahmed, S. y Lingappa, K. 2016. Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. *Journal of Advanced Scientific Research* 7(2):10-14.
- Sikander, A. Syeda, T. Syeda, F. y Muneeba, S. 2018. Strategies and kinetics of industrial fermentation for the mass production of various primary and secondary metabolites from microbes. *ejpmr.* 5:(6): 595-606.

- Silver, S. y Misra, K. 1988. Resistencias de metales pesados mediadas por plásmidos. *Annu Res. Microbiol.*, 42: 717-743.
- Silver, S. y Walderhaug, M. 1972. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Rev.* 56 (1): 195-228.
- Singh, R. Pathak, B. y Fulekar, M. 2015. Characterization of PGP traits by heavy metals tolerant *Pseudomonas putida* and *Bacillus safensis* strain isolated from rhizospheric zone of weed (*Phyllanthus urinaria*) and its efficiency in Cd and Pb removal. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(7): 954-975.
- Smith, D. Praslickova, D. y Llangumaran, G. 2015. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Front. Plant Sci.* 6:722.
- Smith, D. Gravel, V. y Yergeau, E. 2017. Editorial: signaling in the phytomicrobiome. *Front. Plant Sci.* 8:611.
- Smith, M. Henkel, T. Rollins, J. 2015. How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecol* 13:211–220.
- Smolinska, U. y Kowalska, B. 2018. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* a review. *J Plant Path.* 100:1–12.
- Smolinska, U. Kowalska, B. Kowalczyk, W. Szczech, M. y Murgrabia, A. 2016. Eradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. *J Horticultural Res* 24:101–110.
- Solanki, M. Singh, R. Srivastava, S. Kumar, S. Kashyap, P. Srivastava, A. y Arora, D. 2013. Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. *J Basic Microbiol*, 80: 1-14.
- Song, Z. 2018. Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors, and molecular mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:9873–9880.
- Sousa, S. Fermino, S. y Silva, G. 2009. Tomato seedlings grown in organic potting mix inoculated and incubated with streptomycetes. *Bragantia*.68 (1).
- Spaepen, S. Vanderleyden, J. y Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 31,(4): 425–448.
- Spaepen, S. y Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a001438.
- Spain, A. y Alm, E. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. Undergraduate Res.* 2: 1-6.
- Sun, X. Liu, D. Wang, Y. y Ma, A. 2020. Biogenesis of macrofungal sclerotia: influencing factors and molecular mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 104: 4227–4234.
- Syed-Ab-Rahman, Carvalhais, L. Chua, E. Chung, F. Moyle, P. Eltanahy, E. y Schenk, P. 2019. Soil bacterial diffusible and volatile organic compounds inhibit *Phytophthora capsici* and promote plant growth. *SciTotal Env.* 692: 267–280.
- Tapia, R. Ramírez, D. Salgado, S. Castañeda, V. Maldonado, Z. y Lara, D. 2020. Spatial distribution of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) in avocado in the State of Mexico, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología* 52. (1): 72-81.
- Thacker, U. Parikh, R. Shouche, Y. y Madamwar, D. 2007. Reduction of chromate by cell free extract of *Brucella sp.* isolated from Cr (VI) contaminated sites. *Bioresource Tech.* 98. (8): 1541-1547.
- Thomma, B. 2003. *Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol* 4: 225–236.

