



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

“Análisis de la estructura de la comunidad microbiana epífita durante el desarrollo del fruto del manzano (*Malus domestica* Borkh) y su potencial como agente de biocontrol”

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias de los Alimentos**

Presenta

M. en C. Rocío Crystabel López González

Dirigido por

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Santiago de Querétaro, Qro Noviembre de 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Análisis de la estructura de la comunidad microbiana epífita durante el desarrollo del fruto del manzano (*Malus domestica* Borkh) y su potencial como agente de biocontrol”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta

M. en C. Rocío Crystabel López González

Dirigido por:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

SINODALES:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Presidente

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Vocal

Firma

Dra. Ma. Anaberta Cardador Martínez
Suplente

Firma

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Quéretaro, Qro., Noviembre 2021

DEDICATORIA

*A UN GRAN SER HUMANO E INVESTIGADOR QUE ME BRIDÓ SU APOYO
INCONDICIONAL DURANTE MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO
LE DEDICO ESTE TRABAJO
A EL DOCTOR RAMÓN ÁLVAR MARTÍNEZ PENICHE (+)*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo (CVU/Becario: 418285/262774) y a los fondos FOPER (2018-00189). Al programa del Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, por los recursos humanos y materiales para mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, por la dirección del trabajo y a la técnico M. en C. Yara Suhan Juárez Campusano por su apoyo en el laboratorio.

A la señora Lupita y el señor Rogelio (†), por recibirnos siempre con mucho entusiasmo en su huerto y permitirnos tomar las muestras que se procesaron en este proyecto. Fue un gusto conocerlos y convivir con ellos durante este proceso.

A la Dra. Sofía María Arvizu Medrano, por su apoyo, comprensión y asesoría a lo largo del trabajo, pero más en la etapa del cierre de este proyecto. También a la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga por formar parte de mi comité evaluador y por sus palabras de aliento que fueron de gran apoyo en cada semestre, pero más al cierre de este proyecto.

A la Dra. Ma. Anaberta Cardador Martínez, por recibirme en su laboratorio de Investigación del Departamento de Bioingenierías del Tecnológico de Monterrey y asesorarme durante la estancia en su laboratorio, al igual que a la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez por formar parte de mi comité evaluador, por sus comentarios y sugerencias que aportaron a la mejora de trabajo. Al Dr. Juan Campos, por las facilidades brindadas por su laboratorio para los análisis moleculares.

AL Dr. José Luis Rodríguez, por su apoyo en los análisis de los perfiles de lipopéptidos y sobre todo por su valiosa amistad.

A Alexandra, Juan Pablo y Lupita, por ser grandes compañeros, pero sobre todo por su amistad y momentos inolvidables en el laboratorio. También a mis amigos del posgrado Angélica y Eduardo, así como, a mis amigos a la distancia Adriana, Damaris, Fernando, Francisco, María, Xochitl, Rocío y Diana. Su amistad en los momentos complicados fue un gran apoyo para mí.

A mi familia y esposo Rogerio por darme su apoyo, comprensión y amor incondicional, el cual fue la fuerza para seguir y concluir este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Interacciones planta-microorganismos.....	3
2.1.1 Relaciones ecológicas de la microbiota y las plantas.....	3
2.1.2 Factores ecológicos que influyen en composición y estructura de la microbiota de las plantas.	6
2.1.3 Importancia de la microbiota asociada a las plantas en la biotecnología agrícola.	8
2.1.4 Técnicas para el estudio de los microorganismos asociados a plantas.	9
2.2 La microbiota en la filósfera.....	11
2.2.1 Estructura y composición de los microorganismos epífitos de la filósfera....	12
2.2.2 La microbiota asociada al fruto.....	13
2.2.3 Importancia de la microbiota de la filósfera como agentes de biocontrol	14
2.3 La microbiota del manzano	17
2.3.1 Taxonomía, anatomía y fisiología del manzano	17
2.3.2 Importancia económica del manzano.....	19
2.3.3 Estudio de la microbiota epífitas del manzano	20
HIPÓTESIS	23

OBJETIVOS.....	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Sitio de muestreo.....	25
3.2 Material biológico	25
3.2.1 Variedades de manzana.....	25
3.3 Determinación de la microbiota epífita cultivable y total	26
3.1.1 Obtención de las muestras.....	26
3.1.3 Determinación de la microbiota epífita mediante secuenciación de amplicones	30
3.1.4 Análisis estadísticos de la microbiota	32
3.4 Determinación de la actividad antagonista de bacterias epífitas.....	34
3.4.1 Activación de cepas.....	34
3.4.2 Ensayo antagonista <i>in vitro</i> de bacterias contra <i>Penicillium expansum</i>	34
3.4.3 Ensayo antagonista <i>in vivo</i> de bacterias contra <i>Penicillium expansum</i>	35
3.4.3 Caracterización de compuestos antifúngicos producidos por bacterias antagonistas	36
3.5 Determinación del perfil de compuestos presentes en los exudados del fruto.....	38
3.5.1 Obtención de exudados presentes en la superficie de los frutos	38
3.5.2 Análisis estadísticos y correlación del perfil de exudados con las poblaciones microbianas	40
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Composición y diversidad de la microbiota epífita asociada a la manzana.....	41
4.1.1 Comunidades microbianas obtenidas por cultivo	41
4.1.2 Comunidades microbianas obtenidas por secuenciación masiva.....	59
4.2 Capacidad antagonista de las poblaciones bacterianas epífita contra <i>P. expansum</i> ...	76
4.2.1 Actividad <i>in vitro</i> y en fruto del año 2017	76

4.2.2	Actividad <i>in vitro</i> y en fruto del año 2018	81
4.2.3	Actividad antagonista en fruto de consorcios bacterianos	85
4.2.4	Compuestos bacterianos relacionados con la actividad antagonista	86
4.3	Composición de los exudados del fruto y su relación con la microbiota epífita.....	89
4.3.1	Perfil de los exudados presentes en la superficie de los frutos	89
4.3.2	Correlación entre el perfil de exudados obtenidos en los frutos y la microbiota epífita.....	95
5	CONCLUSIONES.....	103
6	REFERENCIAS	106
7	ANEXOS	131

Dirección General de Bibliotecas UAO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Microorganismos con potencial antagonista contra patógenos poscosecha en frutos.	16
2	Densidad, diversidad y riqueza de la población bacteriana y fúngica durante el desarrollo del fruto en dos años consecutivos.	43
3	Identificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas aisladas de la superficie de 'Royal Gala' y 'Joya' en el año 2017.	45
4	Identificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas aisladas de la superficie de 'Royal Gala', 'Joya' y 'Golden Delicious' en el año 2018.	46
5	Promedio mensual de la temperatura y humedad del sitio de muestro en los meses de colecta (CONAGUA, estación climatológica Amealco 22001).	53
6	Diversidad bacteriana estimada basada en la secuenciación de amplicones en la etapa de fruto maduro de las dos variedades estudiadas.	60
7	Diversidad fúngica estimada basada en la secuenciación de amplicones en la etapa de fruto maduro de las dos variedades estudiadas.	72
8	Caracterización de la actividad antagonista contra <i>P. expansum</i> de los aislados bacterianos y características fisicoquímicas relacionadas con la actividad antifúngica.	79
9	Compuestos identificados en los exudados de los frutos entre las etapas de desarrollo en las variedades 'Joya' y 'Golden Delicious'.	94
A1	Curvas estándar para aminoácidos.	133
A2	Identificación taxonómica a nivel de género de los hongos en los dos años de muestreo.	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Microbiomas asociados a plantas.	4
2	Secuenciación por la plataforma Illumina.	11
3	Etapas fenológicas del fruto del manzano.	18
4	Sitio de muestreo para la colecta de los frutos en el municipio de Amealco.	25
5	Etapas del desarrollo del fruto de manzana colectadas.	27
6	Distribución y abundancia de las bacterias identificadas molecularmente en las variedades 'Joya' y 'Royal Gala' en el año 2017 en las cinco etapas del desarrollo del fruto.	48
7	Distribución y abundancia de las bacterias identificadas molecularmente en las variedades 'Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious' en el año 2018 en las tres etapas del desarrollo del fruto.	50
8	Agrupación de NMDS de bacterias del año 2017 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo.	51
9	Agrupación de NMDS de bacterias del año 2017 y 2018 asociadas al fruto de las variedades 'Joya' y 'Royal Gala'.	52
10	Distribución y abundancia de hongos y levaduras identificadas en las variedades 'Joya' y 'Royal Gala' en el año 2017 en las cinco etapas del desarrollo del fruto.	54
11	Distribución y abundancia de hongos y levaduras identificadas en las variedades 'Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious' en el año 2018 en las tres etapas del desarrollo del fruto.	56
12	Agrupación de NMDS de poblaciones fúngicas (hongos y levaduras) del año 2017 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo.	57

13	Agrupación de NMDS de poblaciones fúngicas (hongos y levaduras) del año 2018 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo.	58
14	Agrupación de NMDS de hongos del año 2017 y 2018 asociadas a la variedad 'Joya' y 'Royal Gala'; en las etapas de desarrollo.	59
15	Agrupación de NMDS de poblaciones bacterianas del año 2019 asociadas al fruto en las variedades estudiadas.	61
16	Distribución y abundancia taxonómica a nivel de familia de los grupos bacterianos asociados a la superficie de los frutos maduros de las variedades estudiadas en el año 2019.	63
17	Distribución y abundancia taxonómica a nivel de género de los grupos bacterianos asociados a la superficie de los frutos maduros de las variedades estudiadas en el año 2019.	64
18	Análisis de las vías relacionadas con metabolismo de carbohidratos predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades 'Joya' y 'Golden Delicious'.	67
19	Análisis de las vías relacionadas con metabolismo de aminoácidos predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades 'Joya' y 'Golden Delicious'.	68
20	Análisis de las vías relacionadas con metabolismo secundario predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades 'Joya' y 'Golden Delicious'.	69
21	Análisis de las vías relacionadas con metabolismo del procesamiento de información ambiental predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades 'Joya' y 'Golden Delicious'.	70
22	Distribución y abundancia taxonómica a nivel de familia de los grupos fúngicos asociados a la superficie de las replicas biológicas	

	(R) de los frutos maduros de manzana de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.	74
23	Distribución y abundancia taxonómica a nivel de género de los grupos fúngicos asociados a la superficie de las replicas biológicas (R) de los frutos maduros de manzana de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.	75
24	Ensayo <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas aisladas en el año 2017 con la mayor actividad antagonista contra <i>P. expansum</i> .	77
25	Ensayo antagonista en fruto de cepas bacterianas aisladas en el año 2017 con mayor actividad antagonista <i>in vitro</i> frente a <i>P. expansum</i> .	77
26	Agrupación de NMDS de las bacterias antagonistas aisladas en el año 2017 asociadas a la variedad ‘Royal Gala’ (a) y ‘Joya’ (b) en las diferentes etapas de desarrollo estudiadas en ese año.	78
27	Ensayo <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas aisladas en el año 2018 con la mayor actividad antagonista contra <i>P. expansum</i> .	82
28	Ensayo en fruto de antagonismo contra <i>P. expansum</i> , utilizando las cepas bacterianas aisladas en el año 2018 que exhibieron la mayor actividad antagonista.	83
29	Agrupación de NMDS de las bacterias antagonistas aisladas en el año 2018 asociadas en las diferentes etapas de desarrollo de los frutos de las variedades estudiadas.	84
30	Ensayo antagonista en fruto de los consorcios bacterianos por etapa de las cepas con actividad antagonista aisladas en el año 2017 con mayor actividad antagonista <i>in vitro</i> frente a <i>P. expansum</i> .	85
31	Ensayo antagonista en fruto de los consorcios bacterianos por etapa de las cepas con actividad antagonista aisladas en el año 2018 de la variedad ‘Golden Delicious’ con mayor actividad antagonista <i>in vitro</i> frente a <i>P. expansum</i> .	86

32	Espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) de la fracción biosurfactante producida por las bacterias epífitas antagonistas del año 2017.	88
33	Método de escala multidimensional no métrica (NMDS) del perfil de exudados de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.	90
34	Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de las familias bacterianas y la concentración de aminoácidos (a) y polifenoles (b) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas.	97
35	Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de los géneros bacterianos y la concentración de aminoácidos (a) y polifenoles (b) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas.	98
36	Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de las familias fungicas y la concentración de ácidos y azúcares (a), aminoácidos (b) y polifenoles (c) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas.	101
37	Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de los géneros fúngicos y la concentración de polifenoles en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas.	102
A1	Curvas estándar de azúcares, azúcares alcoholes y ácidos orgánicos.	132
A2	Curvas estándar para polifenoles.	134
A3	Curvas de rarefacción de las secuencias bacterianas en la etapa de fruto maduro de las muestras de las dos variedades estudiadas.	138
A4	Curvas de rarefacción de las secuencias fungicas en la etapa de fruto maduro de las muestras de las dos variedades estudiadas.	138
A5	Perfiles de la identificación mediante HPLC del ácido málico y manitol.	139

A6	Perfiles de la identificación mediante HPLC de aminoácidos mediante una derivatización con oftalaldehído (OPA) (a) y el cloruro de 9-fluoroenilmetil (FMOC) (b) en las dos variedades en las tres etapas estudiadas.	140
A7	Perfiles de la identificación mediante HPLC de los polifenoles en las dos variedades en las tres etapas estudiadas	142

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Dirección General de Bibliotecas UCR

RESUMEN

Los estudios de ecología microbiana en plantas, han demostrado que existe una comunidad compleja de microorganismos asociada naturalmente en la superficie de los frutos. Algunos de estos microorganismos tienen la capacidad de antagonizar fitopatógenos. El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición, dinámica, estructura y actividad antagonista de las poblaciones microbianas asociadas al fruto durante su desarrollo en tres variedades de manzano ‘Joya’, ‘Royal Gala’ y ‘Golden Delicious’. Se emplearon métodos dependientes de cultivo y secuenciación masiva de amplicones para conocer las poblaciones microbianas; HPLC para identificar los compuestos presentes en exudados del fruto y ensayos *in vitro* e *in vivo* para identificar y caracterizar cepas aisladas y seleccionadas por su actividad antagonista contra *Penicillium expansum*. Las poblaciones microbianas presentes a lo largo del desarrollo del fruto exhiben cambios en densidad, riqueza y diversidad ($p < 0.05$), siendo mayor en la etapa de amarre de fruto (2.025 logUFC, 1.967 H’, 0.333 riqueza por cm^2) y menor en los frutos maduros (0.086 logUFC, 0.032 H’, 0.006 riqueza por cm^2). *Bacillus* y *Aureobasidium* fueron los géneros dominantes en los dos años de muestreo en las tres variedades. La diversidad en las poblaciones de bacterias asociadas a la variedad ‘Joya’ fue mayor (1.7 H’) que las de la variedad ‘Golden Delicious’ (0.77 H’) en frutos maduros ($p < 0.05$), no siendo así para las poblaciones fúngicas. El análisis de PERMANOVA reveló que la concentración de los compuestos encontrados en los exudados dependían tanto de la variedad como de la etapa de desarrollo ($R^2=0.53$ y $R^2=0.17$, $P < 0.001$). Algunos compuestos muestran influencia sobre la composición de las poblaciones bacterianas (tirosina, prolina, el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico) y sobre las poblaciones fúngicas (ácido málico, el manitol, el glutamato, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido vanílico). Existen bacterias a lo largo del desarrollo del fruto capaces de inhibir el crecimiento de *P. expansum*. Las cepas con mayor actividad antagonista en fruto fueron *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M24 (66.9 % PRPF) y *Pantoea* sp. M18 (40.2% PRPF), encontradas en los frutos maduros y con capacidad de producción de sideróforos y lipopeptidos. En conclusión, se evidenció la dinámica de las poblaciones microbianas durante la maduración de manzanas, en donde el fruto provee compuestos que son utilizados por la microbiota y propiciar la proliferación de aquellos capaces de limitar el desarrollo de hongos patógenos de la manzana en etapa poscosecha.

Palabras claves: Epífitos del fruto, biodiversidad en manzana, actividad antagonista, *Bacillus*, *Pantoea* sp., *Penicillium expansum*.

ABSTRACT

Microbial ecology studies in plants has shown that there is a complex community of naturally associated microorganisms with the surface of fruits. Some of these microorganisms may have the ability to antagonize phytopathogens. The objective of this work was to determine the composition, dynamics, structure, and antagonistic activity of the microbial populations associated with the fruit during its development in three apple varieties 'Joya', 'Royal Gala' and 'Golden Delicious'. Culture-dependent methods and massive amplicon sequencing were used to determine the microbial populations; HPLC to identify the compounds present in fruit exudates and *in vitro* and *in vivo* tests of isolated and selected strains against *Penicillium expansum*. The microbial populations present throughout the development of the fruit have changes in density, richness, and diversity ($p < 0.05$). Being higher in the fruit set stage (2,025 log CFU, 1,967 H', 0.333 richness per cm^2) and lower in mature fruits (0.086 log CFU, 0.032 H', 0.006 richness per cm^2). *Bacillus* and *Aureobasidium* were the dominant genera for the two years of sampling in the three varieties. The diversity in the populations of bacteria associated with the variety 'Joya' was higher (1.7 H') than in the variety 'Golden Delicious' (0.77 H') in mature fruits ($p < 0.05$), not being the case for the fungal populations. The PERMANOVA analysis revealed that the concentration of the compounds found in the exudates depended on both the variety and the stage of development ($R^2 = 0.53$ and $R^2 = 0.17$, $P < 0.001$). Some compounds showed influence on the composition of the bacterial populations (tyrosine, proline, 4-hydroxybenzoic acid, and 3,4-dihydroxybenzoic acid) and on fungal populations (malic acid, mannitol, glutamate, 3,4-dihydroxybenzoic acid, and vanillic acid). There are bacteria throughout the development of the fruit capable of inhibiting the growth of *P. expansum*. The strains with the highest antagonist activity on fruit were *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M24 (66.9% PRPF) and *Pantoea* sp. M18 (40.2% PRPF), both isolated from mature fruit and with the production capacity of siderophores and lipopeptides. In conclusion, the dynamics of microbial populations during apple ripening was evidenced, where the fruit provides compounds that are used by the microbiota and promote the proliferation of those capable of limiting the development of pathogenic apple fungi in the post-harvest stage.

Key words: Fruit epiphytes, apple biodiversity, antagonistic activity, *Bacillus*, *Pantoea* sp., *Penicillium expansum*

1. INTRODUCCIÓN

Las tendencias actuales indican que la demanda de la producción agrícola aumentará en 70 % para el año 2050 (Altieri, 2004). Bajo este panorama la biotecnología agrícola tiene como objetivo el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles y de alto rendimiento para cubrir dicha demanda y reducir la dependencia de los fertilizantes químicos y los plaguicidas (Pereg y McMillan, 2015). Actualmente, se conoce que las plantas se encuentran, en su mayoría, colonizadas por microorganismos. Algunos microorganismos, han recibido una atención considerable, debido a su capacidad de conferir resistencia ante el estrés biótico (ej. patógenos) y abiótico (ej. sequía), lo cual genera beneficios en la productividad y calidad de los cultivos (Coleman-Derr y Tringe, 2014).

Los amplios estudios que se han realizado acerca de la microbiología de la rizósfera han permitido conocer la complejidad y regulación de las comunidades microbianas asociadas a la raíz de las plantas, en donde los exudados radiculares y la edad de la planta juegan un rol importante en la conformación de las comunidades (Wagner y col., 2016; Zeng y col., 2016; Munoz-Ucros y col., 2021). Además, estos estudios han sido la base para comprender la importancia de estos microorganismos en los sistemas agrícolas, tanto como promotores de crecimiento, como potenciales agentes de biocontrol contra enfermedades (Huo y col., 2018; Wang y col., 2018).

En años recientes han aumentado los estudios de las comunidades microbianas asociadas a los órganos aéreos de la planta (filósfera), principalmente la hoja, donde se ha visto que la dinámica de los microorganismos asociados está influenciada por factores como la etapa de cultivo (Copeland y col., 2015) o la estación del año (Williams y col., 2013). Sin embargo, la filósfera incluye otros órganos como las flores y frutos, los cuales también son de relevancia para el desarrollo de las plantas debido a su relación directa con la reproducción. Algunos trabajos realizados en frutos se han enfocado en la búsqueda de microorganismos epífitos (asociados a la superficie de las plantas) con capacidad antagonista

contra enfermedades causadas por hongos y así, poder utilizarlos como agentes de biocontrol en la etapa de poscosecha, en dónde se llega a perder hasta una tercera parte de la producción por este tipo de enfermedades (Romanazzi y col., 2016).

Uno de los frutos modelo para este tipo de estudio es el manzano, debido a que es uno de los frutales más consumidos y estudiados en el mundo (Toranzo, 2016). Al igual que en otros frutos, los estudios sobre la microbiología del fruto de manzana se han enfocado en su mayoría en la búsqueda específica de microorganismos con potencial de agentes de biocontrol en fruta madura (Calvo y col., 2007; Soto-Muñoz y Martínez-Peniche, 2009; Chen y col., 2016). Se desconoce cómo se modifican las poblaciones en las diferentes etapas de desarrollo del fruto y se pueden plantear varias preguntas al respecto: ¿Están presentes los antagonistas durante todo el desarrollo del fruto?, ¿quiénes están? y ¿cuál es su proporción?, ¿Cambian debido a algún compuesto fitoquímico presente en el fruto?. Las respuestas a estas interrogantes podrían dar la base para generar una comprensión entre las asociaciones del fruto con su microbiota en sistemas agrícolas y así proponer mejores estrategias amigables con el ambiente para el control de enfermedades que redunden en una mejora de la calidad y rendimiento del fruto.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo analizar la dinámica y estructura de la comunidad microbiana epífita durante el desarrollo del fruto en tres variedades de manzano ('Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious'), y su probable relación con la concentración de exudados del fruto los cuales incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles; adicionalmente, se determinó la capacidad antagonista *in vitro* e *in vivo* de poblaciones bacterianas seleccionadas contra *Penicillium expansum*, el principal patógeno poscosecha de la manzana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Interacciones planta-microorganismos

Las plantas proporcionan nichos donde pueden asociarse y proliferar una diversidad de microorganismos, los cuales incluyen principalmente bacterias, hongos y levaduras, a los cuales se le denomina microbiota (Müller y col., 2016). Esta microbiota puede jugar un rol muy importante dentro de la resistencia ante estrés biótico y abiótico a las que las plantas están expuestas constantemente (Meena y col., 2017; Trivedi y col., 2020). Al conjunto de estas poblaciones de microorganismos, junto con los macroorganismos y el ambiente que interactúa con las plantas se le denomina fitobioma (Parakhia y Golakiya, 2018). Una de las partes importantes para comenzar a entender al fitobioma es conocer la composición de la parte microbiana asociada a las plantas (Leach y col., 2017), estos estudios se ha abordado desde una perspectiva ecológica (Fitzpatrick y col., 2020), hasta el entendimiento de su posible función para aplicaciones biotecnológicas en los sistemas agrícolas (Arif y col., 2020).