- Turner, T. James, E. y Poole, P. 2013. The plant microbiome. *Genome. Biol.* 14:209.
- Uribe-Lorío, L. Castro-Barquero, L. Arauz-Cavallini, F. Henríquez-Henríquez, C. y Blanco-Meneses, M. 2014. Pudrición basal causada por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile tratadas con vermicompost. *Agron. Mesoam.* 25(2):243-253.
- Useche, Y. Valencia, H. y Pérez, H. 2004. Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el Sur del Trapecio Amazónico. *Acta biol. Colomb.* 9. (2):129-130.
- Vásquez, P. Holguín, G. Puente, M. López, A. y Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 460-468.
- Vega-Celedón, P. Canchignia, M. González, M. y Seeger, M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *cultrop.*37(1)
- Wahyudi, A. Astuti, R. Widyawati, A. Meryandini, A. y Nawangsih, A. 2011. Characterization of *Bacillus sp.* strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *J. Microbiol. Antimicrobials* 3: 34-40.
- Walpola, B. y Yoon, H. 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorus uptake. *African J. Microbiol. Res.* 7: 266-275.
- Walterson, A. y Stavrinides, J. 2015. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews.* 27(39): 968–984.
- Wandersman, C. y Delepelaire, P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:611-647.
- Wang, Y. Sun, Y. Zhang, Y. Zhang, X. y Feng, J. 2016. Antifungal Activity and Biochemical Response of Cuminic Acid against *Phytophthora capsici* Leonian. *Molecules.* 21(6), 756.
- Wang, Y. Sun, Y. Zhang, Y. Zhang, X. y Feng, J. 2016. Antifungal activity and biochemical response of cuminic acid against *Phytophthora capsici* Leonian. *Molecules.* 21:756.
- Wani, P. y Onokwue, I. 2014. Screening of microbes for their metal, antibiotic resistance and plant growth promoting activity. *Current Res. Bacteriology.* 7: 22-31.
- Wani, P. Zaidi, A. y Khan, S. 2009. Chromium reducing and Plant Growth Promoting potential of mesorhizobium species under chromium stress. *Bioremediation J.* 13. (3): 121-129.
- Whitelaw, W. Curtis, S. Huang, R. Steel, C. Blandchard, C. y Roffey, P. 2007. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology, Chichester.* 56. (3): 448-463.
- Woese, C. Stackebrandt, E. Macke, J. y Fox G. 1985. Una definición filogenética de la mayor taxa eubacteriana. *Syst Appl Microbiol.*;6:143-51.
- Worasatit, N. Sivasithamparam, K. Ghisalberti, E. y Rowland, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98:1357-1363.
- Wu, B. Subbarao, K. y Liu, Y. 2008. Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Phytopathology* 98: 659–665.
- Xie C. 2012. Compatibilidad del micelio y la diversidad patogénica entre *Sclerotium rolfsii* aislados en el sureste de Estados Unidos [tesis] Gainesville (FL): Universidad de Florida; 2012.

- Xu, Z. 2008. Overwinter survival of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii*, screening hosta for resistance to *S. rolfsii* var. *delphinii*, and phylogenetic relationships among *Sclerotium* species. (2008). Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. 10366. <https://lib.dr.iastate.edu/etd/10366>
- Xue-Min, R. Shi-Jun, G. Wei, T. Yan, C. Hui, H. Chen, E. Bai-Lian, L. Yu-Ying, L. y Zhao-Jin, C. 2019. Effects of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural Soil. *Front. Microbiol.* 10: 1455.
- Yakoby, N. Beno, D. Keen, N. Dinooor, A. Pines, A. y Prusky, D. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* PeIB is an important virulence factor in avocado fruit–fungus interaction. *Mol Plant–Microbe Int.*, 14: 988-995.
- Yamamoto, S. Kasai, H. Arnold, D. Jackson, R. Vivian, A. y Harayamas, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intergenic structure reconstructed from nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology.* 146: 2385-2394.
- Yang, F. y Cao, Y. 2012. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 93:487-495.
- Yap, Y.H., Tan, N., Fung, S., Aziz, A.A., Tan, C., Ng, S., 2013. Nutrient composition, antioxidant properties, and anti-proliferative activity of *Lignosus rhinocerus* Cooke sclerotium. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2945–2952.
- Zeng, W. Wang, D. Kirk, W. y Hao, J. 2012. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol Control* 60:225–232.
- Zhang, R. Vivanco, J. y Shen, Q. 2017. The unseen rhizosphere rootsoil- microbe interactions for crop production. *Curr. Opin. Microbiol.* 37: 8–14.
- Zhang, Y. Xu, J. Riera, N. Jin, T. Li, J. y Wang, N. 2017. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus rootassociated microbiome. *Microbiome* 5:97.

## 10. APÉNDICE

### 10.1. Medios de cultivo

#### 10.1.1 Agar nutritivo (AN)

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Agar bacteriológico	12 g
Dextrosa	1 g
Peptona	15 g
Cloruro sódico	6 g
Extracto de levadura	3 g

El pH final es de  $7.5 \pm 0.2$

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 10.1.2 Agar Luria-Bertani (LB)

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	10 g

El pH final es de  $7.2 \pm 0.2$

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 10.1.3 Caldo nutritivo (CN)

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Agar bacteriológico	12 g
Dextrosa	1 g
Peptona	15 g
Cloruro sódico	6 g
Extracto de levadura	3 g

El pH final es de 6.9.

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 10.1.4 Papa dextrosa agar (PDA)

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Agar bacteriológico	15 g
Dextrosa	20 g
Infusión de papa	4 g

El pH final es de  $5.6 \pm 0.2$ .

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 10.1.5 Pikovskaya (PVK)

Composición

Para 1 Litro

Ingrediente	g/L
Glucosa	10 g
NaCl	0.2 g
KCl	0.2 g
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Tricalcio de fosfato	5 g
FeSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0.004 g
MnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0.008 g
Agar bacteriológico	18 g
Purpura de bromocresol	0.04 %

FeSO<sub>4</sub> - 7 H<sub>2</sub>O y MnSO<sub>4</sub> - 7 H<sub>2</sub>O se prepararon en solución stock diluyendo 0.1 g en 10 mL de agua destilada.

Se ajusta el pH a 6.8 con una solución de NaOH y HCl 1 molar.

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a 121 °C.

### 10.1.6 Medio Fe-CAS

Con antelación se debe lavar la cristalería con HCl 6 M y ser enjuagada con agua destilada para retirar cualquier residuo que pudiera alterar el pH.

Consiste en 4 soluciones:

La solución 1, o solución indicadora Fe-CAS se preparará mezclando 10 mL de una solución 1 mM de FeCl<sub>3</sub> - 6H<sub>2</sub>O (en HCl 10mM) con 50 mL de una solución acuosa de CAS (Cromo azurol S) con una concentración de 1.21 mg/mL. La mezcla se adiciona a 40 mL (1.82 mg/mL) de una solución acuosa de HDTMA (Bromuro de Hexadecil-trimetil-amonio). La solución resultante se esteriliza en autoclave.

La solución 2, o solución reguladora se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES (piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico]), en 800 mL de una solución salina de 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl, 1.0 g de NH<sub>4</sub>Cl. Para disolver el PIPES se ajusta el pH a 6.8 con KOH al 50 % (5 g de KOH en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada). Se adicionan 15 g de agar y se esteriliza en autoclave.

La solución 3, 70 mL de agua se adicionaron 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg de MgSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O, 11 mg de CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mg MnSO<sub>4</sub> - H<sub>2</sub>O, 1.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.04 mg CuSO<sub>4</sub> - 5H<sub>2</sub>O, 1.2 mg ZnSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O y 1.0 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> - 2H<sub>2</sub>O y se esteriliza en autoclave.

La solución 4, consiste de 30 mL de casaminoácidos al 10 % (p/v), esterilizados por filtración.

La solución 3 se adiciona a la solución reguladora junto con la solución de casaminoácidos. La solución indicadora se adiciona al final con suficiente agitación evitando la formación de burbujas y obteniendo una coloración azul celeste.

### 10.1.7 Caldo Tripteína Soya enriquecido con triptófano

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Tripteína	17 g
Peptona de soya	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g

Se adicionan 500 mg de triptófano por cada 100 mL de caldo tripteína soya.

El pH final es de 7.3

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a 121 °C.

### 10.1.8 Medio de quitina

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
NaCl	0.5 g
Extracto de levadura	0.05 g
Agar bacteriológico	15 g
Quitina coloidal	10 g

Se ajusta el pH 7 con NaOH 1 molar.

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a 121 °C.

### 10.1.9 Medio SIM

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Agar bacteriológico	3.5 g
Peptona de caseína	20 g
Peptona de carne	6.1 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Sulfato de amonio férrico	0.2 g

El pH final es de 7.3.

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a 121 °C.

### 10.1.10 Agar Mueller Hinton

Composición

<b>Ingrediente</b>	<b>g/L</b>
Agar bacteriológico	15 g
Peptona ácida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Infusión de carne	300 g

El pH final es de 7.3.