2.1.1 Relaciones ecológicas de la microbiota y las plantas

La rizósfera y filósfera de las plantas coexisten en asociación con microorganismos a nivel de superficie, llamados epifitos y en la endosfera, llamados endófitos (Gopal y Gupta, 2016) (Figura 1). Éstos pueden presentar algún tipo de interacción específica con la planta, por ejemplo: a) Mutualista: una relación entre dos organismos que es mutuamente beneficiosa (ej. bacterias fijadoras de nitrógeno) (Shridhar, 2012); b) Parasitismo: una relación entre dos organismos en los que uno se beneficia y el otro es perjudicado, como es el caso de la mayoría de los fitopatógenos (Sista y Qin, 2018), y c) Simbiosis: relación biológica evolutiva muy estrecha entre dos o más individuos de diferentes especies en donde ambas partes se benefician, como la que describen Knief y col. (2014) para la interacción del hongo *Curvularia protuberata* que le permite la adaptación del pasto *Dichanthelium*

lanuginosum en altas temperaturas y en donde sin este hongo la planta es incapaz de desarrollarse.

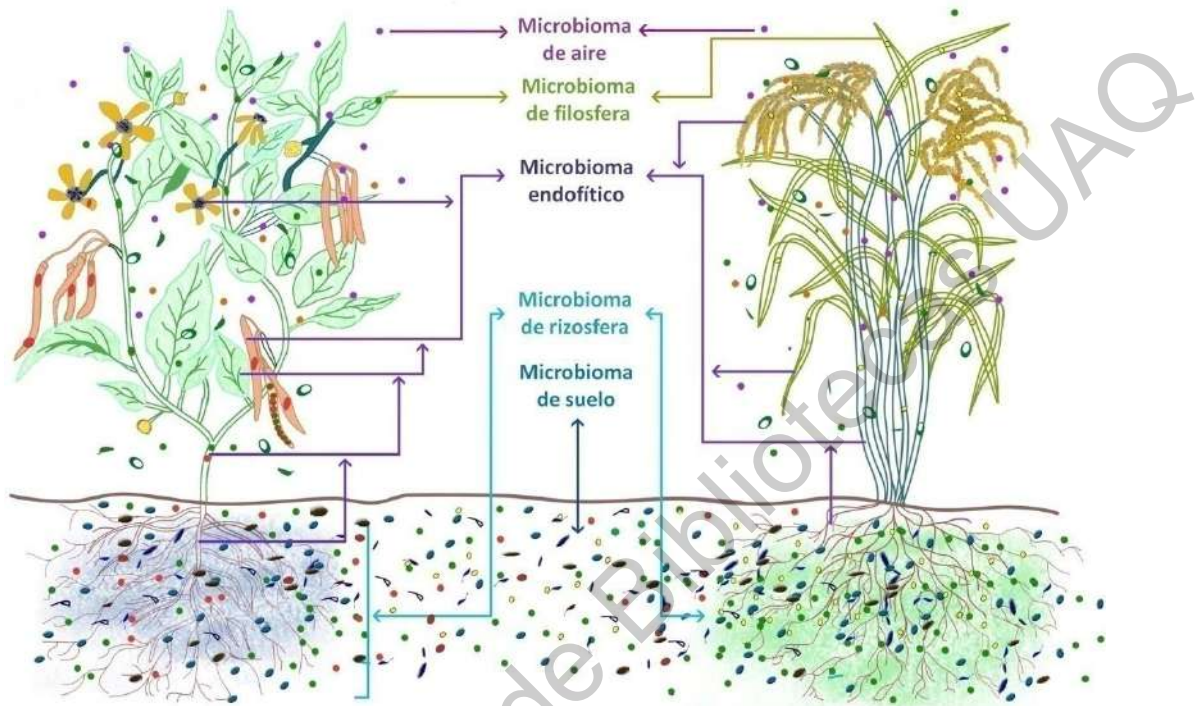


Figura 1. Microbiomas asociados a plantas. La rizósfera (raíces), la endosfera (dentro de la planta) y la filósfera (órganos aéreos) constituyen los principales compartimentos en los que residen las comunidades microbianas en la planta (Modificado de Gopal y Gupta, 2016).

A nivel ecológico dos de las relaciones de mayor interés de estudio son la mutualista y la simbiótica, debido a que este tipo de relaciones ayudan a mantener la adecuación de la planta (fitness), es decir su sobrevivencia y reproducción ante el estrés biótico y abiótico (Vandenkoornhuysen y col., 2015). El estrés biótico, es uno de los factores que más vulnera a las plantas y se refiere al generado por los organismos vivos que pueden afectar el desarrollo de las plantas. Dentro de los generadores de este tipo de estrés encontramos a los insectos herbívoros o fitófagos con diferentes estrategias de alimentación, incluyendo, pero no limitándose a, escarabajos de masticación de hojas, orugas, trips, ácaros y áfidos (Kant y col., 2015); además de los microorganismos patógenos que atacan a las plantas los cuales incluyen bacterias y hongos (Lamichhane y Venturi, 2015). Los mecanismos de defensa de las plantas

hacia este tipo de estrés, pueden ser desde morfológicos (tricomas, ceras) hasta defensas químicas (alcaloides, glucosinolatos, inhibidores de la proteasa), que a menudo son inducidos (Nguyeny col., 2016). Sin embargo, además de la defensa *per se* de la planta, se conocen ejemplos de microorganismos mutualistas que promueven la formación y acumulación de estas defensas químicas, tal es el caso del estudio realizado por Aziz y col. (2016), quienes expusieron plantas de *Arabidopsis thaliana* a la bacteria de rizósfera promotora de crecimiento *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) y observaron una acumulación de glucosinolatos en las plantas, lo cual tuvo como efecto, una mayor protección contra el herbívoro generalista *Spodoptera exigua* (gusano de la remolacha). Otro ejemplo, se muestra en el trabajo que realizaron Cosme y col. (2016), en el cual inocularon al hongo *Piriformospora indica* (que ha mostrado interacción mutualista con un amplio espectro de plantas) en raíces de plantas de arroz (*Oryza sativa*) y posteriormente inocularon larvas del insecto *Lissorhoptus oryzophilus* (la mayor plaga en raíz del arroz), observando una protección por parte del hongo hacia las raíces del arroz durante el ataque del insecto, además de un incremento en el número de brotes, tallos y raíces de las plantas inoculadas.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos fitopatógenos son también parte del estrés biótico al que las plantas están expuestas, pero al igual que con los insectos herbívoros, se han encontrado microorganismos que benefician a la planta a tolerar el daño que generan y combatirlos. Un ejemplo es el género de hongo *Trichoderma*, el cual ha sido encontrado con frecuencia asociado a la rizósfera de las plantas y en donde ha mostrado gran potencial antagonista contra fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Moniliophthora perniciososa* los cuales afectan diversos cultivos (Saxena y col., 2014; Mahmoud y col., 2015 y Galarza y col., 2015). También existen bacterias que pueden tener un efecto mutualista de defensa contra fitopatógenos, un ejemplo es la bacteria *Pantoea dispersa*, la cual fue aislada de la planta de papa dulce (*Ipomoea batatas* L.) y que mostró tener un efecto de inhibición en la planta ante el hongo *Ceratocystis fimbriata*, agente causal de la pudrición negra en la papa (Jiang y col., 2019).

Ante el estrés abiótico, el cual se define como el impacto negativo de los factores no vivos (altas y bajas temperaturas, metales, salinidad, luz, entre otros) sobre las plantas (Suzuki y col., 2014), también existen ejemplos de relaciones benéficas con la microbiota asociada a las plantas. Un ejemplo es el que describen Armada y col. (2014), donde encontraron que la cepa de *Bacillus thuringiensis* aislada de las raíces de lavanda (*Lavandula dentata*) confiere tolerancia a la sequía mediante el aumento de la concentración de potasio en la planta, disminuyendo la conductancia estomática y la acumulación de prolina en los brotes. Otro ejemplo, son los hongos endófitos *Peyronellaea glomerata*, *Phoma macrostoma* y *Alternaria tenuissima* aislados de las raíces de carrizo (*Phragmites australis*), los cuales le confieren la capacidad de crecer a altas concentraciones de zinc, mercurio y salinidad (Soares y col., 2016). Además, al inocularlos en plántulas de arroz bajo estrés por salinidad se observó un efecto de tolerancia y promoción del crecimiento, es decir esta capacidad positiva se puede trasladar a otras especies de cultivos.

En conjunto estos trabajos muestran que las relaciones mutualistas entre los microorganismos y las plantas son de importancia ecológica, ya que permiten el desarrollo exitoso de las plantas en ambientes con estrés biótico y abiótico, y lo cual termina beneficiando a ambas partes de la relación.

2.1.2 Factores ecológicos que influyen en composición y estructura de la microbiota de las plantas.

Los estudios de ecología microbiana han demostrado que el tipo de órgano, así como la especie o genotipo de la planta son factores capaces de influir en la estructura de las comunidades microbianas, tal es el ejemplo en plantas de *Agave* según lo reportado por Coleman-Derr y col. (2016). Este grupo encontró que el tipo de órgano es el principal factor que modula las poblaciones bacterianas presentes en la filósfera, mientras que en las poblaciones fúngicas lo más influyente es la especie de *Agave* (Coleman-Derr y col., 2016). Otro de los factores que se ha documentado es la edad de la planta, por ejemplo, en la planta Berro de Drummond (*Boechera stricta*) se observó que la edad de las raíces tuvo un efecto

en la diversidad de bacterias asociadas, siendo mayor en las raíces de plantas con más años de crecimiento (Wagner y col., 2016). Por otro lado, en las raíces de *Arabidopsis thaliana* se observó que al cambiar las poblaciones bacterianas durante el desarrollo de la planta, también cambiaban la expresión de ciertos genes en la rizósfera, encontrando que en la etapa de floración se aumentaban los genes relacionados con la síntesis de estreptomicina, en las poblaciones de actinobacterias presentes, lo cual se puede relacionar con la capacidad de defensa en esta etapa de desarrollo (Chaparro y col., 2014).

Otro factor relevante en el fenómeno tiene que ver con la presencia de moléculas sintetizadas por las plantas, por ejemplo, el ácido jasmónico (AJ) regula la colonización de la microbiota asociada a la parte foliar. En plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para AJ, se observó un aumento en la diversidad y riqueza de las poblaciones bacterianas (Kniskern y col., 2007). De igual manera Carvalhais y col. (2015) encontraron que plantas de *A. thaliana* mutantes que tenían incompleta la ruta de síntesis del AJ, mostraron cambios en el perfil de exudados de rizósfera y por consiguiente cambios en la composición de la comunidad bacteriana y archaea epifita asociada al órgano ($P < 0.05$); también observaron incremento en los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Lysinibacillus* ($P < 0.05$), los cuales se han ligado con funciones mutualistas como defensa en plantas. Otro grupo de compuestos que pueden ejercer cambios en el crecimiento y colonización de microorganismos son los exudados presentes en las plantas, los cuales, han sido ampliamente estudiados en la rizósfera. Los exudados de rizósfera están conformados por polisacáridos (ej. glucosa, fructosa), aminoácidos (arginina, asparagina, aspártico, cisteína) ácidos orgánicos (ácido acético, ascórbico, benzoico) y compuestos fenólicos (Rasmann y Turlings, 2016). La composición de estos exudados puede cambiar con la etapa de desarrollo de la planta, por ejemplo. Chaparro y col. (2013) encontraron que la mayor concentración de azúcares en los exudados de *A. thaliana*, se presentan en la primera etapa (plántula), en contraste con las concentraciones de los aminoácidos y polifenoles los cuales van aumentando durante el desarrollo. Posteriormente observaron que la comunidad bacteriana solamente fue diferente en la etapa de plántula ($P < 0.05$) y similar en la etapa vegetativa y de floración ($P < 0.05$). Lo que indica que los compuestos como azúcares, aminoácidos y polifenoles presentes en los

exudados de las raíces de las plantas juegan un papel importante en la conformación de las comunidades microbianas. A nivel de hojas y frutos, el estudio del papel que juegan los exudados de estos órganos ha sido muy poco estudiado; sin embargo, existen trabajos que demuestran que estos órganos son capaces de producir exudados compuestos por aminoácidos, compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos, los cuales pueden tener efecto en el establecimiento y colonización de ciertas bacterias, como por ejemplo *Salmonella enterica* (Han y Micallef, 2016).

2.1.3 Importancia de la microbiota asociada a las plantas en la biotecnología agrícola.

Uno de los objetivos de las investigaciones sobre el entendimiento de las relaciones positivas entre microorganismos asociados a las plantas, ha sido encontrar microorganismos que le confieran beneficios en la productividad de cultivos, para limitar el uso de agentes agroquímicos (Coleman-Derr y Tringe, 2014).

El estudio de la microbiota de la rizósfera ha dejado como resultado la comprensión y aplicación de microorganismos como biofertilizantes; un ejemplo son las bacterias fijadoras de nitrógeno, pertenecientes al género de *Rhizobium*, las cuales establecen una organización estructural benéfica con las raíces de las leguminosas. Esta organización estructural se conoce como nódulo, en el cual la planta proporciona a la bacteria un ambiente con nutrientes y bajos niveles de oxígeno, y la bacteria fija nitrógeno atmosférico (N₂) en forma de amoníaco, el cual puede ser utilizado como una fuente de nitrógeno por la planta (Zeng y col., 2016). Esta relación mutualista es ampliamente explotada como un mecanismo para aumentar la fertilidad del suelo en la agricultura (Shrestha y col., 2016). Otro ejemplo, son los hongos micorrízicos arbusculares, los cuales forman asociaciones simbióticas obligatorias con las raíces de más de 80% de las especies de plantas terrestres, donde juegan un papel vital en el crecimiento al mejorar la captación de nutrientes minerales como el fósforo (P), nitrógeno (N) y oligoelementos (Qiny col., 2015). La evaluación y uso de la colonización micorrízica arbuscular en cultivos económicamente importantes, se ha descrito

exhaustivamente, dejando como conclusión la importancia de esta simbiosis para el sector agrícola (Baum y col., 2015).

Por otro lado están los microorganismos que ayudan a limitar el daño causado fitopatógenos, los cuales en su mayoría se encuentran asociados a la parte externa de la planta y pueden utilizarse como agentes de biocontrol (Rastogi y col., 2013). La actividad antagónica de estos microorganismos puede deberse a la producción de compuestos antimicrobianos derivados del metabolismo secundario, la inducción de la resistencia sistémica dependiente de hormonas y por competencia de nutrientes (Francesco y col., 2016). Los agentes epifitos de biocontrol han sido ampliamente estudiados no solamente bajo condiciones de laboratorio sino también bajo condiciones de cultivo, lo cual ha culminado en la elaboración de productos comerciales. Las cepas más utilizadas para la elaboración de estos productos pertenecen a los géneros de bacterias *Bacillus*, *Pseudomonas* y el hongo *Trichoderma*, los cuales son utilizados a nivel de patógenos de rizósfera (Berg, 2009).

2.1.4 Técnicas para el estudio de los microorganismos asociados a plantas.

Una de las primeras necesidades para empezar a estudiar la microbiota asociada a las plantas, es determinar qué microorganismos están presentes y mediante índices ecológicos de diversidad determinar la estructura y los cambios de la comunidad microbiana asociada (Bulgarelli y col., 2013).

Una de las principales estrategias para el estudio de los microorganismos asociados a las plantas, está basada en los métodos dependientes de cultivo, en los cuales se aíslan en medios artificiales las diferentes cepas de bacterias, hongos y levaduras asociadas a los órganos de la planta y se identifican mediante perfiles bioquímicos y marcadores moleculares (Cordero-Bueso y col., 2017; Etmiani y Harighi, 2018; Albdaiwi y col., 2019). Una de las ventajas de estos métodos es que se cuenta con cepas aisladas y se puede evaluar sus características fenotípicas para ver la posible funcionalidad dentro de la microbiota de la planta; por ejemplo, su aplicación como agentes de biocontrol contra fitopatógenos (Chen y

col., 2018), biofertilizantes (Swain y col., 2018), y como agentes para conferir tolerancia a metales pesados (Ortiz-Ojeda y col., 2017), entre otros. Sin embargo, una de las grandes desventajas es que la diversidad de microorganismos que se pueden cultivar en el laboratorio no representa la diversidad total presente en la naturaleza, debido principalmente a que no es posible facilitar todas las condiciones de cultivo favorables (nutrientes, pH, temperatura y atmósfera) para el desarrollo de todos los microorganismos (Stewart, 2012; Wu y col., 2019).

Las limitantes de los métodos dependientes de cultivo para conocer completamente la microbiota asociada a las plantas, se puede minimizar con el uso de métodos basados en la secuenciación masiva de amplicones o metagenomas mediante diversas técnicas que resultan en la obtención masiva de datos de organismos cultivables y no cultivables; además, cada vez su costo y disponibilidad son más accesibles (Shendure y Ji, 2008). Una de las técnicas más utilizadas actualmente es la secuenciación mediante la plataforma de Illumina MiSeq, la cual se basa en la amplificación mediante PCR-Puente que genera grupos (*clusters*) que serán la platilla para la secuenciación por síntesis de terminadores reversibles, cada nucleótido que es incorporado durante la amplificación es excitado y su emisión de fluorescencia es detectada por el equipo (Jauk, 2019) (Figura 2). Al comparara esta tecnología con otras, es una de las que más útiles para determinar la diversidad microbiana mediante la amplificación de amplicones para bacterias (la región V4 del 16S rRNA) y hongos (la región del ITS3-ITS4 del ITS) (TaoBing y col., 2021; Fan y col., 2020), debido a su flexibilidad, secuencias más largas y tiempos rápidos de procesamiento (Wen y col., 2017). Otra ventaja de esta tecnología, es que existen programas de código abierto para el procesamiento de los datos, por ejemplo QIIME (“quantitative insights into microbial ecology”, por sus siglas en inglés) (Caporaso y col., 2010).

Actualmente se sugiere que la caracterización de la microbiota asociada a las plantas, se logra a través de una complementación entre los métodos dependientes de cultivo e independientes de cultivo; este enfoque permite obtener una visión global de la microbiota. Mediante las técnicas moleculares se puede determinar de manera más exacta la microbiota presente y por otro lado, mediante el cultivo de los aislados microbianos se pueden

determinar experimentalmente la posible función durante su interacción con la planta (Jackson y col., 2013; Schlaeppli y Bulgarelli, 2015; Anguita-Maeso y col., 2020).

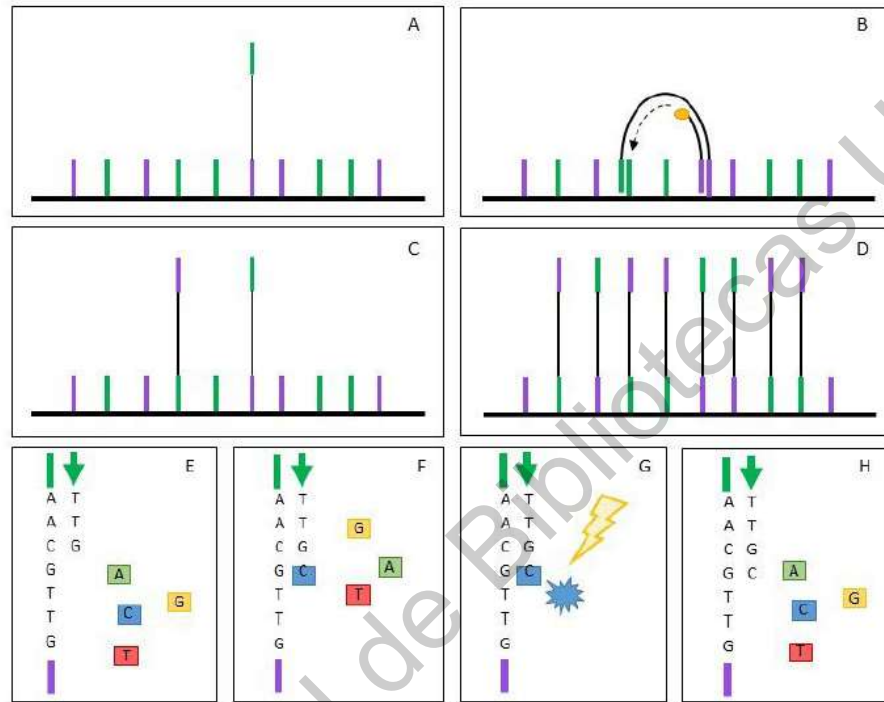


Figura 2. Secuenciación por la plataforma Illumina. A) Mediante una reacción de polimerización se genera una copia del inserto desde el oligonucleótido unido al soporte sólido, B) Reacción de polimerización, C) se obtiene una segunda hebra complementaria a la inicial, D) El proceso se repite hasta generar un grupo (cluster) a partir de la hebra primaria, E) Los nucleótidos marcados con fluorescencia (terminadores reversibles) compiten por elongar la cadena de ADN, F) El nucleótido complementario se une a la hebra molde, G) Una fuente lumínica excita el fluoróforo del nucleótido añadido y H) El ciclo vuelve a repetirse con un nuevo flujo para incorporar otro nucleótido a la cadena. (Modificado de Jauk, 2019).

2.2 La microbiota en la filósfera

La filósfera corresponde a la parte área de las plantas, las cuales albergan a cientos de especies de bacterias, levaduras y hongos, sin embargo, el conocimiento de la microbiota de

la filósfera ha sido menos estudiada en comparación con la rizosfera de las plantas (Lindow y Leveau, 2002; Vorholt, 2012). Los microorganismos que colonizan la parte externa de la filósfera se denominan epifitos, cuya definición biológica en base a su nicho es “microorganismos que se encuentra en la superficie de los órganos de la planta sin penetrar al interior durante su ciclo de vida” (Zambell y White 2014). Al igual que en la rizósfera la comunidad de epifitos en la filósfera pueden comprender microorganismos patógenos y benéficos para la planta (Sartori y col., 2015).

2.2.1 Estructura y composición de los microorganismos epífitos de la filósfera

En la filósfera, la hoja es el hábitat más estudiado. Esto se debe a que: i) se estima que el área foliar mundial es de 508.630.100 km², lo que corresponde a un área de 1.017.260.200 km² (tomando en cuenta el haz y envés de la hoja), lo cual es tres veces mayor al de la superficie terrestre, lo que la hace uno de los ambientes más grandes habitados por los microorganismos (Vorholt, 2012); ii) la mayoría de los microorganismos presentes son patógenos y amenazan la salud vegetal de muchos cultivos, por lo que han sido estudiados ampliamente desde un punto de vista fitopatológico (Vacher y col., 2016) y iii) los microorganismos presentes están expuestos a fluctuaciones agudas de humedad, temperatura, irradiación de luz UV y nutrientes limitados (ambiente oligotrófico), las cuales han sido características de interés para el estudio de las capacidades de adaptación de los microorganismos (Bulgarelli y col., 2013). Dentro de un marco evolutivo las comunidades microbianas de la filósfera están regidos por cuatro procesos ecoevolutivos representados: dispersión, adecuación, selección y la deriva. La dispersión y la adecuación dan forma a la diversidad funcional de los microorganismos que llegan a las hojas de las plantas. La selección externa favorece a aquellas que están más adaptadas a las condiciones locales (es decir, morfología y metabolismo de las hojas y microclima). La selección interna a través de interacciones bióticas como la competencia o el parasitismo regula aún más la estructura de la comunidad microbiana. La deriva provoca cambios estocásticos en la estructura de la comunidad. La estructura de la comunidad microbiana resulta así de la influencia de la planta,

de la atmósfera y de la propia comunidad, y a su vez estas comunidades pueden influir en el desarrollo de la planta (Vacher y col., 2016).

2.2.2 La microbiota asociada al fruto

Como se describió anteriormente, la hoja ha sido uno de los órganos más estudiados de la filósfera, sin embargo, los frutos son otros órganos de importancia para la planta, los cuales, han sido menos estudiados, pero que muestran una dinámica interesante en la planta. En un análisis realizado por Ottesen y col. (2013) de la microbiota epífita general de todas los órganos de la planta de tomate (hojas, tallos, raíces, flores y frutos), se evidenció que existen géneros bacterianos como *Microvirga*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Brachybacterium*, *Rhizobiales*, *Paracoccus*, *Chryseomonas* y *Microbacterium* que se comparten solamente entre flores y frutos maduros. Esto podría indicar que ciertas especies microbianas pueden permanecer desde la etapa floral hasta la maduración del fruto. En otro trabajo, Leff y Fierer (2013) señalan que las comunidades epífitas varían dependiendo del tipo de fruto. Estos autores encontraron que las poblaciones bacterianas a nivel de riqueza taxonómica difieren entre los frutos en estudio, siendo más parecidas entre tomates, chile y fresas y dejando con poblaciones muy específicas (únicas) en las manzanas, duraznos y uvas. Además, en este mismo estudio, encontraron que dependiendo del tipo de manejo agronómico (convencional y orgánico) las poblaciones de bacterias cambiaban, encontrando que fue mayor en el manejo agronómico del tipo orgánico, lo cual se podría explicar por la carencia de bactericidas en este tipo de manejo.

Por otro lado, Korsten (1996) demostró que en la microbiota del fruto de aguacate se puede encontrar en etapas fenológicas tempranas al principal patógeno de poscosecha *Colletotrichum gloeosporioides*, al igual que al hongo *Trichoderma*, el cual es ampliamente utilizado como agente de biocontrol. Estos resultados indican que, es posible encontrar en el fruto a los patógenos de poscosecha y a sus posibles antagonistas naturales.

A pesar de que los estudios de la microbiota epífita son extensos y diversos, aún se desconocen algunos fenómenos asociados, como si existe una posible regulación por parte de moléculas endógenas del fruto en el establecimiento, composición y estructura de la comunidad microbiana (Baltrus, 2017). Algunas moléculas candidatas para el estudio en fruto son aquellas que han sido vinculadas en otros órganos de la planta, como los exudados de las raíces, que contienen azúcares, aminoácidos y polifenoles que pueden ejercer un efecto en la composición de las poblaciones microbianas (Chaparro y col., 2013 y 2014). Si bien, no existen estudios respecto a la relación de la composición de éstos y la comunidad microbiana total presente, si se han desarrollado trabajos que tratan de entender la relación entre los exudados de frutos y la colonización por microorganismos patógenos puntuales. Por ejemplo, Padgett y Morrison (1990) encontraron que los exudados en el fruto de la vid van cambiando durante la maduración del fruto encontrando la menor concentración de glucosa en las etapas más tempranas del fruto (tres semanas después de antesis) con incremento paulatino para alcanzar los niveles más altos en la etapa de fruto maduro. Además, comprobaron que los exudados presentes en las últimas etapas promovieron el crecimiento micelial del hongo patógeno *Botrytis cinerea*. De igual manera Wijesekara y col. (2011), analizaron el efecto de los exudados obtenidos de frutos de ugressa en diferentes etapas del desarrollo (etapa inmadura, madura y poscosecha). Encontraron diferencias significativas en la germinación de las esporas y formación de apresorio del hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, obteniendo el mayor porcentaje para ambos en la etapa de fruto maduro en poscosecha.

2.2.3 Importancia de la microbiota de la filósfera como agentes de biocontrol

Los diversos estudios realizados sugieren que las comunidades epífitas en la filósfera son de importancia agrobiotecnológica debido a que en su mayoría, juegan un rol en la protección de la planta ante los fitopatógenos (Rastogi y col., 2013). Los microorganismos con esta actividad antagónica pueden utilizarse como agentes de biocontrol (Francesco y col., 2016). En la filósfera, los agentes de biocontrol se han encontrado en diferentes órganos

aéreos (hojas, flores y fruto). En hojas del maíz (*Zea mays*), Sartori y col. (2015) encontraron que tres cepas del género *Bacillus* disminuyen el crecimiento del patógeno *Exserohilum turcicum*, causante de la mancha foliar. Un estudio en flores de manzano (*Malus domestica*) y peral (*Pyrus communis*) encontraron que cuando la bacteria epífita *Pseudomonas fluorescens* coloniza a la flor desde una etapa temprana, no permite el establecimiento del patógeno *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano. De este agente de biocontrol se desarrolló el producto comercial Blightban A506® (Mercier y Lindow, 2001). Es en el fruto donde más ejemplos existen sobre el amplio espectro de microorganismos epífitos probados como agentes de biocontrol, cuya aplicación se ha dirigido principalmente a frutos en poscosecha. Esta etapa es de interés, debido a que con base en los reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) se estima que una tercera parte de los alimentos producidos mundialmente para consumo humano se pierde en esta etapa (Romanazzi y col., 2016). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de microorganismos epífitos con capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos del fruto. Esto sugiere que los microorganismos antagonistas tienen un gran potencial agroindustrial.

Actualmente, aunado a estos esfuerzos de caracterización de agentes de biocontrol, se plantea la necesidad de la identificación y cuantificación de la comunidad epífita general, puesto que esta información puede facilitar la comprensión de las interacciones complejas que tienen lugar entre el fruto y los microorganismos residentes y con ello mejorar el desempeño de los posibles controladores biológicos tal y como se hace actualmente en hojas (Wisniewski y col., 2016).

Tabla 1. Microorganismos con potencial antagonista contra patógenos poscosecha en frutos.

Fruto	Enfermedad	Antagonista(s)
Mango	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Brevundimonas diminuta</i> (Leifson & Hugh) Segers <i>Candida membranifaciens</i> Hansen <i>Trichoderma</i> spp.
	Podredumbres en frutos (<i>Lasiobasidium theobromae</i> y <i>Rhizopus</i> spp.)	<i>Acremonium brevae</i> (Sukapure & Thirumulachar) Gams. <i>Candida sake</i> (CPA-1). <i>Cryptococcus albidus</i> (Saito) Skinner. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rahuella aquatilis</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida oleophila</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Cryptococcus</i> spp.
	Moho gris (<i>Botrytis cinerea</i>)	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Rahuella aquatilis</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>
Manzana	Pudrición por <i>Penicillium</i> (<i>Penicillium expansum</i>)	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Rahuella aquatilis</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>
	Podredumbre amarga (<i>Glomerella cingulata</i>)	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Uva	Podredumbre por <i>Mucor</i> (<i>Mucor piriformis</i>)	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Trichoderma harzianum</i>
	Pudrición por <i>Botrytis</i> (<i>Botrytis cinerea</i>)	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Metschnikowia fructicola</i>
	Pudrición blanda (<i>Monilinia laxa</i>)	

Modificado de Sharma y col., 2009

2.3 La microbiota del manzano

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es un cultivo que ha despertado el interés de diversos grupos de investigación ya que junto con los cítricos, uvas y frutales de carozo son los más conocidos y consumidos en el mundo (Toranzo, 2016).

2.3.1 Taxonomía, anatomía y fisiología del manzano

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es uno de los cultivos frutales más importantes de las regiones más frías y templadas del mundo. El género *Malus* pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Maloideae* y comprende unas 55 especies (Harris y col., 2002). Es un árbol perenne con una vida aproximada de unos 60 a 80 años, cuyos requerimientos son: fotoperiodo de día neutro (10-14 horas de luz), altitud de 1300-2200 msnm y precipitación anual de 473mm. El árbol tiene el tronco derecho, alcanzando normalmente de 2 a 2,5 m. de altura, la corteza es lisa, de color ceniciento verdoso sobre los ramos y escamosa y gris pardo sobre las partes viejas del árbol (Flores y col., 2014). Los primeros 5 a 12 años de la planta corresponde a la fase juvenil, en la cual el manzano aún no tiene capacidad para florecer. Posterior a este tiempo comienza la fase adulta, donde se producen brotes florales que darán la formación de fruto y así comenzar un ciclo de crecimiento reproductivo (Yamagishi y col., 2014) (Figura 3). A la par las partes vegetativas producen brotes vegetativos para continuar con el ciclo de crecimiento vegetativo. Aproximadamente el 95% de los meristemas vegetativos en los brotes se destinan hacia desarrollo floral, los cuales, se convierten en meristemas de inflorescencia y luego se desarrollan en meristemas en antesis (Mimida y col., 2009). Dentro del ciclo reproductivo, la etapa de madurez del fruto es uno de los más importantes, debido a que es en ésta cuando el árbol está listo para la cosecha de la fruta (manzana) y a su vez es una de las etapas en donde se debe tener mayor protección contra los patógenos (DeGrand-Hoffman y Perry, 1984).

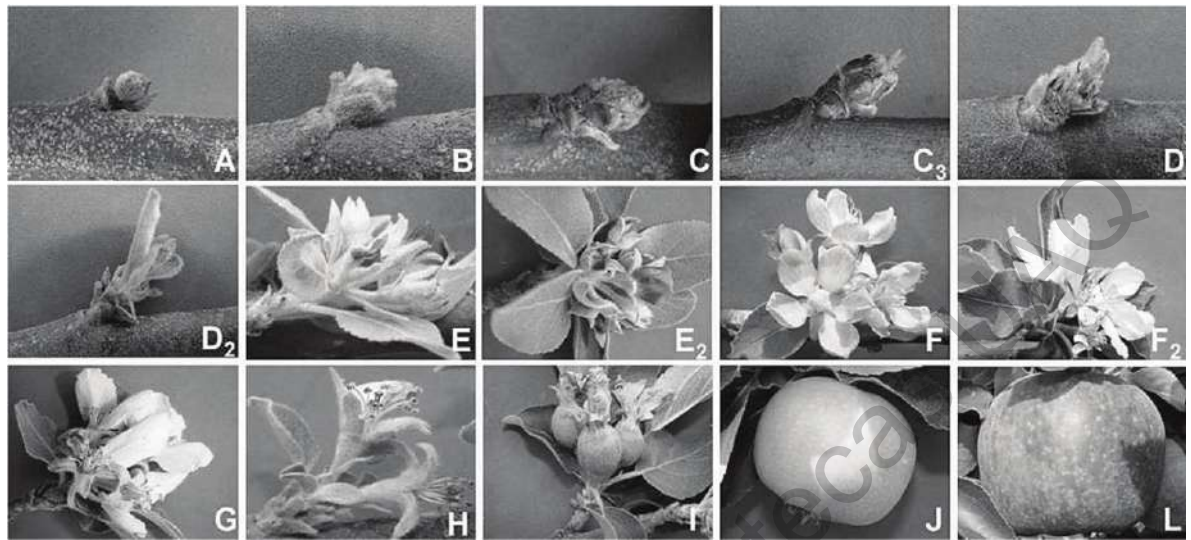


Figura 3. Etapas fenológicas del fruto del manzano. A: brotes latentes; B: comienzo de la hinchazón; C: puntas verdes; C3: media pulgada de color verde; D: media pulgada de hojas verdes; D2: hojas verdes de media pulgada, E: botón verde, E: botón rosa, F: inicio de la floración; F2: floración completa; G: fin de la floración; H: caída de pétalos, I: amarre de los frutos; J: fruta verde y L: fruta madura. (Imagen tomada de Lopes y col., 2013)

2.3.1.1 Variedades de estudio

‘Royal Gala’

Esta variedad es proveniente de Nueva Zelanda y de origen probable de ‘Kidd's Orange’ x ‘Golden Delicious’. El árbol tiene un vigor elevado, similar al de ‘Golden Delicious’ una maduración tardía y es susceptible a *Venturia inaequalis*, *Podosphaera leucotricha* y a *Erwinia amylovora*. Tiene frutos de pequeño a mediano, de color rojo con rayas amarillo dorado. Su sabor es muy dulce y con una textura firme, crujiente y jugosa. La vida de almacenamiento es de tres a siete meses dependiente de la tecnología utilizada (Brown, 1993).

‘Joya’

Esta variedad es de procedencia desconocida y su origen posible es de ‘Anna’ x ‘Gala’. El árbol tiene un vigor elevado y de maduración temprana. Ha mostrado tolerancia a

Podosphaera leucotricha. Sus frutos son de tamaño pequeño a mediano de color rojo estriado. Su sabor es dulce con textura crujiente y jugosa (Martínez, 2014).

‘Golden Delicious’

Esta variedad es proveniente de Estados Unidos de América, es origen de ‘Golden Reineta’ x ‘Grimes Golden’ y es uno de las variedades más conocidas y consumidas en el mundo. El árbol tiene un vigor bajo y es de maduración tardía. Ha mostrado ser sensible a *Podosphaera leucotricha* y *Venturia inaequalis* y en etapa poscosecha a la pudrición por *P. expansum*. Los frutos son medianos a grandes, de color amarillo-verde a amarillo-dorado con lenticelas bien marcadas. Su sabor es dulce y con una textura firme y jugosa (Iglesias y col., 2001; Sun y col., 2017).

2.3.2 Importancia económica del manzano

La producción de manzana en México en el año 2019 fue de 677,000 toneladas, con un promedio en los últimos 10 años de 677 mil toneladas anuales (SIAP, 2021). Siendo el periodo de mayor producción de agosto a octubre, representando 0.68% del PIB agrícola nacional y siendo la variedad ‘Golden Delicious’ la más cultivada con 409,579 toneladas (SIAP, 2019). La superficie destinada para su cultivo es de 57 mil hectáreas, principalmente en el norte del país. Chihuahua es el mayor productor de manzana del país, produciendo en el 2020 un total de 624,696 toneladas, seguido por Coahuila, Puebla y Durango (SIAP, 2020).

El estado de Querétaro ocupa el lugar número 11 en la producción de manzana con una aportación a nivel nacional aproximada de 1, 579 toneladas (FND, 2014). El manzano en Querétaro es una de las especies más ampliamente distribuidas en las sierras frías y húmedas de Pinal de Amoles, San Joaquín, Cadereyta, Humilpan y Amealco, donde se observan árboles muy antiguos y vigorosos, confirmando su adaptación a las condiciones de clima y suelo de la región. Actualmente existen alrededor de 40 variedades de manzana en la región productora del estado (Martínez y col., 2014). En donde están incorporadas antiguas

variedades europeas como 'Gravenstein', y de Estados Unidos como 'Golden Delicious', 'Red Delicious' y 'Rome Beauty' (Fernández y col., 2010).

2.3.3 Estudio de la microbiota epífita del manzano

Al igual que en otros frutos, el estudio de la comunidad epífita en los órganos de la filósfera del manzano se ha enfocado en la búsqueda de microorganismos antagonistas de patógenos, centrándose en los microorganismos asociados a los frutos maduros. Chen y col. (2016), encontraron en frutos de la variedad del manzano 'Fuji' a la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, la cual mostró tener actividad antagonista *in vitro* e *in vivo* contra *Botryosphaeria dothidea* agente causal de la podredumbre blanca en manzana. Asimismo, se ha caracterizado la actividad antagónica de la bacteria *Rahnella aquatilis*, la cual puede ser utilizada para el biocontrol de los principales patógenos poscosecha de la manzana, *P. expansum* y *Botrytis cinérea*, causantes de la pudrición azul y gris respectivamente (Calvo y col., 2007).

Aunado a los esfuerzos de la caracterización de los agentes de biocontrol, se plantea la necesidad de identificar y cuantificar la comunidad epífita total, para comprender mejor las interacciones microbianas que tienen lugar en el fruto y con ello mejorar el desempeño de estos agentes de biocontrol (Droby y Wisniewski, 2018). Hasta el momento, existen pocos trabajos que abarquen de manera global el análisis de las poblaciones microbianas asociada a la superficie de la manzana. Algunos de estos se han centrado en el estudio de las poblaciones fúngicas (hongos y levaduras), debido a que dentro de este grupo se encuentran principalmente los fitopatógenos más importantes de la manzana. Abdelfattah y col. (2016), analizaron mediante técnicas moleculares la población de hongos asociados al epicarpio (exterior) y mesocarpio (interior) del fruto maduro en la variedad de manzano 'Red Delicious', cultivado bajo un sistema de producción convencional y orgánico. Los resultados que encontraron muestran que los cambios en las poblaciones de hongos dependen de la parte del fruto que se analice, encontrando que el género *Penicillium* fue más abundante en la parte externa del fruto que en la interna. Por otro lado, observaron que la levadura *Cryptococcus*, género al que pertenecen diversas especies que se utilizan actualmente como agentes de

biocontrol, fue la más abundante en la parte externa del fruto en ambos sistemas de cultivo, sugiriendo que esta levadura tiene una alta tolerancia a los tratamientos químicos utilizados en el cultivo convencional, y lo cual aporta información relevante para las estrategias de control integrado de plagas en este cultivo. Siguiendo con el estudio de las poblaciones fúngicas, Shen y col. (2018) analizaron los cambios asociados al sitio de producción, en huertos rurales y periurbano, manzanas en la etapa poscosecha de la variedad 'Fuji'. Los datos encontrados, muestran una mayor diversidad fúngica en los huertos rurales que en los periurbanos. Además, se observó que los géneros vinculados con bioprotección como *Coniothyrium*, *Paraphaeosphaeria* y *Periconia* estaban enriquecidos en los huertos rurales y por el contrario en los huertos periurbanos estaban enriquecidos los géneros patogénicos como *Acremonium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

También se han estudiado los cambios en la etapa poscosecha debido a las condiciones de almacenamiento de las manzanas se ha estudiado. Bösch y col. 2021, encontraron que las poblaciones de bacterias eran mayores en las manzanas almacenadas en atmósferas controladas en comparación a las recién cosechadas, no encontrando cambios en las poblaciones fúngicas. Además se ha encontrado en manzanas de la variedad 'Enterprise', que las poblaciones bacterianas y fúngicas son diferente dependiente de la parte del fruto, para las bacterias la mayor diversidad se encontró en la zona del pedúnculo, seguida por el epicarpio (piel) y el cáliz; y para los hongos la mayor diversidad se encontró en cáliz, seguida por el pedúnculo y finalmente el epicarpio (Abdelfattah y col., 2020).

Por otro lado, se ha estudiado a la microbiota de la manzana para determinar si es una fuente de patógenos al humano. Wassermann y col. (2019) estudiaron las poblaciones bacterianas asociadas a diferentes partes del fruto de la variedad de manzano 'Arlet', cultivada en un sistema convencional y orgánico. Se encontró que la parte externa del fruto fue la menos colonizada en comparación con la parte interna. Además, observaron que el orden *Enterobacteriales*, uno de los relacionados con diversos patógenos de humanos, fue más abundante en el cultivo convencional. Además, en un estudio realizado por Gonzalez-López (2012), encontraron que las manzanas cultivadas en la sierra gorda de Querétaro

pueden estar colonizadas por *Salmonella* spp., teniendo una incidencia en 3 manzanas de 40 muestreadas, además de demostrar que este tipo de bacteria es capaz de formar biopelículas en la superficie de la manzana.

En conjunto estos resultados, muestra lo dinámica que pueden ser las poblaciones de microorganismos epifitos asociados al fruto de la manzana.

Dirección General de Bibliotecas UAO

HIPÓTESIS

La composición, dinámica y estructura de la comunidad microbiana epifita asociadas al fruto de la manzana (*Malus domestica* Borkh), la cual incluye a las poblaciones bacterianas con capacidad antagonista, está influenciada por la etapa de desarrollo y los exudados del fruto presentes en la superficie de cada variedad de manzano.

OBJETIVOS

General

Analizar la composición, dinámica y estructura de la comunidad epifita (bacterias, hongos y levaduras) durante el desarrollo del fruto en tres variedades de manzano ('Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious') y su probable relación con la concentración de ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y polifenoles presentes en los exudados del fruto; así como con la capacidad antagonista de las poblaciones bacterianas contra *P. expansum*.

Objetivos específicos

1. Determinar mediante métodos dependientes e independientes de cultivo la diversidad de la microbiota epifita durante el desarrollo de los frutos de las variedades de manzano 'Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious' en dos años de cultivo.
2. Evaluar la capacidad antagonista *in vitro* e *in vivo* de cepas bacterianas obtenidas durante dos años de muestreo contra el patógeno *P. expansum*.
3. Determinar los posibles mecanismos de acción de las cepas bacterianas con capacidad antagonista.
4. Obtener los exudados de los frutos y cuantificar las concentraciones de ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y polifenoles.
5. Analizar y correlacionar los datos de la microbiota epifita y el perfil de exudados obtenidos en los frutos de las variedades en estudio.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de muestreo

El material biológico fue colectado en la huerta experimental ubicada en el municipio de Amealco (20°09'LN, 100°07'LO y 2279 msnm), Querétaro (Google Earth, 2020, Figura 4). En la región de colecta se registra una temperatura promedio máxima de 23°C y mínima de 8 °C durante la época templada (Abril-Junio), mientras que durante la temporada fría (Diciembre-Febrero) se presentan temperaturas promedio máximas de 19°C y mínimas de 1°C. La precipitación promedio en temporada de lluvias fue de 110 mm y en temporada de sieca presenta una acumulación promedio de 2 mm (CONAGUA, estación Amealco 22001, año). Los experimentos se desarrollaron en los laboratorios de: “Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola” y “Fermentaciones y Fisiología de frutos” de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como en el “Laboratorio de Investigación del Departamento de Bioingenierías” del Tecnológico de Monterrey, Campus Querétaro.