Se diluyen los ingredientes en un litro de agua destilada y se esteriliza a 121 °C.



## 10.2. Reactivos

### 10.2.1 Purpura de bromocresol

Para obtener una concentración de 0.04 % se diluyen 0.01 g de purpura de bromocresol en 25 mL de agua destilada.

Se conserva a temperatura ambiente en un tubo cónico

### 10.2.2 Reactivo de Kovac

Composición

Ingrediente	Cantidad
Para-dimetil-aminobenzaldehído	10 g
Alcohol isoamílico	150 mL
Ácido clorhídrico concentrado	50 mL

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se añade el ácido lentamente.

Se almacena a 4 °C en un frasco de vidrio color ámbar cuando no esté en uso.

### 10.2.3 Rojo Congo

Para obtener una concentración de 5 % se diluye 0.1 g de rojo Congo en 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

Se conserva a en un tubo cónico a 4 °C.

## 10.3 Tablas suplementarias

Tabla 10. Diámetro del halo de inhibición en mm

Bacteria	Ampicilina	Cloranfenicol	Kanamicina	Gentamicina
741	10	19	21	0
742	12	19	18	8
743	0	15	20	0
744	0	15	6	23
745	22	25	26	0
746	15	27	30	10
747	20	18	29	23
748	19	25	23	18
749	11	21	26	16
750	10	20	24	0
751	0	15	17	0
752a	30	20	23	35
752c	18.5	17	33	38
<i>E. coli</i>	23	22	18	12

El diámetro del halo de inhibición en mm de cada bacteria en respuesta al antibiótico correspondiente.

**Tabla 11.** Curva de crecimiento

Horas	747	748	749	750	751	752a
4	0.2987	0.2457	0.4143	0.4473	0.5533	0.2923
8	0.3713	0.2867	0.6080	0.4757	0.6977	0.3810
12	0.3903	0.3133	0.8313	0.5290	0.7600	0.6157
16	0.3533	0.2483	0.8203	0.5907	0.7893	0.6190
20	0.3607	0.2830	0.7897	0.5673	0.6943	0.6493
24	0.4320	0.4340	0.7003	0.5210	0.6790	0.7840
36	0.4593	0.4537	0.6187	0.4780	0.5663	0.9897
48	0.4513	0.4433	0.5660	0.5043	0.5267	1.0690
60	0.4817	0.4420	0.4640	0.5263	0.5637	0.9650
72	0.5103	0.4317	0.6160	0.5623	0.4690	0.8453