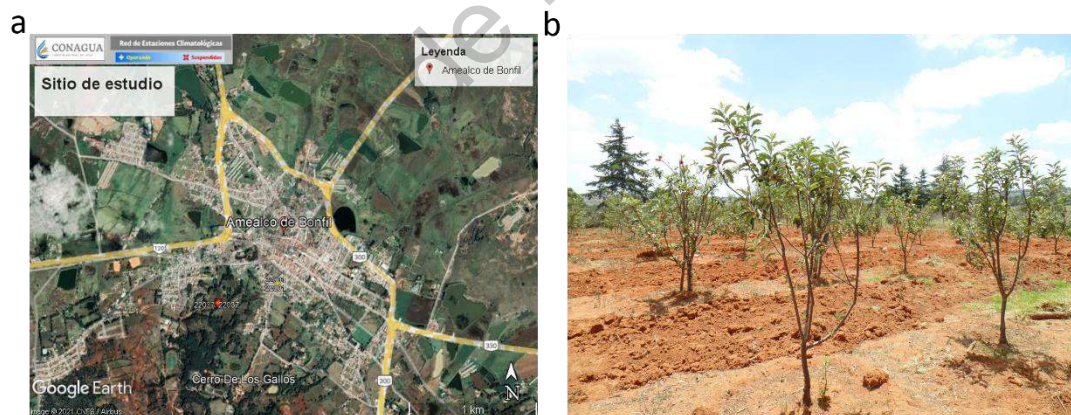


Figura 4. Sitio de muestreo para la colecta de los frutos en el municipio de Amealco (a) y la huerta experimental con las diferentes variedades seleccionadas (b).

3.2 Material biológico

3.2.1 Variedades de manzana

- Durante el ciclo de cultivo de Febrero a Agosto del año 2017, se trabajó con las variedades rojas ‘Joya’ y ‘Royal Gala’.

- Durante el ciclo de cultivo de Febrero a Agosto del año 2018, se trabajó con las variedades rojas ‘Joya’ y ‘Royal Gala’ y la variedad amarilla ‘Golden Delicious’.
- Durante el ciclo de cultivo de Febrero a Agosto del año 2019, se trabajó con las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.

3.3 Determinación de la microbiota epífita cultivable y total

3.1.1 Obtención de las muestras

Se seleccionaron tres árboles de cada variedad (distantes entre ellos aproximadamente 3 metros), y cinco etapas de desarrollo amarre del fruto, tres etapas de fruta verde (1-3) y fruta madura (Figura 5a), para la obtención de la microbiota epífita cultivable durante el ciclo de cultivo del 2017, se colectó un fruto representativo de cada etapa por árbol. En el ciclo de cultivo del 2018 se considerando solo las etapas de amarre del fruto, una etapa de fruta verde 3 y fruta madura (Figuras 5b y 5c). Además, se aumentó el número de frutos por etapa, colectando tres frutos por etapa y árbol. En el ciclo del año 2019, se seleccionaron 18 frutos por árbol de las tres etapas consideradas en el 2018. Las muestras se colectaron de forma axénica, se conservaron en frío y se transportaron al laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola de la UAQ para su procesamiento (<48 h).

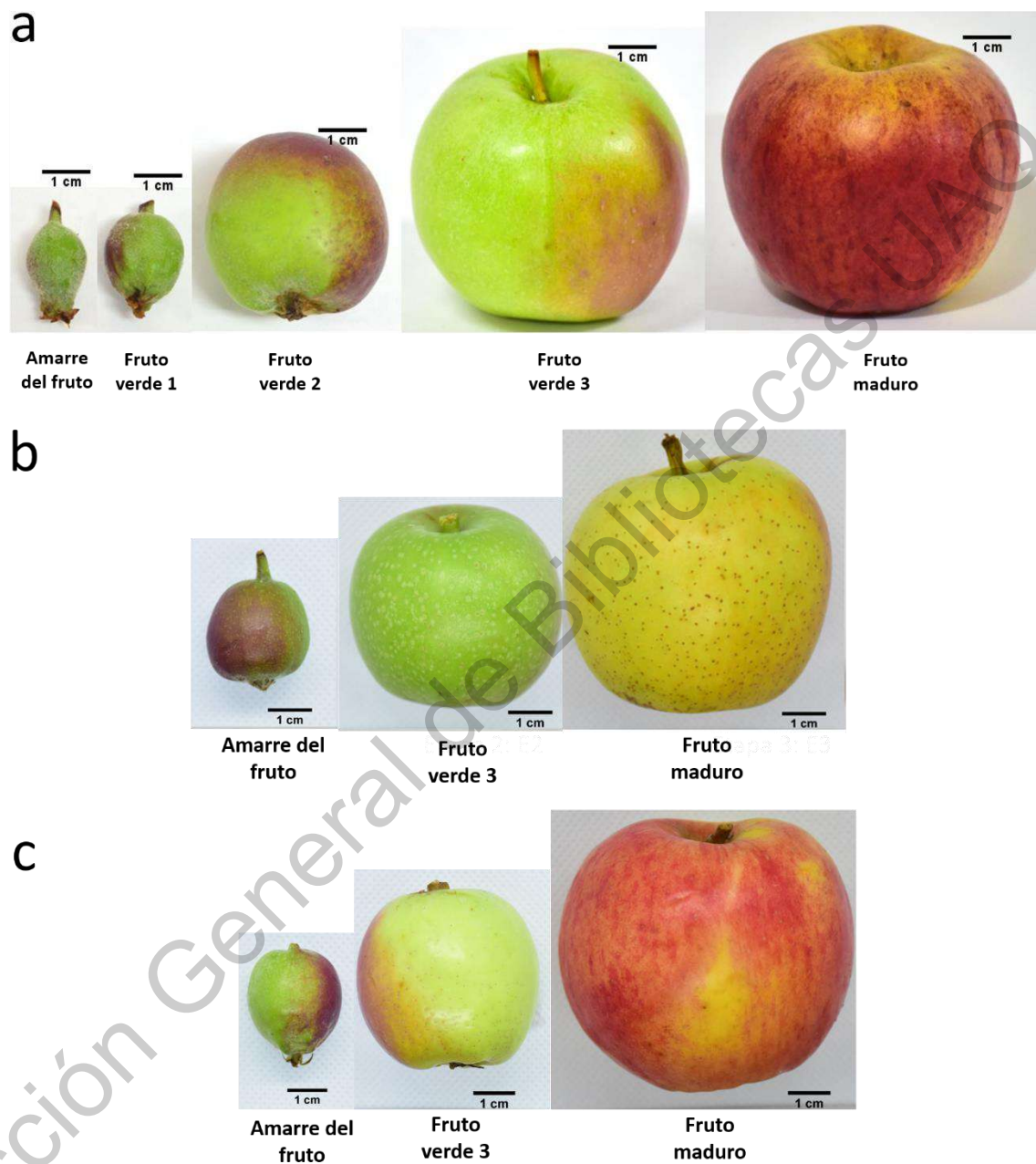


Figura 5. Etapas del desarrollo del fruto de manzana colectadas. Año 2017 (a, ejemplo ‘Royal Gala’) y en los años 2018 y 2019 (b, ejemplo ‘Golden Delicious’ y c, ejemplo ‘Joya’) durante el muestreo.

Los microorganismos epifitos se obtuvieron mediante un protocolo basado en las metodologías reportadas por Burch y col. (2016) y Desgarenes y col. (2014). Los frutos se colocaron en una bolsa estéril con cierre hermético y se adicionaron 30 mL de solución amortiguadora de lavado (Anexo I); posteriormente se sonicaron (Branson 5510, 135 W, 42 KHz) durante 5 min y se agitaron por 10 min a 200 rpm. La solución de lavado se transfirió a tubos Falcon y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min para recuperar el pellet microbiano. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de solución salina (NaCl 0.85% v/v). A partir de esta suspensión se hicieron diluciones decimales con solución salina (0.85% de NaCl). Posteriormente se procesaron de acuerdo a lo recomendado para cada grupo de microorganismos (Ryffel y col., 2016). Para bacterias se utilizó Agar Nutritivo (AN, Dibico, México) adicionado de fluconazol (100 mg/L, Pisa, Mexico); en las placas se inocularon 100 μ L de las diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} por duplicado y se incubaron a 30 °C por 48 h. Los hongos y levaduras se aislaron en Agar Papa Dextrosa (APD, Dibico, México) adicionado de estreptomycin (50 μ g/ mL, Pisa, México); se inocularon por triplicado 100 μ L de las diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} , y las placas se incubaron a 28 °C por 96 h. De cada placa se seleccionaron de 5 a 10 colonias con características diferenciales.

Los aislamientos microbianos obtenidos fueron clasificados en morfotipos, considerando que un morfotipo está integrado por diferentes tipos de cepas de bacterias/hongos/levaduras distinguibles de otros aislamientos microbianos basados en características morfológicas, características bioquímicas y celulares que pueden o no indicar diferentes especies (Luziatelli y col., 2019). Por lo que se procedió a realizar una clasificación mediante características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos. En el caso de bacterias, las características bioquímicas se determinaron mediante la actividad en agar triple azúcar hierro (TSI), agar lisina hierro agar (LIA) y agar citrato de Simmons; todos los medios de BD (Bioxon, México). Cada morfotipo microbiano fue purificado y conservado en glicerol al 50% (v/v) en caldo nutritivo (CN) a -80 °C.

Para el caso de las levaduras, se realizaron tinciones Gram para determinar la morfología celular y poder clasificar junto con las características macroscópicas. Cada

morfotipo microbiano fue purificado y conservado en glicerol al 50% (v/v) en caldo nutritivo (CN) a -80°C .

3.1.2.1 Identificación molecular de bacterias y levaduras

De los morfotipos obtenidos para bacterias y levaduras se seleccionó un aislado representativo para su identificación molecular. El ADN se extrajo utilizando el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, EUA). Para la identificación de bacterias se amplificó la región genética 16S rRNA (Fredriksson y col., 2013) y para las levaduras la región genética ITS (Toju y col., 2012) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en una reacción de 25 μl : 12.5 μl (1x) de Radiant™ 2X Taq Mastermix (Alkali Scientific, EUA), 5 ng/ μL de gDNA como molde y 10 mM de cebadores (Sigma-Aldrich, EUA) 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3 ') y 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3 ') para bacterias e ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA -3') y ITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') para levaduras. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador punto final (Arktik Thermal Cycler, Thermo Scientific, EUA) utilizando las siguientes condiciones para el programa: desnaturalización inicial durante 3 min a 95°C , 35 ciclos de 30 s desnaturalización a 95°C , 30 s de alineamiento a 48°C (bacterias) y 47°C (levaduras), 90 s de extensión a 72°C , seguida de una extensión final durante 7 minutos a 72°C . La integridad de los amplicones se corroboró por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Los amplicones obtenidos se purificaron mediante el kit DNA Clean y Concentrator™ -5 (Zymo Research, EUA) y secuenciados por el método de Sanger (LANGEBIO, México). Los cromatogramas de secuenciación se visualizaron mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.4 (Windows 95/98/NT/XP). Las secuencias resultantes se compararon con la base de datos no redundante de GenBank (Bethesda, MD, EUA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se compararon los mejores resultados y se utilizó un corte \geq al 99% de la cobertura e identidad de la secuencia para la comparación con la base de datos.

3.1.2.2 Identificación taxonómica de hongos

De los morfotipos obtenidos de los aislados de hongos se seleccionó un aislado representativo para su identificación taxonómica. Con el objetivo de inducir la esporulación de los aislados, se inocularon en los medios APD, agar nutritivo de levadura glucosa (NYDA, Anexo I) y agar V8 (Anexo I). Los medios se incubaron por 8 días a temperatura ambiente (28 °C).

La revisión de esporas se realizó mediante preparaciones semipermanentes de micelio del hongo en ácido láctico (Meyer, México). Posteriormente cada preparación se revisó al microscopio (Zeiss, México) utilizando los objetivos 10X, 40X y 100X. Se clasificaron en dos grupos, con base a la ausencia/presencia de esporas. Los morfotipos con esporas se clasificaron de acuerdo al posible género al que correspondían dado las estructuras de esporas y micelio visualizadas microscópicamente y descritas en las claves taxonómicas dependiente del género observado: *Aspergillus* (Klich, 1988), *Alternaria*, *Cladosporium* y *Rhizopus* (Denman y col., 2003; Bensch y col., 2010), *Colletotrichum* (Damm y col., 2010), *Fusarium* (Domsch y col., 2007) y *Penicillium* (Pitt, 1991).

3.1.3 Determinación de la microbiota epífita mediante secuenciación de amplicones

La obtención de la microbiota epífita mediante técnicas moleculares se realizó durante el ciclo de cultivo de Febrero a Agosto del año 2019. Los frutos se lavaron con 500 mL de agua destilada estéril, se sonicaron y agitaron durante 10 min a 200 rpm. Posteriormente el agua de lavado se filtró mediante membranas de 0.22 µm (Millipore, Merck, EUA) para separar la fracción microbiana. El agua de lavado se reservó para los análisis químicos de los exudados y las membranas se colectaron para la extracción de ADN microbiano.

3.1.3.1 Extracción de ADN y secuenciación masiva de amplicones 16S rRNA e ITS

La extracción de ADN de todas las muestras se realizó utilizando el kit ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo Research, EUA) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ADN se cuantificó y revisó su integridad mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA). El ADN obtenido (60 ng/ul por muestra) se envió a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación con el sistema de secuenciación Miseq (Illumina, EUA). Para las librerías de bacterias se amplificaron por PCR las regiones V3-V4 de la región genética 16S rRNA (Bakt_341F: 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3' y Bakt_805R: 5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') y para la población fúngica (hongos y levaduras) se amplificó la región genética ITS3-ITS4 del ITS (ITS3F: 5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' y ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Los archivos con las secuencias generadas fueron depositados en la base de datos de macrogen, de donde fueron obtenidas para su análisis.

3.1.3.2 Análisis bioinformático de la secuenciación masiva de amplicones

Las lecturas obtenidas de la secuenciación de los amplicones se sometieron a controles de calidad utilizando el programa FASTQC (Versión 0.11.2 Andrews, 2010), eliminando los pares de bases con baja calidad en cada una de las secuencias. Posteriormente las secuencias curadas se analizaron en el lenguaje de programación Python 2.7 mediante una máquina virtual (VirtualBox versión 5.1.18) y siguiendo el protocolo del programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, versión 1.9.1, <http://qiime.org/>) (Kuczynski y col., 2011). Las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) con un rango de similitud del 97% utilizando el algoritmo UCLUST mediante el script del comando “pick_closed_reference_otus.py” y utilizando como referencia las bases de datos Greengenes (versión 13_8) para bacterias y la

base de datos de UNITE (versión 01.12.2017) para hongos y levaduras. Se realizó un filtrado de los datos obtenidos para eliminar los OTUs con abundancias menores al 0.01% en bacterias y 0.001% para levaduras/hongos y así, disminuir el error de la estimación de los OTUs, obteniendo una tabla normalizada para los análisis posteriores (Koljalg y col., 2013 y Navas-Molina y col., 2013). Para determinar si el número de secuencias que se obtuvieron representan una fracción significativa de la muestra con base a los diferentes OTUs observados, se realizaron curvas de rarefacción, mediante las tablas de OTUs encontrados en cada muestra en el paquete VEGAN mediante la función “rarefy” (Oksanen, 2013).

3.1.3.3 Análisis de los perfiles funcionales bacterianos de los amplicones de 16S rRNA

La predicción funcional metabólica potencial de los OTUs normalizados bacterianos, se determinaron en el lenguaje de programación Python 2.7, siguiendo el protocolo del programa PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States, versión 1.1.0, <http://picrust.github.io/picrust/>) (Langille y col., 2013). El porcentaje de secuencias asociadas a las funciones metabólicas por muestra se graficó mediante un mapa de calor utilizando el paquete ggplot2 del programa estadístico de R.

3.1.4 Análisis estadísticos de la microbiota

Los análisis estadísticos se realizaron el programa estadístico de R (R Core Team, 2013, versión 3.6.2). Para las muestras dependientes de cultivo, se estimó la riqueza de especies (S) (número total de especies bacterianas) y el índice de diversidad de Shannon-Weiner (H'). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar el efecto de la etapa de desarrollo y la variedad de manzana sobre el Log₁₀ UFC, la riqueza de especies (S) y la diversidad (H') por centímetro cuadrado (cm²) de epicarpio de fruta. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar la mediana entre las etapas de desarrollo (nivel de confianza de 0.05). El porcentaje de abundancia relativa se realizó mediante la siguiente fórmula: $RA (\%) = \frac{d_i}{dT} * 100$; donde d es la densidad (CFU/cm²) de la especie (i)

y dT la densidad total de bacterias, hongos o levaduras que se encuentran en la etapa del fruto.

Para las muestras independientes de cultivo, se estimó la diversidad de Shannon-Weiner (H') a nivel de familia y género; para observar el efecto de la variedad sobre la diversidad la diferencia entre las variedades se determinó mediante un análisis de varianza de una vía y una prueba de Tukey-Kramer (nivel de confianza de 0.05) usando el paquete agricolae. El porcentaje de abundancia relativa se calculó de los OTUs bacterianos y fúngicos a nivel de familia y género se determinó mediante la fórmula: $RA (\%) = d_i/dT * 100$; donde d es el número de secuencias del OTU (i, familia o género) y dT es el número total de secuencias de todos los OTUs (familias o géneros) presentes en la muestra.

Para estimar la disimilitud/diferencia entre las muestras y las rutas metabólicas predichas, se utilizó la medida de Bray-Curtis donde la suma de las diferencias entre las muestras a través de las variables (es decir, los morfotipos/especies/OTUs microbianos) se estandariza mediante la suma de los valores de las variables entre las muestras, también sumada entre las variables. Esta medida varía entre cero (completamente similares) y uno (completamente diferente), además que se adapta bien a los datos de abundancia relativa de especies, porque ignora las variables con ceros. El efecto del tipo de comunidad microbiana, la variedad de manzana, la etapa de desarrollo y todas sus interacciones resultado de la matriz de distancia calculada, se evaluaron mediante un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA). Posteriormente, esos factores con efectos significativos se graficaron utilizando el método de escala multidimensional no métrica (NMDS) de Kruskal. Los análisis se realizaron utilizando los paquetes MASS y VEGAN (Anderson, 2001).

Para estimar la diferencia de las funciones metabólica predichas entre las muestras se realizó un análisis de varianza de una vía y las diferencias estadísticas se evaluaron mediante una prueba de Tukey-Kramer (nivel de confianza de 0.05). La estimación de similitud de las muestras con base en las funciones metabólicas predichas, se realizó mediante un análisis de factores múltiples (MFA, paquete FactoMineR, programa R), en el cual, la similitud entre las muestras se decide mediante múltiples conjuntos de observaciones diferentes (cuantitativos y cualitativos), para determinar una ordenación por el porcentaje de contribución de las funciones metabólicas identificadas (Abdi and Williams 2010 y Cui y col., 2019).

3.4 Determinación de la actividad antagonista de bacterias epífitas

3.4.1 Activación de cepas

Para el inóculo de *P. expansum* Link cepa CFNL2016, el hongo se activó en medio PDA durante 12 días a temperatura ambiente. Los conidios se recolectaron usando solución salina (NaCl 0.85%); los micelios se separaron por filtración y la suspensión de conidios se cuantificó y ajustó a la concentración requerida.

Para las bacterias se tomó una colonia (activadas en medio AN durante 24 horas a temperatura ambiente) y se inoculó en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 10 mL de caldo nutritivo (CN, Dibico, Mexico) en agitación constante durante 24 h a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y la pastilla bacteriana obtenida se ajustó a la concentración requerida.

3.4.2 Ensayo antagonista *in vitro* de bacterias contra *Penicillium expansum*

Para evaluar la actividad antagonista de las cepas bacterianas contra *P. expansum*, se realizaron enfrentamientos duales *in vitro* de acuerdo a la metodología propuesta por Chen y col. (2016). La suspensión de bacteria se utilizó a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. El ensayo de antagonismo fue por confrontación dual en medio APD, inoculando en el centro de la placa un segmento de 5 mm de diámetro del hongo activo. Posteriormente, se inocularon 10 μ L de la suspensión de las bacterias epífitas a una distancia de 3 cm del crecimiento fúngico. El control negativo consistió en placas de APD sólo inoculadas con *P. expansum*, y los controles positivos fueron la cepa comercial de *Bacillus* spp. Q11 (Rodríguez-Chávez y col., 2019) y el fungicida nistatina (Rb Salute, México). Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 8 días por quintuplicado. La actividad antagonista se calculó como el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR): $\text{PICR (\%)} = [(R1 - R2) / R1] \times 100$, donde R1 es el crecimiento radial de *P. expansum* en control negativo y R2

indica el crecimiento del patógeno en el ensayo de confrontación dual con las bacterias epífitas.

3.4.3 Ensayo antagonista *in vivo* de bacterias contra *Penicillium expansum*

La selección de las cepas para los ensayos *in vivo* se basó en la actividad antagonista observada en los ensayos *in vitro*, seleccionando aquellas con una inhibición mayor a 35 PICR%. Los ensayos *in vivo* se desarrollaron con base a la metodología propuesta por Chen y col. (2017). La suspensión bacteriana se utilizó a una concentración de 1×10^8 UFC/ml y el inóculo de *P. expansum*, a 1×10^5 conidios/ml. Manzanas de la variedad 'Golden Delicious' (variedad susceptible) fueron desinfectadas con una solución hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 2 minutos, se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y se secaron en una campana de flujo laminar. Se hicieron cuatro heridas circulares (5 x 5 x 3 mm) en la zona ecuatorial de cada manzana, se aplicó una gota de 20 μ L de la suspensión de patógenos a cada herida y se dejó secar por una hora a flujo laminar. Posteriormente se aplicaron 20 μ L del inóculo bacteriano a cada herida y las manzanas se colocaron en recipientes de plástico con sello hermético y se incubaron a temperatura ambiente (28 °C) durante 14 días (Zhou y col. 2001). El control negativo consistió en manzanas solo inoculadas con *P. expansum*, y los controles positivos consistieron en una cepa comercial de *Bacillus* spp. Q11 y el fungicida nistatina. La capacidad antagonista de cada cepa bacteriana se expresó como el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno (PIC) y se calculó utilizando la siguiente fórmula $PIC (\%) = [(D1-D2) / D1] \times 100$, donde D1 indica el diámetro de crecimiento de *P. expansum* en la manzana del control negativo y D2 indica el diámetro de crecimiento de *P. expansum* en la manzana co-inoculada con las bacterias epífitas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.4.3 Caracterización de compuestos antifúngicos producidos por bacterias antagonistas

3.4.3.1 Actividad quitinolítica

Se evaluó la actividad quitinolítica extracelular de las bacterias con capacidad antagonista de acuerdo al método propuesto por Wallace y col. (2017). Se preparó el medio de quitina coloidal (Anexo I). El cultivo bacteriano de una noche de crecimiento en CN se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 1 ml de solución salina (NaCl 0.85%) y se inocularon 10 µl en el medio de quitina coloidal. Las cepas bacterianas que mostraron halos transparentes después de 7 días de incubación a 28°C se consideraron como positivos a la producción de quitinasas extracelulares. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4.3.2 Producción de sideróforos

La técnica universal de cromo azurol S (CAS) se utilizó para determinar la producción de sideróforos en medio sólido (Schwyn y Neilands, 1987) (Anexo I). De cada cepa bacteriana se inocularon 10 µL en el medio (a partir de un inóculo bacteriano obtenido como se describe en la sección 3.4.1). Las bacterias que mostraron un halo con un cambio en la coloración del medio de azul a amarillo después de 10 días de incubación a 28 °C, se consideraron como positivos para la producción de sideróforos. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4.3.3 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se evaluó en placas de agar sangre (MCD LAB, México). Se tomó una gota con un asa microbiológica de un cultivo activado de las cepas de bacterias (obtenido como se describe en la sección 3.4.1), y se estrió en el medio, las placas se incubaron a 30 °C durante cuatro días. Las bacterias que produjeron halos traslúcidos alrededor del crecimiento de la colonia fueron considerados como positivos para actividad hemolítica. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4.3.4 Perfil de lipopéptidos

Las bacterias que mostraron mayor actividad antagonista, producción de sideróforos y capacidad hemolítica se seleccionaron para determinar el índice de emulsificación y el perfil de lipopéptidos de la fracción biosurfactante de su sobrenadante. Para obtener el índice de emulsificación se tomaron 2 mL del sobrenadante de un cultivo activado, se mezcló con 2 mL de queroseno y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Posteriormente se realizó la medición de la capa emulsificante a las 0 y 24 h y se calculó el índice de emulsificación (IE_{24}) (Zhu col., 2013).