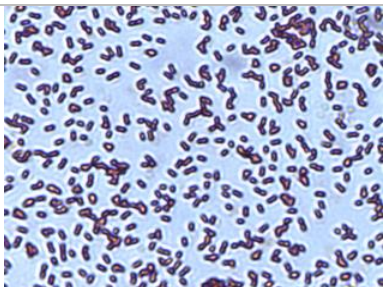
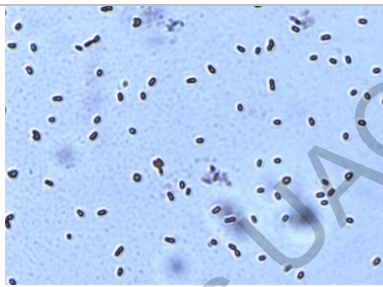
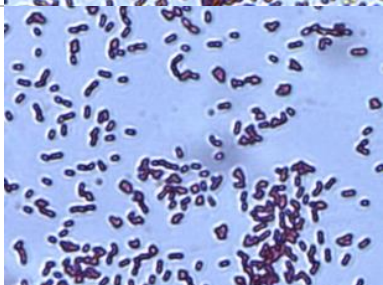
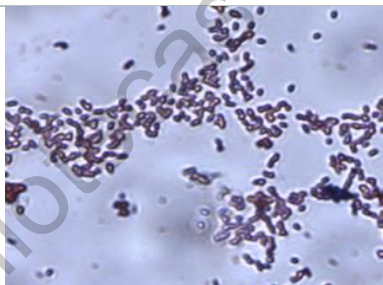
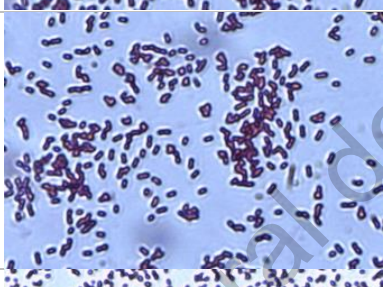
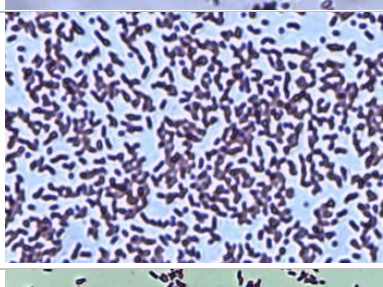
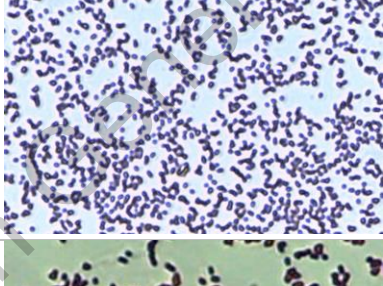
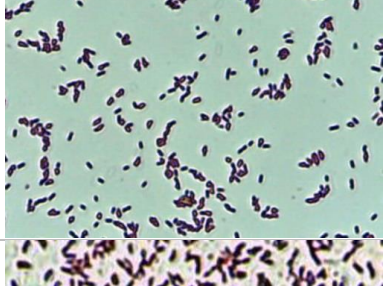
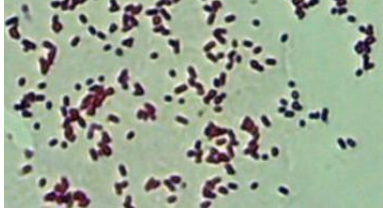
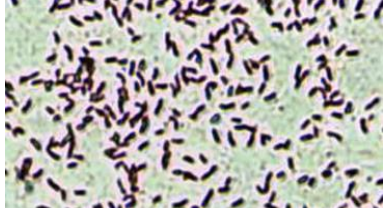
La absorbancia se midió cada 4 horas a 600 nm, el resultado es el promedio de tres muestras utilizadas para cada bacteria. Como blanco se tomó la absorbancia del medio de cultivo.

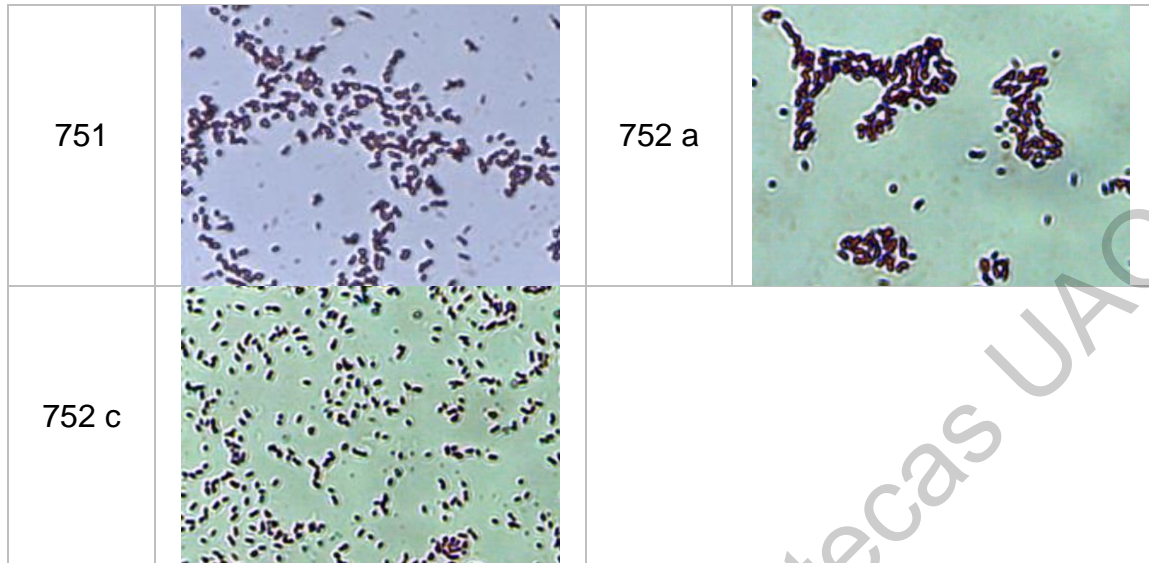
#### 10.4 Registro fotográfico

Ejido la Calera, Gto. Huerta de fresas (*Fragaria ananassa* var. Camino Real) con manejo orgánico. Sus coordenadas geográficas son longitud oeste (dec): -101.345906 y latitud norte (dec): 20.788079; a 1740 msnm.