Para detectar el perfil de lipopéptidos presentes en la fracción biosurfactante, se realizó un pre-inóculo bacteriano en 100 ml de CN, se incubó durante 16 horas a 37 °C con agitación constante a 180 rpm. El cultivo obtenido se inoculó en 500 mL de CN, se incubó a 30 °C a 180 rpm durante 72 h. El sobrenadante del cultivo de 72 h se centrifugó para eliminar las células (400 rpm durante 35 min). El sobrenadante se ajustó a pH 2 con HCl 6N y se refrigeró a 4 °C durante la noche. Los precipitados ácidos formados se recuperaron por centrifugación a 400 rpm durante 30 minutos, el sedimento obtenido se solubilizó en metanol anhidro y se concentró usando un evaporador de vacío. Los precipitados secos se disolvieron en 1 mL de PBS (0.01 M), se sonicaron durante 5 min y se centrifugaron a 400 rpm durante 5 min. La solución de lipopéptidos se filtró a través de filtros de jeringa de 0.2 μ m (Nalgene™, Thermo Scientific, EUA) y se colocó en un tubo estéril (Cao y col., 2009).

Para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) (Bruker Daltonics Microflex LT equipment, Bruker Corp., Massachusetts, EUA), se mezcló 1 μ L de solución de lipopéptidos con 10 μ L de disolución sobresaturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich, EUA) en una proporción de 1:5 preparada en una mezcla de acetonitrilo:agua como matriz solución. Luego se colocó 1 μ L de la mezcla en la placa MALDI permitiendo la evaporación. La muestra se insertó en la fuente de ionización y el rayo láser se proyectó en cada punto de forma pulsada. Los datos fueron adquiridos utilizando el modo de funcionamiento del reflector adquiriendo 150 disparos, en un rango de detección de 900 a 1,600 de masa/carga (m/z).

3.4.3.5 Análisis estadístico de la capacidad antifúngica de bacterias

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico de R. Los ensayos de antagonismo *in vitro* e *in vivo* y el índice de emulsificación se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía y las diferencias estadísticas se evaluaron mediante una prueba de Tukey-Kramer (nivel de confianza de 0.05) usando el paquete Agricolae (Versión n 1.3-5). Para los análisis estadísticos los datos se transformaron a grados angulares y se expresó el resultado con el dato original.

3.5 Determinación del perfil de compuestos presentes en los exudados del fruto

3.5.1 Obtención de exudados presentes en la superficie de los frutos

Para la obtención de los exudados, se partió del agua de lavado de los frutos para los análisis de secuenciación masiva de ampliaciones (sección 3.1.3). Los 450 mL del agua destilada de lavado se concentraron mediante rotavapor (Rotavapor® R-215, Buchi, Reino Unido) en vacío a 60 °C hasta tener un volumen final de 5 mL, el cual se filtró a través de una membrana de 0.45 µm (Millipore, Merck, EUA). El volumen final se transfirió a viales para HPLC. Los viales se congelaron a -20°C hasta su procesamiento (Padgett, 1990). A partir de esta solución se cuantificaron los azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y polifenoles.

3.5.1.1 Azúcares y ácidos orgánicos

Los azúcares y ácidos orgánicos se determinaron por HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, EUA). Para ello, se utilizó una columna Agilent Hi Plex Ca (Duo) (300 x 6.5 nm) a 80 °C. La fase móvil fue agua milli-Q grado HPLC y la elución de las muestras (20 µL) se realizó a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. El tiempo de ejecución total fue de 30 min y la detección se realizó mediante el detector de índice de refracción (RID) (Ball y Lloyd, 2008). Para determinar la concentración de los analitos, se elaboró una curva estándar desde

0.05 hasta 1 mg/mL para cada uno de los siguientes compuestos: ácido málico, sacarosa, glucosa, xilosa, fructosa, manitol, sorbitol y ribosa (Anexo II) (Sigma-Aldrich, EUA).

3.5.1.2 Aminoácidos

Los aminoácidos se determinaron por HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, EUA) en base al método publicado en una nota técnica de Agilent (Henderson y col., 2000). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse AAA (dimensiones: 4.6 mm x 150 mm) y las fases móviles consistieron en una solución de fosfato monosódico 40 mM, pH=7.8 (fase A) y una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (10:45:45 v/v/v; fase B). Para la preparación de muestra se inyectaron los siguientes volúmenes: 2.5 µL de una solución tampón de borato mezclado con 20 µL de muestra, 0.5 µL de o-ftaldehído (OPA), 0.5 µL de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) y 32 µL de agua de grado HPLC. La elución de las muestras se realizó a una velocidad de flujo de 2.0 mL/min y el tiempo de ejecución total fue de 30 min. La detección se realizó a 262 y 338 nm. Los picos de aminoácidos individuales (Anexo III) se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de los estándares sugeridos en el protocolo de la columna (Sigma-Aldrich, EUA).

3.5.1.3 Polifenoles

Los polifenoles se determinaron por HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, EUA). Se utilizó una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (5 m x 4.6 mm x 150 mm) a 28 °C. Las fases móviles estuvieron constituidas por una solución de ácido fosfórico 0.01 M (fase A) y metanol puro (fase B). La elución de las muestras (20 µL) se realizó a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y el tiempo de ejecución total fue de 65 min y la detección se realizó a 280 nm. Las condiciones del gradiente lineal fueron 0 min 5% B, 25 min 40%, 40 min 50% B, 50 min 50% B, 55 min 100% B, 60 a 65 min 5%. Para determinar la concentración de los analitos, se elaboró una curva estándar desde 0.76 µg a 76 µg/mL para cada uno de los siguientes compuestos: ácido gálico, ácido 3,4 – dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico,

catequina, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-coumarico, ácido 4 hidroxí 3 metoxicinámico, ácido sinapico, ácido 2- hidroxicinámico y apigenina (Anexo IV) (Sigma-Aldrich, EUA).

3.5.2 Análisis estadísticos y correlación del perfil de exudados con las poblaciones microbianas

Para analizar las diferencias entre las etapas y las variedades de las concentraciones de los diferentes compuestos cuantificados se realizó un análisis de varianza de una vía y las diferencias estadísticas se evaluaron mediante una prueba de Tukey-Kramer (nivel de confianza de 0.05) mediante el paquete Agricolae. Para la visualización de los cambios en el contenido de exudados por etapa y variedad de manzana se graficaron los datos en un mapa de calor mediante el paquete ggplot2. La disimilitud/diferencia de los perfiles de exudados, se determinó mediante la medida de distancia de Bray-Curtis y el efecto de la variedad de manzana y la etapa de desarrollo, se evaluaron mediante un análisis de PERMANOVA. Posteriormente, los factores con efectos significativos se graficaron utilizando el método NMDS de Kruskal. Los análisis se realizaron en el programa estadístico de R, utilizando los paquetes MASS y VEGAN.

Para determinar los patrones de variación de los OTUs bacterianos y fúngicos, a nivel de familia y género en relación con el perfil de exudados presentes de igual manera en la superficie de la manzana, se realizó en un análisis restringido de coordenadas principales (CAP) con la medida de distancia de Bray-Curtis y mediante la función capscale del paquete VEGAN (Anderson y col., 2003 y Irvine y col., 2011). Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico de R.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las poblaciones bacterianas y fúngicas que coexisten asociadas a los diferentes órganos de las plantas pueden presentar interacciones de sinergismo o antagonismo entre ellas (Frey-Klett y col., 2011, Janisiewicz y col., 2014). El estudio de la diversidad de estos microorganismos asociados a los frutos ha sido un tema central para comprender la funcionalidad y potencial de éstos en los sistemas agrícolas, principalmente, para potenciar el uso de agentes biológicos (microorganismos con actividad antagónica) en la etapa de poscosecha, y así, disminuir las pérdidas por hongos fitopatógenos y el uso de agroquímicos (Calvo y col., 2007; Bevardi y col., 2013; Chen y col., 2016). En este trabajo, encontramos una diversidad de bacterias y hongos que va cambiando a lo largo del desarrollo de la manzana, al igual que los exudados del fruto que interactúan con estos microorganismos. Algunos de estos aislados bacterianos, tuvieron la capacidad de limitar el daño causado por uno de los principales patógenos poscosecha de la manzana.

4.1 Composición y diversidad de la microbiota epífita asociada a la manzana.

4.1.1 Comunidades microbianas obtenidas por cultivo

A partir del aislamiento y cultivo de la fracción microbiana presente en la superficie de la manzana en los años 2017 (n= 30 frutos) y 2018 (n= 54), se lograron cuantificar y aislar bacterias, hongos y levaduras durante todas las etapas de desarrollo estudiadas en las variedades 'Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious'. En el análisis de las poblaciones microbianas del año 2017, no se encontraron diferencias en la densidad, riqueza y diversidad bacteriana y fúngica (hongos y levaduras) entre las variedades, pero sí se encontraron diferencias entre las etapas de desarrollo ($p < 0.05$) (Tabla 2). La etapa con la mayor densidad,

riqueza y diversidad fue la etapa de amarre de fruto, y la etapa de fruto maduro fue la de menor. Con base a estos resultados, se seleccionaron para un segundo año de muestreo (2018) las etapas de amarre de fruto, fruto verde 3 y fruto maduro de las mismas variedades. Además, se seleccionó la variedad amarilla ‘Golden Delicious’, para analizar el efecto de una variedad contrastante sobre las poblaciones microbianas. Al igual que el año 2017, en 2018 no se encontraron diferencias en la densidad, riqueza y diversidad de las poblaciones microbianas entre las tres variedades, siendo nuevamente la etapa de desarrollo donde se encontraron los cambios significativos ($p < 0.05$) (Tabla 2). Adicionalmente, se reafirmó en las tres variedades que la etapa de amarre de fruto fue nuevamente la que mostró los valores más altos en las determinaciones. Estos resultados coinciden con los datos reportados previamente para la variedad ‘Golden Delicious’, en donde Teixido y col. (1999) observaron que a medida que la manzana se acerca a la maduración, las densidades microbianas disminuyen. Los cambios en las comunidades microbianas epífitas se han relacionados con los cambios ambientales a los que están expuestas como temperatura, lluvia y viento (Allard y col., 2020; Gomes y col., 2018).

En el manzano se ha observado que las poblaciones bacterianas y fúngicas presentes en las hojas cambian dependiendo de la estación del año, encontrando un aumento en las poblaciones en los meses finales de la maduración (Junio-Agosto) (He y col., 2012). En nuestro estudio, de manera simultánea al crecimiento del fruto del manzano ocurren cambios ambientales, como la temperatura; en febrero (amarre del fruto) se tienen temperaturas promedio del sitio de 18 °C y estas van aumentando hasta llegar a 24°C en Agosto (fruto maduro), lo cual posiblemente también pueda estar asociada con los cambios observados. Los resultados de las poblaciones microbianas por tipo de población se muestran a continuación.

Tabla 2. Densidad, diversidad y riqueza de la población bacteriana y fúngica durante el desarrollo de la manzana en dos años consecutivos.

Grupo microbiano	Año	Etapas	Densidad \log_{10} UFC/cm ²	Riqueza/cm ²	Diversidad/cm ²	
Bacterias	2017	Amarre de fruto	2.025 ^a	1.967 ^a	0.333 ^a	
		Fruto verde 1	0.924 ^a	0.556 ^a	0.119 ^a	
		Fruto verde 2	0.155 ^b	0.083 ^b	0.020 ^b	
		Fruto verde 3	0.082 ^b	0.053 ^b	0.012 ^b	
		Fruto maduro	0.086 ^b	0.032 ^b	0.006 ^c	
	2018	Amarre de fruto	0.186 ^a	0.089 ^a	0.013 ^a	
		Fruto verde 3	0.098 ^b	0.026 ^b	0.005 ^b	
		Fruto maduro	0.047 ^c	0.012 ^c	0.002 ^c	
	Hongos	2017	Amarre de fruto	1.780 ^a	1.067 ^a	0.200 ^a
			Fruto verde 1	0.477 ^b	0.313 ^b	0.059 ^{ab}
Fruto verde 2			0.074 ^c	0.053 ^c	0.008 ^{bc}	
Fruto verde 3			0.073 ^c	0.039 ^c	0.005 ^c	
Fruto maduro			0.067 ^c	0.043 ^c	0.004 ^c	
2018		Amarre de fruto	0.136 ^a	0.060 ^a	0.008 ^a	
		Fruto verde 3	0.087 ^b	0.031 ^b	0.004 ^b	
		Fruto maduro	0.112 ^a	0.027 ^{ab}	0.007 ^a	
Levaduras		2017	Amarre de fruto	1.219 ^a	0.883 ^a	0.153 ^a
			Fruto verde 1	0.337 ^b	0.242 ^b	0.073 ^a
	Fruto verde 2		0.057 ^c	0.032 ^c	0.008 ^b	
	Fruto verde 3		0.034 ^c	0.025 ^c	0.005 ^b	
	Fruto maduro		0.018 ^c	0.016 ^c	0.004 ^b	
	2018	Amarre de fruto	0.082 ^a	0.060 ^a	0.007 ^a	
		Fruto verde 3	0.047 ^b	0.014 ^b	0.002 ^b	
		Fruto maduro	0.100 ^a	0.023 ^c	0.005 ^c	

Los valores representan la mediana de seis (año 2017) y nueve (año 2018) réplicas; los valores con una letra diferente en la misma columna y año son significativamente diferentes (Prueba Wilcoxon, $p < 0.05$).

4.1.1.1 Población bacteriana

En el primer año de colecta se recuperaron un total de 1399 aislados a partir de bacterias de las variedades ‘Joya’ y ‘Royal Gala’, los cuales con base en las características morfológicas coloniales y celulares, y perfil de pruebas bioquímicas se clasificaron en 30 morfotipos (Tabla 3). Mediante la identificación molecular en los 30 morfotipos se encontraron cinco géneros bacterianos: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* y *Plantibacter*; siendo *Bacillus* el género más abundante en todas las etapas en ambas variedades (83.3 % de las bacterias identificadas) (Figura 6).

En el año 2018, se recuperaron 2076 aislados bacterianos asociados al fruto en las tres variedades y etapas de desarrollo seleccionadas, los cuales se clasificaron en 36 morfotipos (Tabla 4), y mediante la identificación molecular se encontraron 17 géneros: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Comamonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Fronidhabitans*, *Leifsonia*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudarthrobacter*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (Figura 7). Tres géneros se encontraron nuevamente, pero no se observó *Plantibacter*. El género *Bacillus* fue nuevamente el más abundante en todas las etapas en las tres variedades (36.1 % de las bacterias identificadas). La dominancia de *Bacillus* en las poblaciones epífitas se ha relacionado con su capacidad de colonizar y permanecer asociado de una manera más efectiva que otros géneros de bacterias debido a la producción de biopelículas (Saleem y col., 2017), además de permanecer latente mediante la formación de esporas (Demoz & Korten, 2006).

Tabla 3. Identificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas aisladas de la superficie de ‘Royal Gala’ y ‘Joya’ en el año 2017.

Código de Morfotipo	Cepa bacteriana más cercana (% similitud NCBI)	Número de acceso del NCBI	Caracterización bioquímica*			
			Cit	Lis	Glu	LIA
M12	<i>Arthrobacter koreensis</i> (100 %)	NR_025665.1	-	+	+K/K	-K/A
M16	<i>Bacillus cereus</i> (99 %)	NR_074540.1	-	+	-K/K	-K/K
M5	<i>Bacillus halotolerans</i> (100 %)	NR_115063.1	+	+	+K/K	-K/A
M15	<i>Bacillus firmus</i> (100 %)	NR_112635.1	-	-	+K/A	-K/K
M20	<i>Bacillus licheniformis</i> (99 %)	NR_118996.1	-	+	+K/K	-K/A
M17	<i>Bacillus megaterium</i> (100 %)	NR_116873.1	-	+	+K/K	+A/A
M9	<i>Bacillus methylotrophicus</i> (99 %)	KF590554.1	-	+	+K/K	-A/K
M2	<i>Bacillus mobilis</i> (100 %)	NR_157731.1	-	-	+K/A	-K/A
M6	<i>Bacillus mobilis</i> (100 %)	MT538261.1	-	-	-A/K	-K/K
M10	<i>Bacillus mobilis</i> (100 %)	MT515806.1	-	+	-K/K	-K/K
M27	<i>Bacillus mobilis</i> (100 %)	MK855407.1	-	+	-K/K	+A/K
M28	<i>Bacillus mobilis</i> (100 %)	MT429193.1	-	+	-K/K	-K/A
M18	<i>Bacillus Mojavensis</i> (100 %)	NR_118290.1	-	+	-K/K	+A/K
M21	<i>Bacillus Mojavensis</i> (100 %)	MT434775.1	-	+	+K/K	-K/A
M30	<i>Bacillus Mojavensis</i> (100 %)	MT313129.1	-	+	+K/K	+A/A
M14	<i>Bacillus safensis</i> (100 %)	NR_113945.1	-	+	+K/K	-K/A
M3	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	NR_112116.2	-	-	+K/A	-K/A
M4	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	MT636851.1	+	+	+K/K	+A/K
M8	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	MT447880.1	-	+	+K/K	-K/A
M11	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	NR_112116.2	-	-	+K/A	+A/A
M23	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	MT677937.1	+	+	-K/K	-K/K
M13	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	MT645308.1	-	+	+K/K	-K/A
M25	<i>Bacillus subtilis</i> (100 %)	MN900584.1	-	+	-K/K	-K/K
M19	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (100 %)	MN918365.1	-	+	-K/K	-K/K
M24	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (100 %)	NR_112686.1	-	-	+K/A	-K/A
M26	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (100 %)	LS998693.1	-	+	+K/K	-K/A
M7	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (99 %)	NR_104839.1	-	+	+K/K	-K/A
M1	<i>Microbacterium ginsengiterrae</i> (100 %)	NR_116483.1	-	+	+K/K	-K/A
M22	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (100 %)	NR_025548.1	-	+	-K/K	-K/K
M29	<i>Plantibacter flavus</i> (99 %)	NR_025462.1	-	+	-K/K	-K/K

* Pruebas bioquímicas, Cit: utilización de citrato, Glu: solo fermentación de glucosa, Ácido: A, Alcalino: K.

Tabla 4. Identificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas aisladas de la superficie de ‘Royal Gala’, ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’ en el año 2018.

Código de Morfotipo	Cepa bacteriana más cercana (% similitud NCBI)	Número de acceso del NCBI	Caracterización bioquímica*			
			Cit	Lis	Glu	LIA
M1.18	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (100 %)	NR_108461.1	+	+	+K/K	-K/A
M2.18	<i>Acinetobacter</i> sp. (99 %)	MT476969.1	-	+	+K/K	+A/A
M3.18	<i>Arthrobacter gandavensis</i> (100 %)	NR_025475.1	-	+	-K/K	-K/K
M4.18	<i>Arthrobacter pascens</i> (100 %)	NR_026191.1	-	+	-K/K	-K/K
M5.18	<i>Arthrobacter</i> sp. (100 %)	LC488937.1	+	+	-K/K	-K/K
M6.18	<i>Bacillus atropheus</i> (100 %)	MT305986.1	-	-	+K/A	-K/A
M7.18	<i>Bacillus endophyticus</i> (99 %)	NR_025122.1	-	+	+K/K	-A/K
M8.18	<i>Bacillus licheniformis</i> (100 %)	NR_074923.1	-	-	+K/A	-K/A
M9.18	<i>Bacillus mediterraneensis</i> (100 %)	NR_144741.1	-	-	+K/A	-K/A
M10.18	<i>Bacillus megaterium</i> (100 %)	MN704496.1	-	+	-K/K	-K/K
M11.18	<i>Bacillus mobilis</i> (99 %)	NR_157731.1	-	-	+K/A	-K/A
M12.18	<i>Bacillus mojavenis</i> (99 %)	NR_118290.1	-	+	-K/K	-K/K
M13.18	<i>Bacillus simplex</i> (99 %)	NR_114919.1	-	+	-K/K	-K/K
M14.18	<i>Bacillus</i> sp. (100 %)	KY625607.1	-	-	+K/A	-K/A
M15.18	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> (100 %)	MT071494.1	-	+	-K/K	-K/K
M16.18	<i>Bacillus tequilensis</i> (100 %)	MN988863.1	-	+	+K/K	+A/A
M17.18	<i>Bacillus toyonensis</i> (100 %)	NR_121761.1	-	-	+K/A	-K/A
M18.18	<i>Bacillus zanthoxyli</i> (99 %)	NR_164882.1	-	+	-K/K	-K/K
M19.18	<i>Clavibacter michiganensis</i> (100 %)	NR_036892.1	-	+	+K/K	-K/A
M20.18	<i>Comamonas piscis</i> (100 %)	NR_148635.1	+	+	+K/K	+A/A
M21.18	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (100 %)	NR_025467.1	-	+	+K/K	-K/A
M22.18	<i>Enterobacter cloacae</i> (100 %)	KP058541.1	+	+	+K/K	+A/A
M23.18	<i>Erwinia billingiae</i> (100 %)	NR_104932.1	-	-	+K/A	-K/A
M24.18	<i>Frondehabitans</i> sp. (100 %)	MH813406.1	-	+	-K/K	-K/K
M25.18	<i>Leifsonia soli</i> (96 %)	NR_116501.1	-	+	-K/K	-K/K
M26.18	<i>Lysinibacillus chungkukjangi</i> (100 %)	NR_109669.1	-	+	-K/K	-K/K
M27.18	<i>Methylobacterium goesingense</i> (100 %)	MH929793.1	-	+	+K/K	-K/A
M28.18	<i>Methylobacterium phyllostachyos</i> (100 %)	NR_108242.1	-	-	+K/A	-K/A
M29.18	<i>Microbacterium maritypicum</i> (100 %)	NR_114986.1	-	-	+K/A	-K/A
M30.18	<i>Pantoea agglomerans</i> (99 %)	NR_114111.1	-	+	-K/K	-K/K
M31.18	<i>Pantoea</i> sp. (100 %)	KF202777.1	-	+	+K/K	-K/A

Código de Morfotipo	Cepa bacteriana más cercana (% similitud NCBI)	Número de acceso del NCBI	Caracterización bioquímica*			
			Cit	Lis	Glu	LIA
M32.18	<i>Pseudarthrobacter defluvii</i> (99 %)	NR_042573.1	-	+	-K/K	-K/K
M33.18	<i>Pseudomonas asturiensis</i> (100 %)	NR_108461.1	+	+	+K/K	+A/A
M34.18	<i>Pseudomonas caspiana</i> (97 %)	NR_152639.1	+	+	+K/K	+A/A
M35.18	<i>Pseudomonas graminis</i> (100 %)	NR_026395.1	+	+	+K/A	+A/A
M36.18	<i>Sphingomonas aerolata</i> (100 %)	NR_121761.1	+	+	+K/A	+A/A

* Pruebas bioquímicas, Cit: utilización de citrato, Glu: solo fermentación de glucosa, Ácido:A, Alcalino: K.

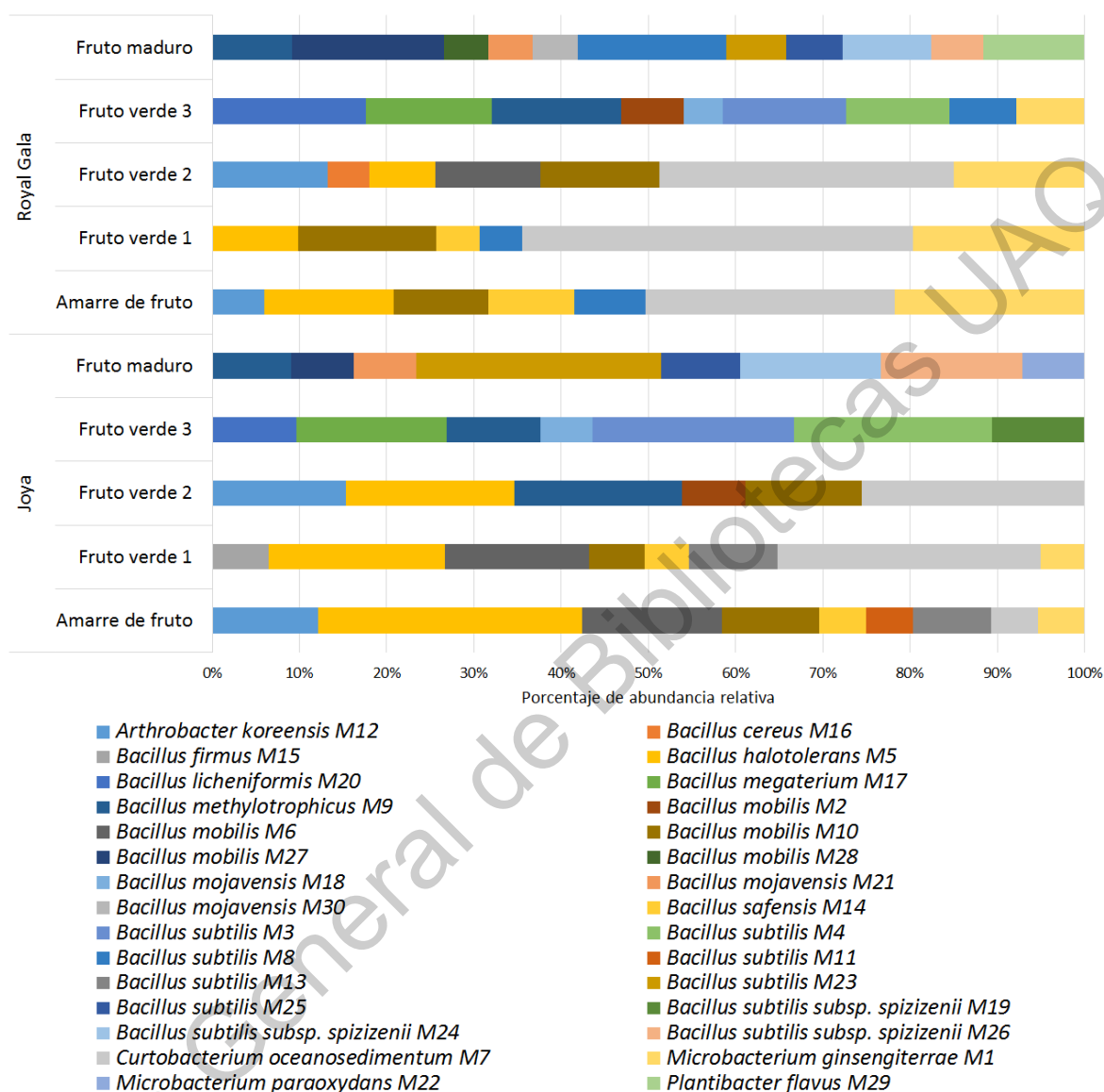


Figura 6. Distribución y abundancia de las bacterias identificadas molecularmente en las variedades ‘Joya’ y ‘Royal Gala’ en el año 2017 en las cinco etapas del desarrollo del fruto.

El análisis de PERMANOVA reveló que la composición bacteriana detectada en el año 2017, está influenciada principalmente por la etapa de desarrollo ($R^2 = 0.48$, $P < 0.001$), observando que las etapas de fruto verde 3 y fruto maduro, se separan de las primeras tres etapas de desarrollo y explicando el 48% de la variación encontrada (Figura 8). Para el año 2018 se observó en el análisis de PERMANOVA que la composición bacteriana para este

año estaba influenciada nuevamente por la etapa de desarrollo ($R^2=0.23$, $P<0.001$), pero adicionalmente por el factor variedad ($R^2=0.17$, $P<0.001$), así como por la interacción etapa-variedad ($R^2=0.22$, $P<0.001$), explicando juntos un 40 % de la variación observada en los resultados. Debido a que los porcentajes de variación son muy similares entre los factores, no fue posible generar un gráfico de agrupación. Es posible que el efecto de variedad se haga más claro en el segundo año ya que se consideraron tres variedades en vez de dos, y la variedad incluida en 2018 es más contrastante en características de color y composición. En otros estudios se ha reportado que la población bacteriana presente en portainjertos de tres variedades de manzana ('Royal Gala', 'Golden Delicious', y 'Honey Crisp') se ve influenciada por el factor variedad (Liu y col., 2018). Esto podría indicar que para observar cambios de poblaciones bacterianas a nivel de técnicas dependientes de cultivo entre variedades en el sitio de estudio, posiblemente se necesiten de al menos tres variedades en estudio o variedades que muestren diferencias amplias en las características fenotípicas.

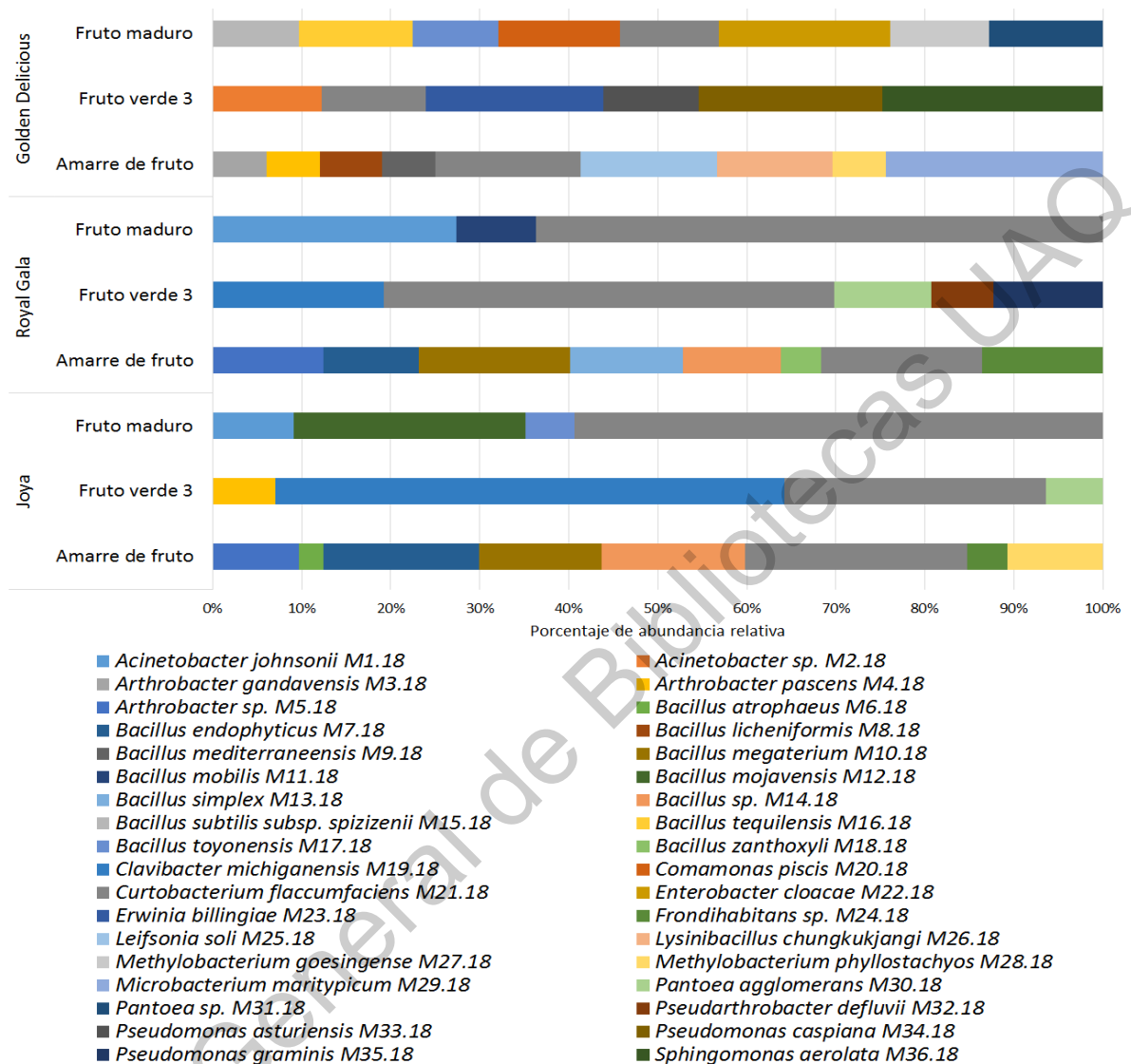


Figura 7. Distribución y abundancia de las bacterias identificadas molecularmente en las variedades ‘Joya’, ‘Royal Gala’ y ‘Golden Delicious’ en el año 2018 en las tres etapas de desarrollo del fruto.

Sin embargo, en ambos años el factor que influyó más claramente la estructura de las poblaciones bacterianas fue la etapa de desarrollo. Esto coincide con lo reportado por Ottesen y col. (2016a), que al analizar las poblaciones bacterianas en tres tiempos de desarrollo de frutos de manzano (variedad ‘Enterprise’) encontraron que la estructura de las poblaciones bacterianas estaba influenciada por el factor tiempo.

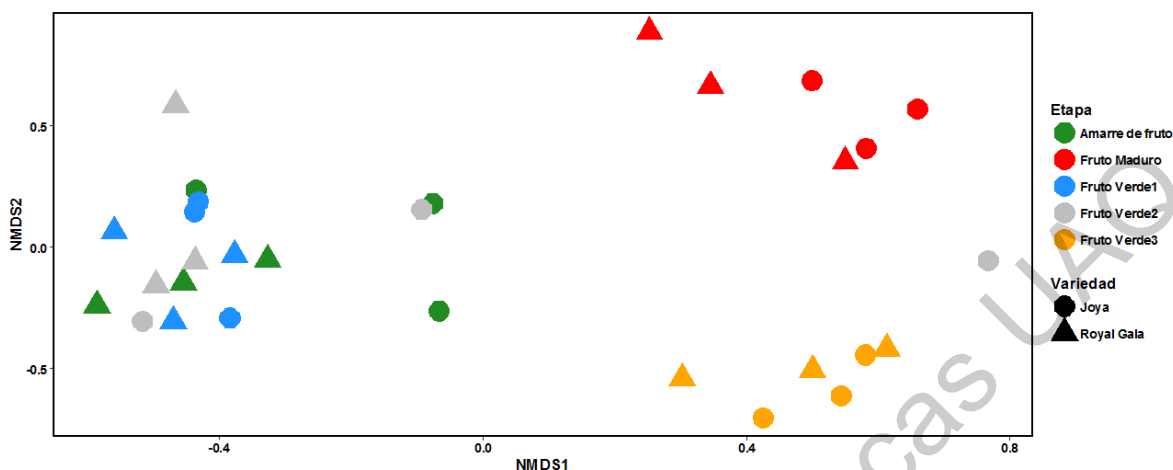


Figura 8. Agrupación de NMDS de bacterias del año 2017 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo. Variedad ‘Joya’ (círculos) y ‘Royal Gala’ (triángulos); en las etapas de amarre de fruto (círculos y triángulos verdes), fruto verde 1 (círculos y triángulos azules), fruto verde 2 (círculos y triángulos grises), fruto verde 3 (círculos y triángulos amarillos) y fruto maduro (círculos y triángulos rojos).

En ambos años, algunas bacterias se encontraron sólo en una etapa del desarrollo; por ejemplo, en el año 2017 la bacteria *B. subtilis* M3 en la etapa fruto verde 3 y *B. subtilis* M23 en la etapa de fruto maduro; y en el 2018 *M. phyllostachyos* M18.28 en la etapa de amarre de fruto y *B. toyonensis* M18.17 (Figura 6 y 7). Debido a que la mayoría de las bacterias epífitas son de transferencia horizontal, es decir vienen del ambiente que rodea a las plantas (Ottesen y col., 2016b), estos cambios podrían deberse a que las bacterias pudieron estar en menor densidad en el ambiente en torno a los frutos de manzana durante algunas etapas del desarrollo, lo que las hace no detectables dentro de la población bacteriana cultivable (Jackson y Denney, 2011; Shade y col., 2017). En contraste, en el segundo año de muestreo, la bacteria *C. flaccumfaciens* M18.21 se logró aislar en todas las etapas de desarrollo y variedades. Esta bacteria ha sido reportada como parte de la población bacteriana epífita en manzanas de variedad ‘Arlet’ en cultivo tradicional y orgánico (Wassermann y col., 2019); además de que en plantas de frijol donde es una bacteria patógena se ha vinculado su persistencia en la planta por la formación de biofilm (Harding y col., 2019).

Comparando las variedades ('Joya' y 'Royal Gala') y etapas del fruto (amarre del fruto, fruto verde 3 y fruto maduro) que coincidieron en los muestreos de ambos años, se observó que en el análisis de PERMANOVA de la población bacteriana, la composición bacteriana detectada estuvo influenciada principalmente por el año ($R^2=0.27$, $P<0.001$) y la etapa de desarrollo ($R^2=0.16$, $P<0.001$), explicando entre los dos un 43 % de la variación de los datos y no se observaron cambios por la variedad de la manzana (Figura 9). Como se observó en los datos individuales de cada año, la etapa de desarrollo es uno de los factores que influye en la conformación de las poblaciones bacterianas. Referente al cambio dependiente del año de muestro, se ha observado que en la filósfera de las plantas la composición bacteriana sufre cambios dependientes del año de colecta. Estos cambios observados pueden ser debido a que las especies de las bacterias presentes en el ambiente pueden fluctuar dependiendo de los cambios ambientales como la temperatura, precipitación y exposición solar, lo cual influye en qué tipo de bacterias pueden interaccionar con la superficie de las plantas (Rocheftort y col., 2019; Singh y col., 2019). En el presente estudio se observó que tanto la temperatura como la humedad fueron cambiantes entre los dos años de muestreo (Tabla 5), lo cual podría estar relacionado con los cambios encontrados.

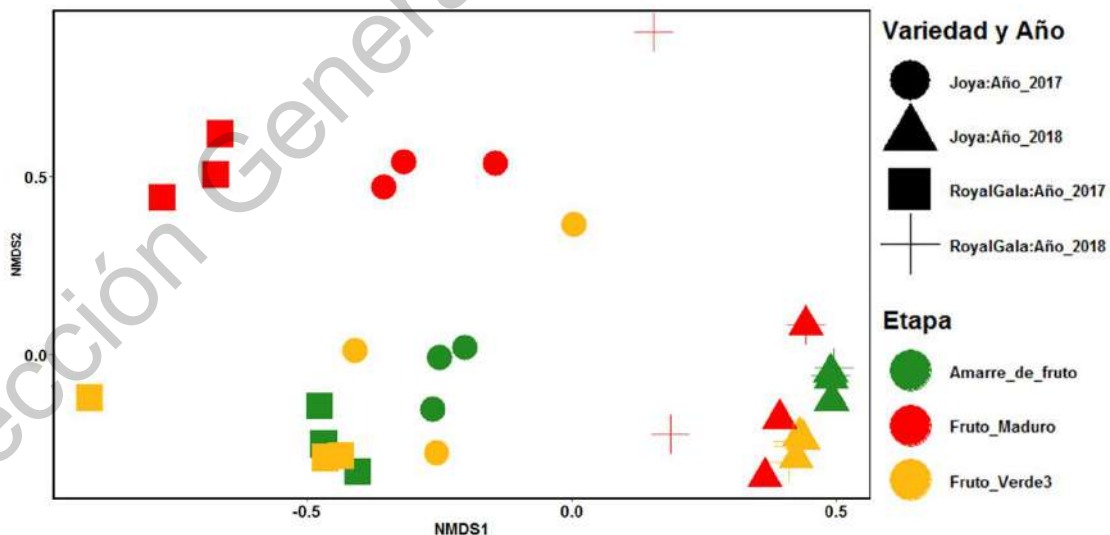


Figura 9. Agrupación de NDMDS de bacterias del año 2017 y 2018 asociadas al fruto de las variedades 'Joya' y 'Royal Gala'. Etapas de amarre de fruto (color verde), fruto verde 3 (color amarillo) y fruto maduro (color rojo).

Tabla 5. Promedio mensual de la temperatura y humedad del sitio de muestro en los meses de colecta (CONAGUA, estación climatológica Amealco 22001).

Año	Mes	Temperatura (°C)	Humedad (%)
2017	Abril	16.8	43.5
	Junio	18.0	63.7
	Agosto	15.6	81
2018	Abril	16.9	46.2
	Junio	15.8	74.9
	Agosto	13.3	46.8

4.1.1.2 Población fúngica

En el primer año de colecta se recuperaron un total de 2076 aislados de levaduras y 2865 aislados de hongos filamentosos de las variedades ‘Joya’ y ‘Royal Gala’. Los aislados de levaduras se clasificaron con base en las características morfológicas coloniales y celulares en 7 morfotipos. Mediante la identificación molecular los 7 morfotipos correspondieron a 7 diferentes géneros: *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Cystobasidium*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Papiliotrema* y *Rhodotorula*; siendo *Aureobasidium* el género más abundante de las levaduras (45.3 % AR) y el único presente en todas las etapas y variedades (Figura 10) (Anexo V). *Aureobasidium* ha sido reportado como levadura epífita en manzanas de las variedades ‘Red Delicious’ y ‘Golden Delicious’, y en ambas siendo una de las levaduras más abundante y presente en todos los tratamientos estudiados tanto en cultivo convencional como orgánico (Abdelfattah y col., 2016 y Granado y col., 2008).

Los aislados de hongos filamentosos se lograron clasificar en 38 morfotipos de hongos con base en las características macro y microscópicas evaluadas, quedando el 38.9 % de los aislados sin asignación de género, debido a que no se logró que produjeran esporas en los medios de cultivo. Los morfotipos correspondieron a 5 géneros: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium* y *Penicillium*, siendo *Alternaria* el género más abundante (35.5 % AR) (Figura 10). *Alternaria* es un género que ha sido reportado como parte de la población fúngica epífita en manzanas de las variedades ‘Red Delicious’, ‘Red

Fuji’ y ‘Golden Delicious’, siendo también uno de los hongos más abundantes en las poblaciones fúngicas (Abdelfattah y col., 2016; Granado y col., 2008; Qin y col., 2012). Además de ser uno de los géneros más abundantes en manzana, *Alternaria* también se encuentra dentro de los patógenos que pueden llegar a causar daño en este fruto en la etapa poscosecha (Ntasiou y col., 2015).