## Tinciones Gram

Bacteria	Foto	Bacteria	Foto
741		742	
743		744	
745		746	
747		748	
749		750	



### 10.5 Secuencias ensambladas del gen 16S rRNA

> 741

GTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  
 AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGA  
 GTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTC  
 TGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACC  
 TTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGG  
 TTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGT  
 CAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCCG  
 CGTTGCTTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT  
 TGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTTCCAACG  
 GCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCAC  
 CTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACC  
 GCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGA  
 GCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACG  
 CTTGACCCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGCCTCCGCCGGTGTATTCTGTGCGGTAACGTCAA  
 AACAGCAAGGTATTCGCTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCC  
 ACACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATTGTCCTTCCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
 CTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGA  
 GCCATTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGC  
 TTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAAACGTTGTCCCCACTACCAGGCAGATTCC  
 TAGGCATTACTACCCGTCGCGGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGCA

> 742

ACCGTCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTGA  
 CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTC  
 GAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCC  
 TCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCA  
 CCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAG  
 GGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG  
 TGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCT  
 TCGCGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAA  
 CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTTCCA  
 ACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG  
 CACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTCC  
 ACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGG  
 TTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTA  
 ACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTAACGT

CAAAACAGCAAGGTATTCGCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTT  
CACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTTCGCCATTGTCCAATATTCCTCCACTGCTGCCCTCCCGTAGG  
AGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGG  
TGAGCTTACCCCACTAGCTAATCCGACTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGGAAGGTCCCC  
TGCTTTTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGA  
TTCTAGGCATTACTACCCGTCGCGGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGCA

> 743

GGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA  
ACGTATTCACCCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT  
CGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCGACC  
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCACCTTCCCTCCCGGT  
TTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGT  
TACGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCC  
GAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCG  
AATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTA  
CTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGAC  
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAACGCTTTCGACCTCAGTGTCA  
GTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTCCACCGTACACAG  
GAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGG  
CTTTACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCC  
TCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAACAGCAAG  
GTATTTCGCTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGC  
ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGT  
GTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACC  
CCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGGAAGTCCCCTGCTTCTCCCG  
TAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTA  
CTACCCGTCGCGGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGCA

> 744

GTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA  
CGTATTCACCCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTG  
CGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCGACCA  
TTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCACCTTCCCTCCCGGT  
TGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGT  
ACGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCC  
GAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCG  
AATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTA  
CTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGAC  
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAACGCTTTCGACCTCAGTGTCA  
GTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTCCACCGTACACAG  
GAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGG  
CTTTACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCC  
TCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAACGTCAAAACAGCAAG  
GTATTTCGCTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGC  
ATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGT  
GTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACC  
CCACCACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGGAAGTCCCCTGCTTCTCCCG  
TAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTTCGAAACGTTGTCCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTA  
CTACCCGTCGCGGCTGAATCAAGGAGCAAGCTCCCGTCATCCGCTCGACTGC

> 745

AGGACTGATCACCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAGCTATTACCCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGC  
GATCCGACTTACGCAGTCGAGTTCGAGACTACGATCCGACTACGATCGGTTTTGTGGATTAGTCTCC  
ACTTCGCGGCTTGGCAACCCCTGTACCGACCAATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCAT  
GATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAAC  
GTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGA  
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCAATTGGATG  
TCAAGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC  
GTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCA  
CTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT

GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTACAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC  
CTTCCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTTACCATACTCTAGCTCGTCAG  
TTTTGAATGCAGTTCAGGTTAAGCCCGGGCTTTACATCCAACCTTAACGAACCACCTACGCGCGCTT  
ACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTGTATTACCCGCGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGT  
GCTTATTCTGTCCGTAACGTCAAAAACCATCACGTATTAGGTAATGGGCCTTCTCCAACTAAAGTGCTTT  
ACAATCGAAGACTTCTTACACACGCGCATGCTGGATCAGCTTCGCCATGTCAATATCCCACTGCTGCTTC  
GGTAGAGTCTGACGGTTTCAGTCAGTGTGACTGATCTTCTCGACAGTACGATGCGTGCCTGGTGACCAAT  
CACGTCACAACCTAGCTAT

> 746

GGTAGACTAGCTACTTCTGGTGCACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGGAA  
CGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACCGAGTCGAGTTGCAGACTG  
CGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTGTACCGACCA  
TTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTT  
TGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTT  
ACGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCCCG  
AAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGA  
ATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAC  
TCCCAGGGCGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACA  
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAG  
TATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGA  
AATTCACCACCCTTACCATACTCTAGCTCGTCAGTTTTGAATGCAGTTCAGGTTAAGCCCCGGGCTT  
TCACATCCAACCTTAACGAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTCT  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTCCGTAACGTCAAAAACCATCACGTA  
TTAGGTAATGGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATG  
GCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT  
TCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCCGCTTGGTGAGCCATTACCTCA  
CCAACCTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCTGCTTTCTCCCGTAG  
GACGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACT  
CACCCGTCGCGCGCTCTCAAGAGGTGCAAGCACCTCTTACCCTCGACTGCA

> 747

TGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGTCTCGGGTGCAGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAYGTCTGG  
GAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAA  
AGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATG  
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGCAGACAGGTC  
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC  
GTGTATGAAGAAGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGGTGAAGTTAATARCTTC  
ACCGATTGACGTTACCCGCAGAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG  
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTGGATGTGAAATC  
CCCCGGCTTAACCTGGAACTGCATTGAACTGCAAGCTGCGAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAATTC  
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAG  
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAC  
GATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTGAGGAGTGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCT

> 748

CGCCCTCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCG  
AGTTGCAGACTCCGATCCGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT  
TTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCAC  
CTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGG  
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCT  
CAGAGTTCGGAAGGCACCAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCG  
CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT  
TGCAGGCTACTCCCAGGCGGTGCATTAACCGCTTACTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACC  
TCCAAGTCGACATCGTTTACGCGGTGGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACCGCTTTCGCA  
CCTGAGCGTCACTTTGTCCAGGGGGCCGCTTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTCA  
CCGCTACACCTGGAATTTACCCCTCTACAAGACTCCAGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCCAGGT  
TAAGCCCCGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTA  
ACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACG  
TCAATCGGTGAAGCTATTAACCTTACCAGCCTTCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCT  
TCATACACGCGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG

GAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCACTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTA  
GGTGAAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGTGTGAGGCCCGAAGGTC  
CCCCACTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCA  
GTTTCCCAGACRRTTACTCACCCGTCGCCACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGTTGCGAC  
TGCA

> 749

TTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCNATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCNNGAAG  
GTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC  
GATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCGACCAT  
GTAGCACGTGTGATGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCCACCTTCCCTCGGTTT  
GTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAAYGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGTTGCGCGGCTTA  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGCTCCCGA  
AGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT  
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGCTACT  
CCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACAT  
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGCTAGT  
ATCAGTCCAGGTGGTTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAA  
ATTCCACCACCTTACCATACTCTAGCTCGTCAATTTGAATGCAGTTCCAGGTTAAGCCCGGGGCTTT  
CACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTG  
TATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTATTCTGTGCGTAACGTCAAACCATCACGTAT  
TAGGTAATGGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGTCTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGG  
CTGGATCAGGCTTTGCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCT  
CAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAAGCCATTACCTCAC  
CAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGG  
ACGTATGCGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTC  
ACCCGTCCGCGCTCTCAAGAGGTGCAAGCACCTCTTACCGCTCGACTGCA