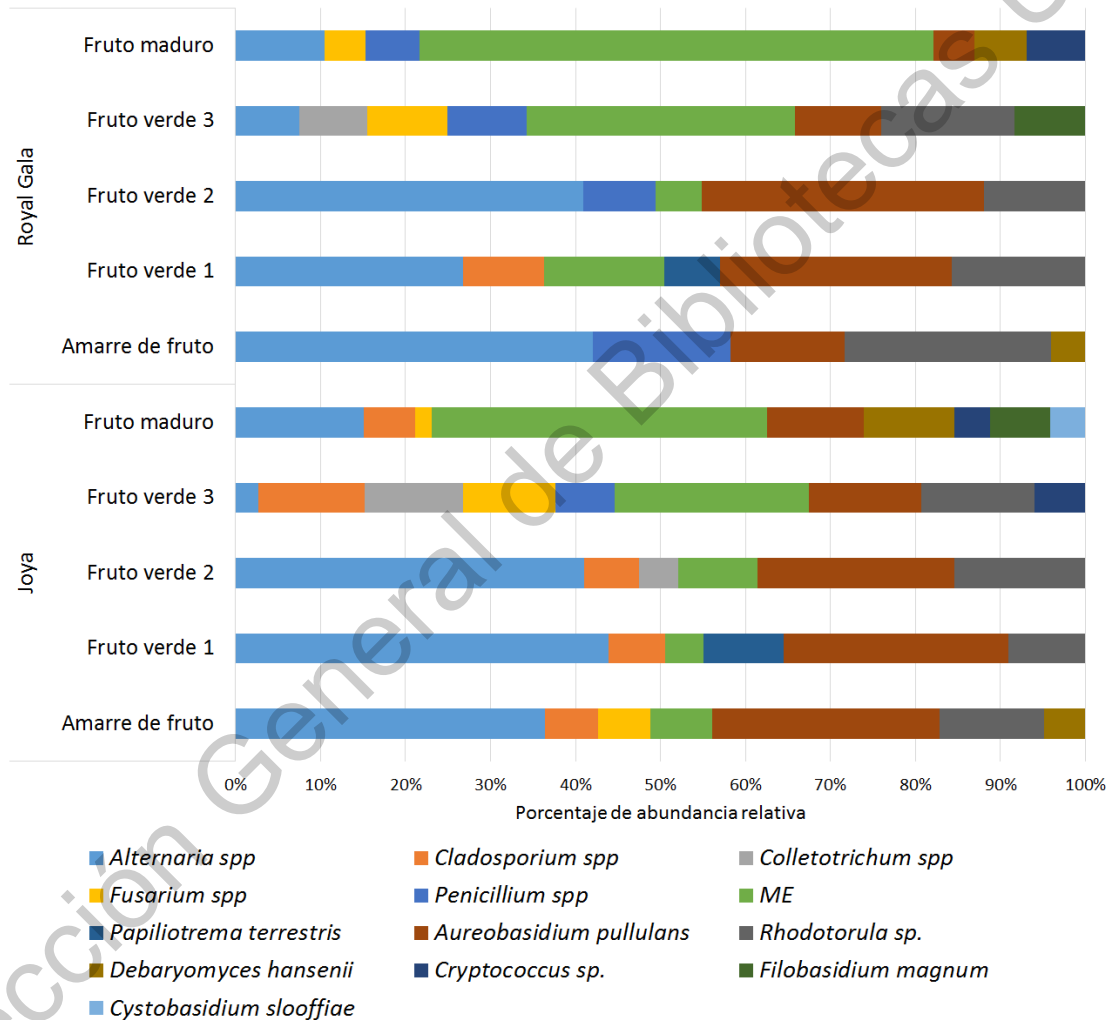


Figura 10. Distribución y abundancia de hongos y levaduras identificadas en las variedades ‘Joya’ y ‘Royal Gala’ en el año 2017 en las cinco etapas del desarrollo del fruto.

En el segundo año de colecta se recuperaron un total de 1479 aislados de levaduras y 2832 aislados de hongos filamentosos de las variedades ‘Joya’, ‘Royal Gala’ y ‘Golden Delicious’. Los aislados de levaduras se clasificaron en 15 morfotipos de levaduras, pertenecientes a 7 géneros: *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Naganishia*, *Papiliotrema* y *Vishniacozyma* (Figura 11; Anexo V). Siendo el género más abundante y presente en todas las muestras de ese año, *Debaryomyces* (31.7 % AR), esto coincide con lo encontrado en frutos de la variedad de manzano ‘Pinova’ (Angeli y col., 2019). Los dos géneros de levaduras que resultaron ser más abundantes para cada año (*Aureobasidium* y *Debaryomyces*), han sido reportados como antagonistas de los principales patógenos poscosecha de la manzana *P. expansum* y *Monilinia fructicola* (Agirman y Erten, 2020; Czarnecka y col., 2019). Esta capacidad antagonista podría estar relacionada, de igual manera, con su capacidad de permanecer de una forma más efectiva asociada a la superficie de la manzana que otras levaduras.

Los aislados de hongos filamentosos se lograron clasificar en 72 morfotipos, quedando el 37.3 % de los aislados sin asignación de género, debido a que no se logró obtener esporas en los cultivos. Los morfotipos correspondieron a 7 géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* y *Penicillium*, siendo *Cladosporium* el género más abundante (34.7 % AR) y presente en todas las etapas y variedades del fruto (Figura 11). Esto coincide con los resultados obtenidos por Bösch y col. (2021) en las variedades ‘Ariane’, ‘Otava’ y ‘Topaz’, en donde *Cladosporium* es uno de los hongos más abundantes en los frutos maduros. Además, se ha encontrado que algunas especies como *Cladosporium cladosporoides*, tienen el potencial de antagonizar en campo a patógenos como *Venturia inaequalis*, agente causal de la roña del manzano, disminuyendo el daño en fruto y hojas (Köhl y col., 2015).

En ambos años, se logró detectar cepas pertenecientes a *Penicillium*, uno de los géneros más importantes que causa pudriciones de la manzana en etapas poscosecha (Janisiewicz y col., 2016). Interesantemente, en ambos años *Penicillium* fue aislado en las últimas etapas de desarrollo, incluyendo la etapa de fruto maduro, en la cual el fruto es más susceptible a este patógeno (Figuras 10 y 11). Esto coincide con lo reportado por Ortega-Beltran y col. (2018) en frutos de almendro, quienes observaron que *Aspergillus*, uno de los

hongos que infecta los frutos en la etapa poscosecha, estaba presente con más frecuencia en los frutos maduros. Esto puede estar relacionado con los compuestos presentes en los frutos, principalmente los azúcares que van aumentando conforme el desarrollo de los frutos incluyendo la manzana (Li y col., 2012; Padgett y Morrison, 1990).

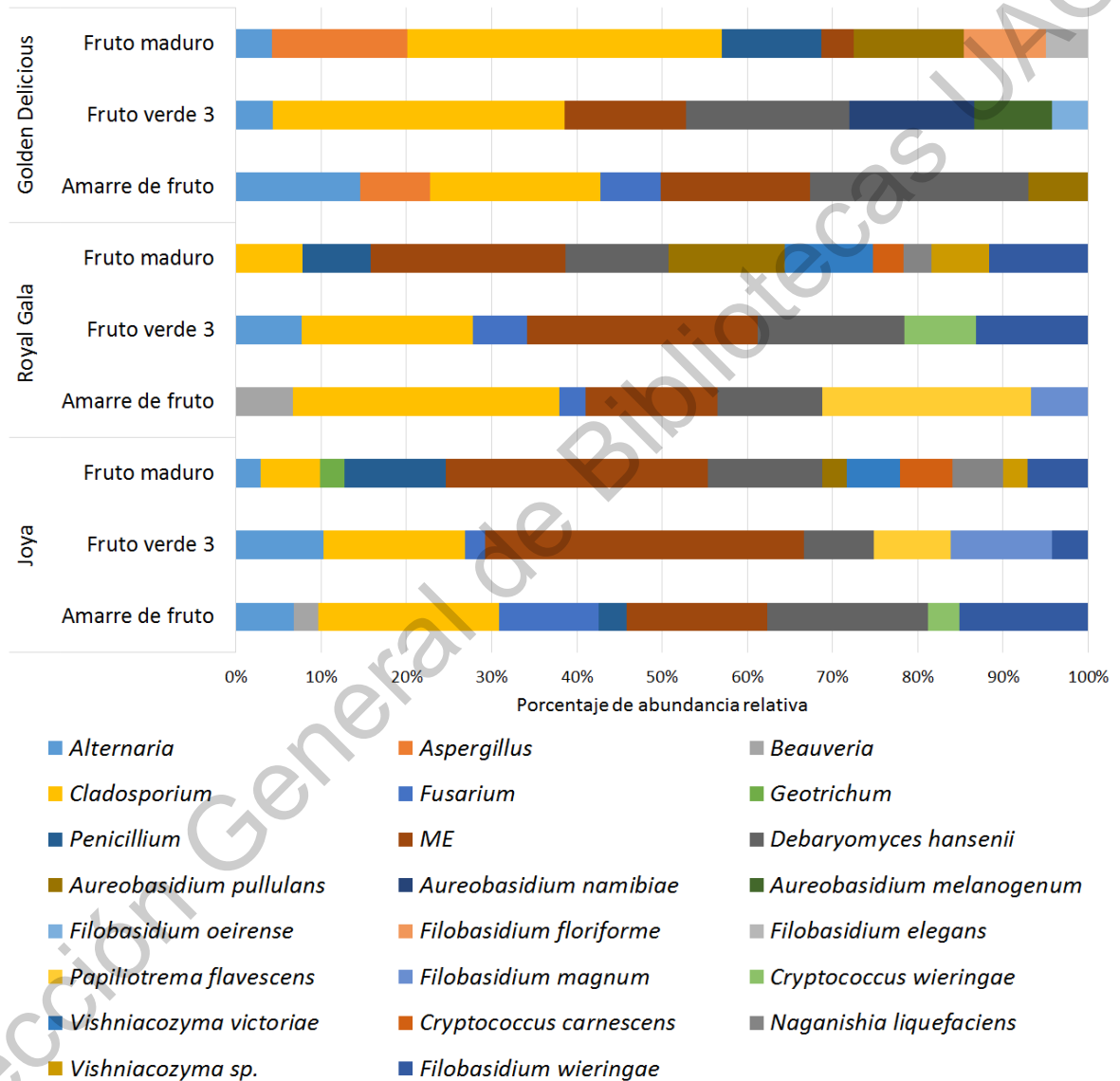


Figura 11. Distribución y abundancia de hongos y levaduras identificadas en las variedades ‘Joya’, ‘Royal Gala’ y ‘Golden Delicious’ en el año 2018 en las tres etapas del desarrollo del fruto.

El análisis de PERMANOVA reveló que la composición fúngica detectada en el año 2017 estuvo influenciada principalmente por la etapa de desarrollo ($R^2=0.61$, $P<0.001$), explicando el 61 % de la variación observada. Además, se observó que las primeras tres etapas de desarrollo son más similares entre sí y se separan de la etapa de fruto verde 3 y fruto maduro, datos similares a lo encontrado para la población de bacterias del mismo año (Figura 12). Para el año 2018, el análisis de PERMANOVA mostró que la composición fúngica detectada estaba influenciada principalmente por la etapa de desarrollo ($R^2=0.39$, $P<0.001$), la cual explica un 39 % de la variación observada, seguido por la variedad ($R^2=0.14$, $P<0.001$) y la interacción etapa-variedad ($R^2=0.25$, $P<0.001$), coincidiendo con lo encontrado para bacterias en el mismo año (Figura 13). El efecto de la etapa de desarrollo del fruto sobre las poblaciones fúngicas ya ha sido reportado en otras plantas como en la palma datilera (Piombo y col., 2020) y la vid (Carmichael y col., 2017). Las posibilidades que abordan los autores de dichos trabajos, para explicar los cambios observados son los cambios fisiológicos y bioquímicos que los frutos sufren durante la maduración del fruto, lo cual también podrían estar relacionados con los cambios que observamos en manzana.

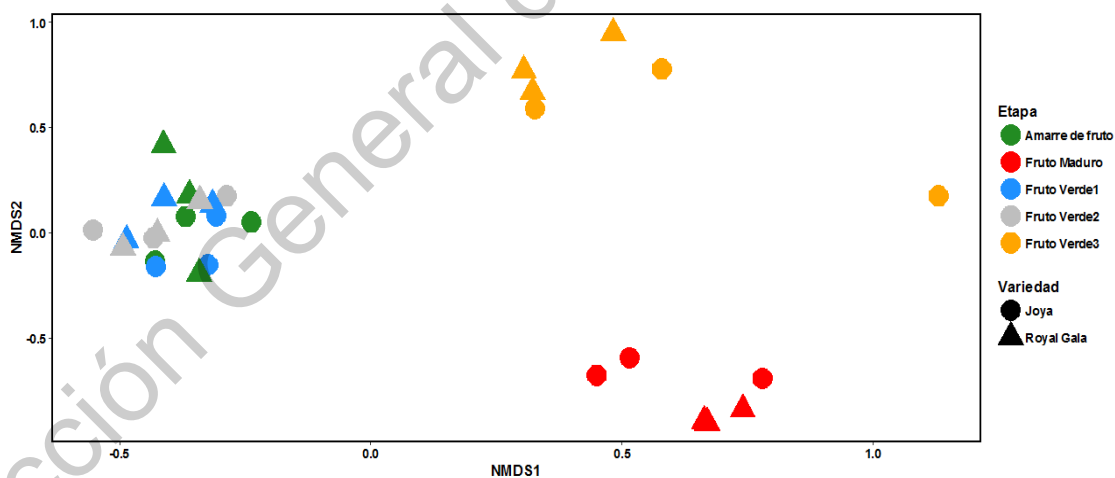


Figura 12. Agrupación de NMFDS de poblaciones fúngicas (hongos y levaduras) del año 2017 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo. Variedad ‘Joya’ (círculos) y ‘Royal Gala’ (triángulos); en las etapas de amarre de fruto (círculos y triángulos verdes), fruto verde 1 (círculos y triángulos azules), fruto verde 2 (círculos y triángulos grises), fruto verde 3 (círculos y triángulos amarillos) y fruto maduro (círculos y triángulos rojos).

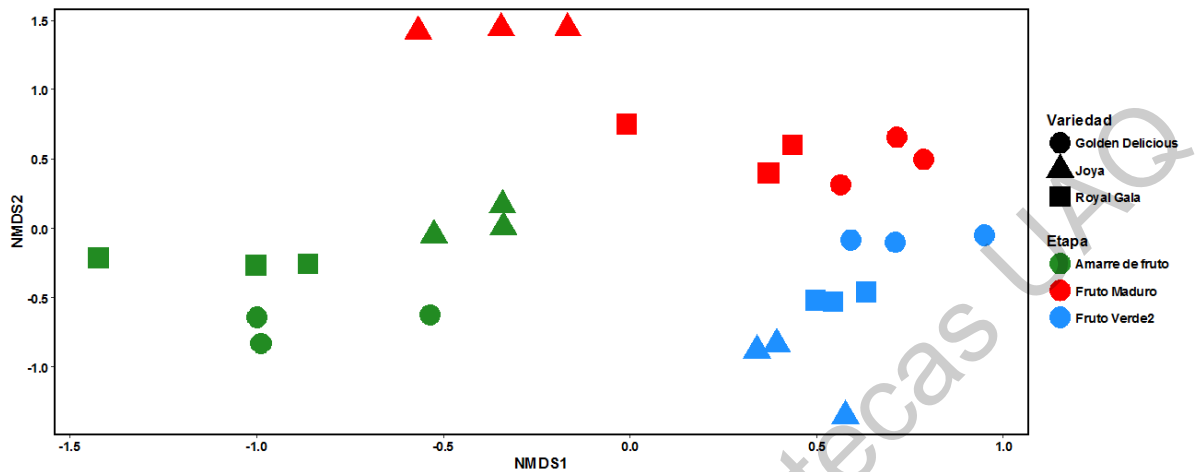


Figura 13. Agrupación de NMSD de poblaciones fúngicas (hongos y levaduras) del año 2018 asociadas a las variedades estudiadas en las diferentes etapas de desarrollo. Variedad ‘Joya’ (triángulos), ‘Royal Gala’ (cuadrados) y ‘Golden Delicious’ (círculos); en las etapas de amarre de fruto (círculos, triángulos y cuadrados verdes), fruto fruto verde 2 (círculos, triángulos y cuadrados azules) y fruto maduro (círculos, triángulos y cuadrados rojos).

Comparando las variedades (‘Joya’ y ‘Royal Gala’) y etapas del fruto (amarre del fruto, fruto verde 3 y fruto maduro) que coincidieron en los muestreos de ambos años, se observó que en el análisis de PERMANOVA de la población fúngica, a diferencia de las bacterias, los tres factores año ($R^2=0.27$, $P<0.001$), etapa ($R^2=0.22$, $P<0.001$) y variedad ($R^2=0.02$, $P<0.001$) tuvieron efecto en la composición de los diferentes aislados fúngicos, explicando en conjunto el 51 % de la variación de los datos (Figura 14). Estos datos coinciden con lo obtenido en uva, donde se muestra que las poblaciones fúngicas presentes en la filósfera tienden a fluctuar por más factores que las poblaciones bacterianas, en donde los efectos que pueden mostrar cambios son el año de muestreo, la variedad, la etapa de desarrollo y el sitio de muestreo (Chou y col., 2018; Cureau y col., 2021).

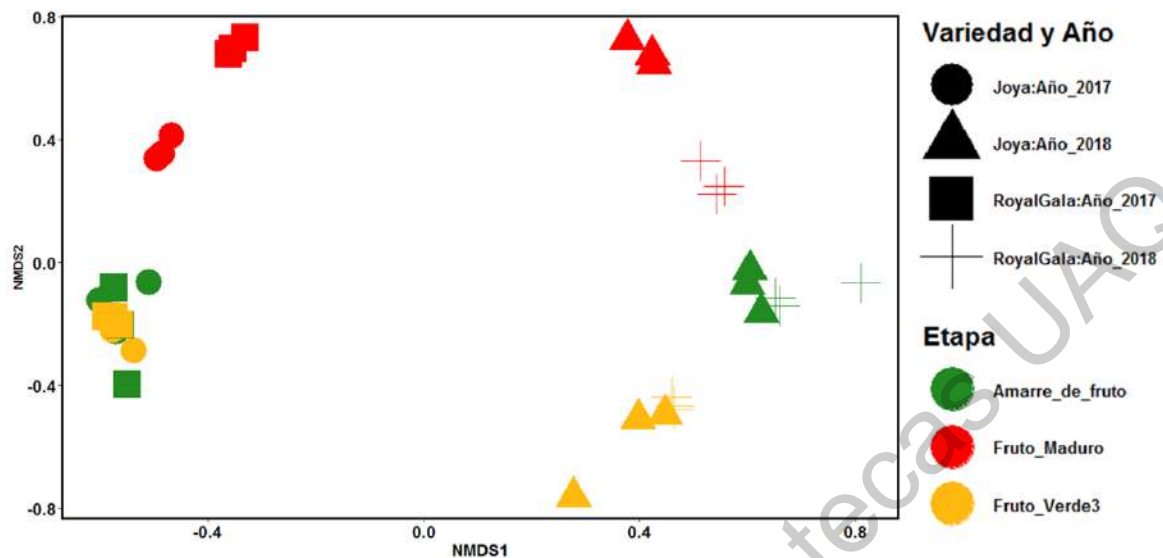


Figura 14. Agrupación de NMDS de hongos del año 2017 y 2018 asociadas a la variedad ‘Joya’ y ‘Royal Gala’; en las etapas de desarrollo. Amarre de fruto (color verde), fruto verde 3 (color amarillo) y fruto maduro (color rojo).

4.1.2 Comunidades microbianas obtenidas por secuenciación masiva

A partir del muestreo del año 2019 se logró obtener el ADN de la fracción microbiana presente en la superficie de la manzana en la etapa de fruto maduro de ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. Mediante secuenciación masiva de amplicones y análisis bioinformático, se determinaron las poblaciones bacterianas y fúngicas. Los resultados de las poblaciones microbianas por población se muestran a continuación.

4.1.2.1 Estructura y diversidad de la población bacteriana

De las muestras procesadas para la población bacteriana, se obtuvieron un total de 953,534 secuencias para la variedad ‘Golden Delicious’ y 942,190 en la variedad ‘Joya’. Mediante el análisis bioinformático con QIIME se clasificaron en unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Se encontraron 51 OTUs para la variedad ‘Golden Delicious’ y 58 en la variedad ‘Joya’, no encontrando diferencias significativas entre las dos variedades (Tabla

6). Las curvas de rarefacción mostraron que los OTUs detectados en las muestras, alcanzaron la saturación (asíntota) (Anexo VI). Esta saturación se alcanza cuando un incremento en el número de secuencias no da como resultado un incremento adicional en el número de OTUs, lo cual indica que el esfuerzo de muestreo fue suficiente por lo que los datos obtenidos son adecuados para el análisis de poblaciones bacterianas (Hong y col., 2019; Vepškaitė-Monstavičė y col., 2018). Los índices de diversidad mostraron que tanto a nivel de familia como de géneros bacterianos la mayor abundancia (índice de Simpson) y homogeneidad (índice de Shannon) se presentó en la variedad ‘Joya’ (Tabla 5). El impacto de la variedad en los cambios de diversidad bacteriana en las poblaciones epífitas ha sido reportada en diversos órganos de la planta como hojas (Laforest-Lapoint y col., 2016), flores (Hayes y col., 2020) y frutos, como es el caso de uvas (Singh y col., 2018). Para manzano, si en embargo, hasta el momento no se han descrito estudios similares en poblaciones microbianas entre variedades de manzana. Estas diferencias entre variedades se ha reportado que podrían estar relacionadas a los cambios en nutrientes presentes en el exterior de la planta, los cuales pueden incluir desde micronutrientes como el hierro (Thapa y col., 2017), y macronutrientes como ácidos orgánicos (Ling y col., 2011) y azúcares (Han y col., 2016), además de fitohormonas (Augimeri y col., 2015); los cuales se han observado que son diferentes entre las variedades amarillas y rojas de manzana (Alberti y col., 2017; Stephan y col., 1999; Zhang y col., 2010).

Tabla 6. Diversidad bacteriana estimada basada en la secuenciación de amplicones en la etapa de fruto maduro de las dos variedades estudiadas.

Variedad	Número OTUs	Índice de Shannon (H')		Índice de Simpson	
		Familia	Género	Familia	Género
‘Golden Delicious’	51 ± 3a	0.77 ± 0.2b	1.1 ± 0.2b	0.31 ± 0.1b	0.45 ± 0.1b
‘Joya’	58 ± 6a	1.7 ± 0.3a	1.94 ± 0.2a	0.7 ± 0.07a	0.72 ± 0.04a

Los valores representan el promedio de tres repeticiones; los valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey’s, $p < 0.05$).

Los OTUs obtenidos a partir de cada variedad se agruparon a nivel de familia y género de los cuales 47 estuvieron presentes en ambas variedades, es decir el 74.6 % de los taxones

bacterianos detectados se compartió entre las dos variedades de manzana. Dentro de los OTUs específicos para cada una de las variedades, 15 fueron exclusivos de la variedad ‘Joya’ y solo uno en la variedad ‘Golden Delicious’. El análisis de PERMANOVA reveló que la composición de OTUs bacterianos detectada estuvo influenciada principalmente por la variedad de manzana ($R^2=0.44$, $P<0.05$), explicando el 44 % de la variación observada (Figura 15). Estos datos refuerzan lo encontrado en los índices de diversidad, donde la variedad ‘Joya’ tiene los mayores valores y lo cual podría estar asociado al microambiente generado en la parte externa del fruto.