>750

AGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTG  
CCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGG  
GACCTTCGGGCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCA  
AGCGGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTA  
AGAAGGTCTTCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTAATACGTGATGGTTTTGA  
CGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGT  
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTTA  
ACCTGGGAACTGCATTCAAAACCTGACGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCACTGGACTGATACTGACACTGAG  
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGTCAACTAG  
CCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCAATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCG  
CAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATCGAAGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCA  
TTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGC  
GCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCG  
GTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC  
TGCAACTGACGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA

> 751

ATGGCTGATCAAAGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATG  
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGC  
GATTCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGACTCCGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTG  
CTCTCGGAGTGCCTTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG  
ATGACTTGACGTATCCCACTTCCCTCCGTTTTATCACCGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACG  
ACAGCCATGCAGCACCTGTCTACGGTTCGGAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCGAGTTCCGTGGATGT  
CAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG  
TCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACCGGTTAGCTCCGGAA  
GCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCACTTTCGTCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATT

CCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACGAGACTCAAGCCTGCC  
AGTTTCAAATGCAGTTCCAGGTTAAGCCGGGGATTTACATCTGACTTAACAGACCGCCTGCGTGCGC  
TTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGC  
CGGTGCTTTCTTTCTGCGGTAACGTC AATCGACGCGGATAACCACATCGCTCCTCCCGCTGAAGTACT  
TACAACCCGAAGCTCTCATACACGCGCATGGCTGCATCAGCTGCGCATGTGCATATCCCACTGCTGCTTC  
GTAGGATCTGACGGTTTCAGTTCCACTGGCTGGTCATCCTCGACAGCTAGGAATCGTCGCTAGGTGCTTA  
CTCCGCTACATGAGCTA

> 752a

AGGGATCGGATCATATTCGACGGCTCCCTCCACAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCAGGTGTTACCGACTTT  
CATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTA  
CTAGCGACTCCGACTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACCTGGGACCGGCTTTTTGGGATT  
GCTCCACCTTACGGTATTGCAGCCCTTTGTACCGGCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGG  
GCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTATCCCATGAGTTCCACCA  
TTACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG  
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCCAAAGAGTTGACCATTCTGCCCCGTTCTCGTATA  
TGTC AAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTCC  
CCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCG  
TCACGGAAACCGTGGAATGGTCCCCACAAC TAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTATCTA  
AGCCTGTTTGCTCCCCACCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGG  
TGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCT  
GCCCGTACCCACTGCAGGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGA  
GCTCTTTACGCCAATATTCAGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA  
GCCGCGCTTTTCTGCAGTACGTCACCTTTCGCTTCTCCCTGCTAAAGAGGTTTACACCGAAGCCGTCATCC  
CTCACGCGGCGTGCTGCATCAGCTTCCGCCATTGTGCATATCCCCACTGCTGCCTCCGTAGGATTCTGA  
CGGTCTCAGTCCAGTGTGGTCGGTCACTCTCAGCCGCTACCGTACGCTGCTGACATTACCTCACGACA  
GCTGATGACCGCGGTCCATTCCGAAG

> 752c

TCCTTGCGGTTAAGCTAACTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGAC  
CCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTG  
CAGACTGCGATCCGGACTACGACTGGTTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTTTGTA  
CCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCC  
TCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTGAATGTAGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCT  
CGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGTT  
CTCTTTGAGCACTAAGCCATCTCTGGCGAATTCGTTACATGTCAAAGGTGGGTAAGTTTTTTCGCGTTGC  
ATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGC  
CGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACAGTT  
GACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTTCGTGCATGAGCG  
TCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACA  
CGCGGAATTCATCCCCCTCTGCCGTA CTCCAGCGATGCAGTCACAGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCC  
GGGGATTTACAACGTCTTACATCACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTG  
CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTATTCTTACGGTACCGTCATTAGC  
CTTCTTTATTAGAAAAGACCGTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCAC  
GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG  
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGCTCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGAAGGCTTGGTGAGC  
CTTTACCTACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCATTCCGCGCAAGGTTTGGCATCCCCTGCTTT  
CATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAGCACAGCTTTCCGCTGCGTTATCCCCACGATTGGGCACGTTCCGA  
TGATTACTCACCCGTTCCGCACTCGCCGCCAGGATTGCTCCCGCGCTGCCGTTTCGACTTGCA