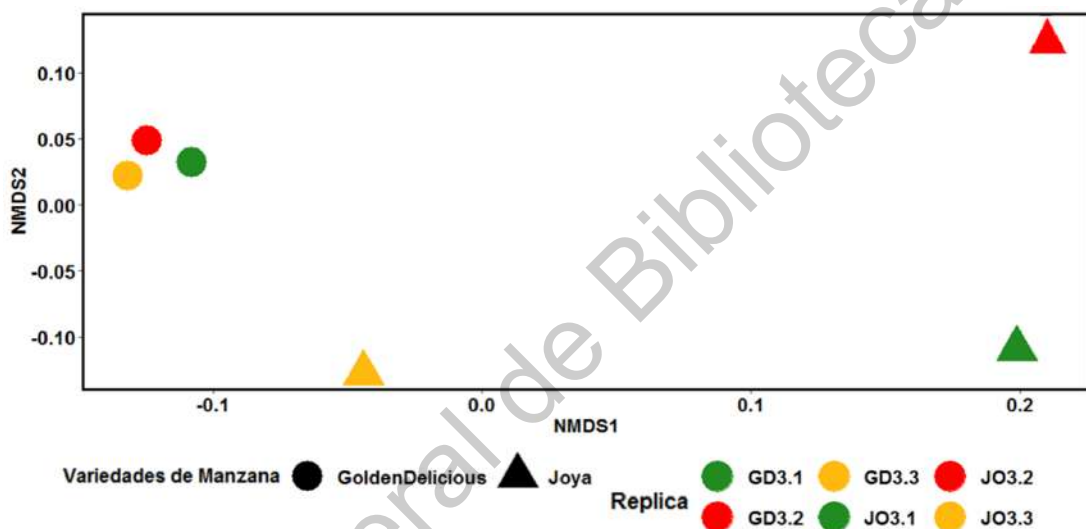
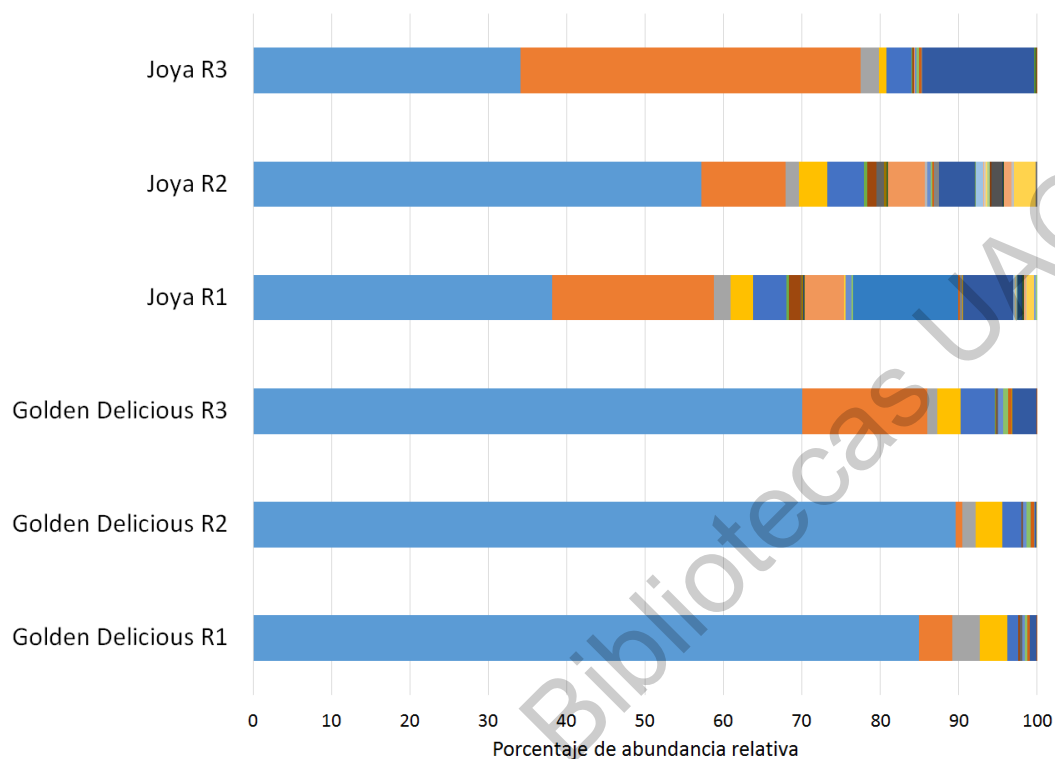


Figura 15. Agrupación de NMDS de poblaciones bacterianas del año 2019 asociadas al fruto en las variedades estudiadas. ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos); en la etapa de fruto maduro, en las repeticiones biológicas estudiadas (1-3).

Con base en la identificación de los OTUs, se observó que las familias que predominan en ambas variedades fueron *Oxalobacteraceae* (‘Golden Delicious’ = 81.5 %AR y ‘Joya’ = 43.1 %AR) y *Pseudomonadaceae* (‘Golden Delicious’ = 16.9 %AR y ‘Joya’ = 24.9 %AR) (Figura 16). A nivel de género los dominantes fueron un género no identificado de la familia *Oxalobacteraceae* (‘Golden Delicious’ = 72.3 %AR y ‘Joya’ = 41.6 %AR) y *Pseudomonas* (‘Golden Delicious’ = 16.9 %AR y ‘Joya’ = 25.7 %AR) (Figura 17).

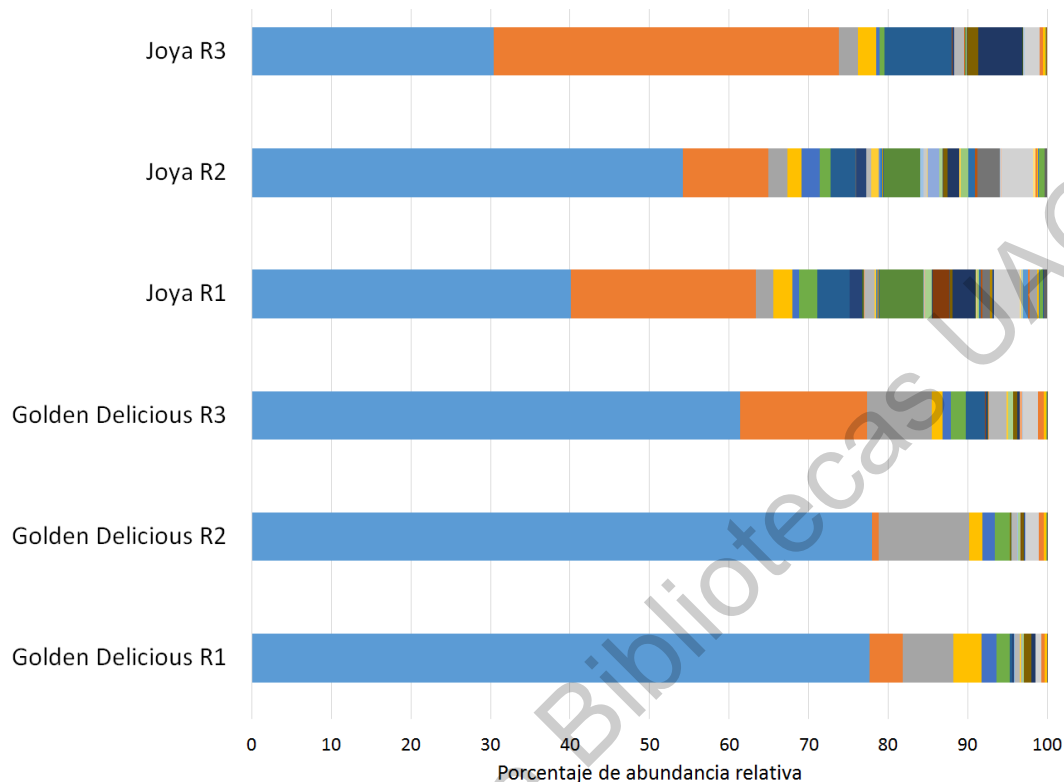
Tanto la familia *Oxalobacteraceae* como la *Pseudomonadaceae* han sido reportadas como familias predominantes en poblaciones bacterianas presentes en la filósfera de plantas (Diskin y col., 2017; Allard y col., 2020), incluyendo el manzano (Yashiro y col., 2012; Ottesen y col., 2016; Arrigoni y col., 2018). En específico en frutos de manzano se ha reportado la presencia de *Pseudomonas* como un género presente de forma constante y abundante en los frutos aun cuando se comparan entre sistemas de cultivo convencionales y orgánicos (Wassermann y col., 2019) y en manzanas de distintos sitios de muestreo (Angeli y col., 2019; Vepškaitė-Monstavičė y col., 2018). Los datos obtenidos en el presente estudio, reafirman, que este género está altamente asociado a los frutos de manzana.

Como se esperaba, al analizar la presencia de los géneros bacterianos con técnicas moleculares, se encontró mayor diversidad de géneros que lo obtenido por técnicas de cultivo. En particular se observó que el género *Bacillus* aparece como uno de los géneros dominantes como en los dos años anteriores de muestreo en medio de cultivo; sin embargo, si está presente en ambas variedades. *Bacillus* es fácil de cultivar y por ello parece ser abundante con técnicas de cultivo, en cambio suele observarse en menos proporción con métodos metagenómicos. Estos resultados coinciden con lo encontrado en manzanas de las variedades ‘Ariane’, ‘Otava’, y ‘Topaz’, donde se observó que la mayor diversidad de géneros de bacterias se obtuvo mediante métodos moleculares (Bösch y col., 2020). Por otro lado, en hojas de del cultivar de manzano ‘Gala’, se observó que las actinobacterias solo fueron encontradas mediante técnicas de cultivo (Yashiro y col., 2010). Al igual que nuestros resultados, los trabajos mencionados, muestran la importancia del análisis de diversidad bacteriana complementado los métodos tradicionales y moleculares, para que desde un enfoque combinado se comprenda la diversidad total asociada a la manzana.



- | | | |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>Oxalobacteraceae</i> | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Cytophagaceae</i> |
| <i>Sphingomonadaceae</i> | <i>Microbacteriaceae</i> | <i>Acidobacteriaceae</i> |
| <i>Geodermatophilaceae</i> | <i>Kineosporiaceae</i> | <i>Micrococcaceae</i> |
| <i>Nakamurellaceae</i> | <i>Nocardioideaceae</i> | <i>Bacillaceae</i> |
| <i>Paenibacillaceae</i> | <i>Enterococcaceae</i> | <i>Lactobacillaceae</i> |
| <i>Clostridiaceae</i> | <i>Methylobacteriaceae</i> | <i>Methylocystaceae</i> |
| <i>Rhodobacteraceae</i> | <i>Acetobacteraceae</i> | <i>Cystobacterineae</i> |
| <i>Aeromonadaceae</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Moraxellaceae</i> |
| <i>Koribacteraceae</i> | <i>Solibacteraceae</i> | <i>Nocardiaceae</i> |
| <i>Sanguibacteraceae</i> | <i>Porphyromonadaceae</i> | <i>Lachnospiraceae</i> |
| <i>Ruminococcaceae</i> | <i>Veillonellaceae</i> | <i>Hyphomicrobiaceae</i> |
| <i>Rhizobiaceae</i> | <i>Rhodospirillales</i> | <i>Burkholderiaceae</i> |
| <i>Deinococcaceae</i> | <i>Acidobacteriales unidentified</i> | <i>Acidimicrobiales unidentified</i> |
| <i>Actinomycetales unidentified</i> | <i>Clostridiales unidentified</i> | <i>Gemmatimonadales unidentified</i> |
| <i>Alphaproteobacteria unidentified</i> | <i>Betaproteobacteria unidentified</i> | <i>Entomoplasmatales unidentified</i> |

Figura 16. Distribución y abundancia taxonómica a nivel de familia de los grupos bacterianos asociados a la superficie de los frutos maduros de las variedades estudiadas en el año 2019.



- | | | |
|---|--|--|
| ■ <i>Oxalobacteraceae</i> unidentified | ■ <i>Pseudomonas</i> | ■ <i>Janthinobacterium</i> |
| ■ <i>Hymenobacter</i> | ■ <i>Sphingomonas</i> | ■ <i>Sphingomonadacea</i> unidentified |
| ■ <i>Enterobacteriaceae</i> unidentified | ■ <i>Terriglobus</i> | ■ <i>Candidatus</i> |
| ■ <i>Modestobacter</i> | ■ <i>Kineococcus</i> | ■ <i>Curtobacterium</i> |
| ■ <i>Frigoribacterium</i> | ■ <i>Rathayibacter</i> | ■ <i>Salinibacterium</i> |
| ■ <i>Arthrobacter</i> | ■ <i>Rhodococcus</i> | ■ <i>Friedmanniella</i> |
| ■ <i>Sanguibacter</i> | ■ <i>Dysgonomonas</i> | ■ <i>Spirosoma</i> |
| ■ <i>Bacillus</i> | ■ <i>Paenibacillus</i> | ■ <i>Enterococcus</i> |
| ■ <i>Lactobacillus</i> | ■ <i>Dorea</i> | ■ <i>Lachnospira</i> |
| ■ <i>Phascolarctobacterium</i> | ■ <i>Rhodoplanes</i> | ■ <i>Methylobacterium</i> |
| ■ <i>Agrobacterium</i> | ■ <i>Paracoccus</i> | ■ <i>Burkholderia</i> |
| ■ <i>Massilia</i> | ■ <i>Erwinia</i> | ■ <i>Klebsiella</i> |
| ■ <i>Pantoea</i> | ■ <i>Serratia</i> | ■ <i>Yersinia</i> |
| ■ <i>Acinetobacter</i> | ■ <i>Deinococcus</i> | ■ <i>Koribacteraceae</i> unidentified |
| ■ <i>Acidobacteriales</i> unidentified | ■ <i>Acidimicrobiales</i> unidentified | ■ <i>Actinomycetales</i> unidentified |
| ■ <i>Clostridiales</i> unidentified | ■ <i>Gemmatimonadales</i> unidentified | ■ <i>Alphaproteobacteria</i> unidentified |
| ■ <i>Betaproteobacteria</i> unidentified | ■ <i>Entomoplasmatales</i> unidentified | ■ <i>Microbacteriaceae</i> unidentified |
| ■ <i>Nakamurellaceae</i> unidentified | ■ <i>Nocardioideae</i> unidentified | ■ <i>Clostridiaceae</i> unidentified |
| ■ <i>Ruminococcaceae</i> unidentified | ■ <i>Methylocystaceae</i> unidentified | ■ <i>Rhodobacteraceae</i> unidentified |
| ■ <i>Acetobacteraceae</i> unidentified | ■ <i>Rhodospirillaceae</i> unidentified | ■ <i>Cystobacterineae</i> unidentified |
| ■ <i>Aeromonadaceae</i> unidentified | ■ <i>Moraxellaceae</i> unidentified | ■ <i>Acidobacteriaceae</i> unidentified |

Figura 17. Distribución y abundancia taxonómica a nivel de género de los grupos bacterianos asociados a la superficie de los frutos maduros de las variedades estudiadas en el año 2019.

4.1.2.2 Inferencia funcional de las poblaciones bacterianas

Para entender la funcionalidad de las poblaciones bacterianas presentes en las dos variedades estudiadas se realizó el análisis mediante el algoritmo de PICRUSt para predecir los perfiles metabólicos. Este es un algoritmo que predice los metagenomas a partir de la información de secuenciación de amplicones de 16S, mediante una base de datos de genomas de referencia (Greengenes), para posteriormente predecir la composición funcional de los metagenomas mediante una clasificación en bases de datos sobre función de genes, por ejemplo la “Enciclopedia de genes y genomas de Kioto” (KEGG, por sus siglas en inglés) (Langille y col., 2013). Este algoritmo nos permitió hacer algunas inferencias sobre las posibles funciones más representadas en las poblaciones obtenidas de ambas variedades de manzana, las cuales fueron las relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, metabolismo secundario y del procesamiento de información ambiental. Desde luego que esta metodología debe utilizarse con cuidado, dada la variabilidad interespecífica que se sabe ocurre en bacterias.

a) Metabolismo de carbohidratos: En análisis de PERMANOVA de las vías relacionadas al metabolismo de carbohidratos se encontró que la composición de dichas vías estuvo influenciada principalmente por la variedad de manzana ($R^2=0.24$, $P<0.05$) y la réplica biológica ($R^2=0.58$, $P<0.05$) explicando en conjunto el 82 % de la variación observada (Figura 18a). El análisis de ANOVA mostró que las vías de “degradación de glucosaminoglicanos”, “degradación de glicanos” y “metabolismos de carbohidratos” fueron las que presentaron diferencias significativas entre las variedades, siendo mayor estas actividades en la variedad de ‘Joya’ (Figura 18b).

b) Metabolismo de aminoácidos: El análisis de PERMANOVA mostró que la composición de dichas vías estuvo influenciada principalmente por la réplica biológica ($R^2=0.70$, $P<0.01$) explicando el 70 % de la variación observada (Figura 19a). Debido a esto el análisis de ANOVA mostró que la única vía con diferencia significativa entre las variedades, fue la vía del “metabolismo de D-arginina y D-ornitina”, siendo mayor en la variedad de ‘Joya’ (Figura 19b).

c) Metabolismo secundario: El análisis de PERMANOVA mostró que la composición de dichas vías estuvo influenciada principalmente por la variedad de manzana ($R^2=0.73$, $P<0.01$) explicando el 73 % de la variación observada (Figura 20a). El análisis de ANOVA mostró que en este tipo de metabolismo fue donde se encontraron más vías con diferencia significativa entre las variedades, y mostrando nuevamente que los valores mayores estuvieron en la variedad ‘Joya’ (Figura 20b).

d) Metabolismo del procesamiento de información ambiental: En este caso no se encontró efecto ni de la variedad o replica biológica en la composición de dichas vías (Figura 21a). Por su parte el análisis de ANOVA mostró diferencias significativas de algunas vías entre las variedades, encontrando los mayores valores de las vías “vía de señalización de calcio”, “sistema de secreción” y “sistema de secreción bacteriana” en la variedad ‘Golden Delicious’ y menores en las vías de “sistemas de fosfotransferasas” y “ritmo circadiano de la planta” (Figura 21b).

Estos cambios observados a nivel del potencial metabólico de las poblaciones bacterianas, se ha descrito a nivel de la rizósfera de manzanos, en donde Wang y col. (2020), observaron que la composición de las poblaciones bacterianas fueron diferentes entre la variedad roja ‘Fuji’ y la variedad amarilla ‘Golden Delicious’, siendo mayor en la variedad roja, lo cual impacto en las diferencias del potencial funcional de metabolismo bacteriano asociada a cada variedad. En nuestro estudio, observamos que existen más OTUs asociados de forma particular a la variedad roja que a la variedad amarilla, lo cual al igual que el trabajo reportado, podría explicar las diferencias en el potencial funcional de las poblaciones, encontrando que en algunas vías tiende a ser mayor en ‘Joya’. Por otra parte, las clasificaciones de metabolismos que mostraron ser más abundantes, coinciden con las encontradas en otros estudios de poblaciones bacterianas asociadas a plantas, en particular el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, muy posiblemente por la interacción que tienen estas poblaciones con los exudados de filósfera y rizósfera, los cuales están constituidos principalmente por estos tipos de metabolitos (Copeland y col., 2015; Comeau y col., 2020; Cui y col., 2019; Sasse y col., 2018).

En conjunto los resultados obtenidos mediante esta predicción, permiten conocer un poco más sobre la funcionalidad de las poblaciones bacterianas asociadas a las manzanas

estudiadas, lo cual es la base para continuar con el estudio de su potencial en beneficio de este producto agrícola.

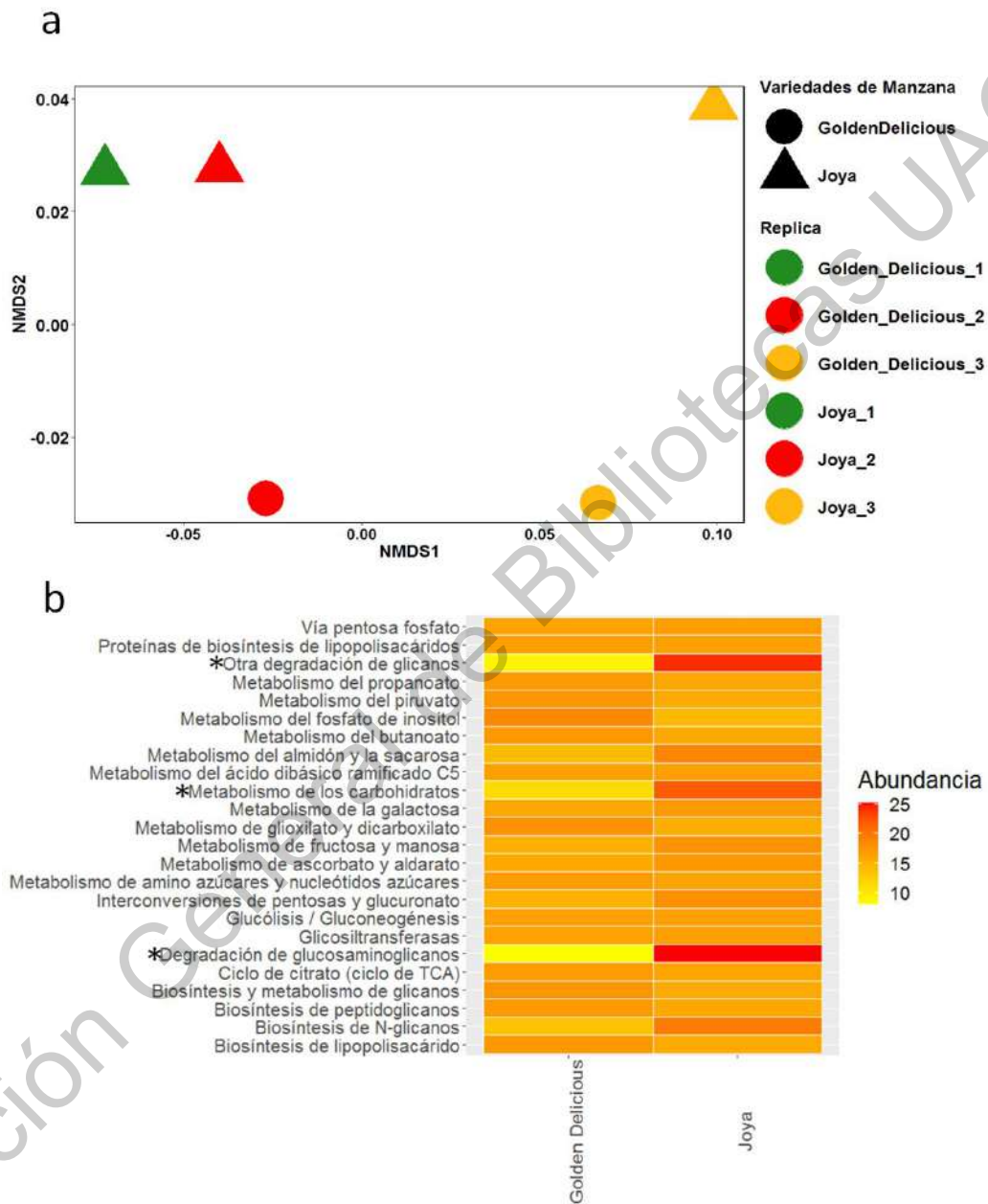


Figura 18. Análisis de las vías relacionadas con metabolismo de carbohidratos predichas por PICRUST en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. a) Agrupación de NMDS de las vías predichas en la variedad ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos), en las repeticiones biológicas estudiadas (1-3). b) Mapa de calor de las vías de metabolismo de carbohidratos,

las vías con asterisco (*) representan diferencias estadísticas entre las variedades (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

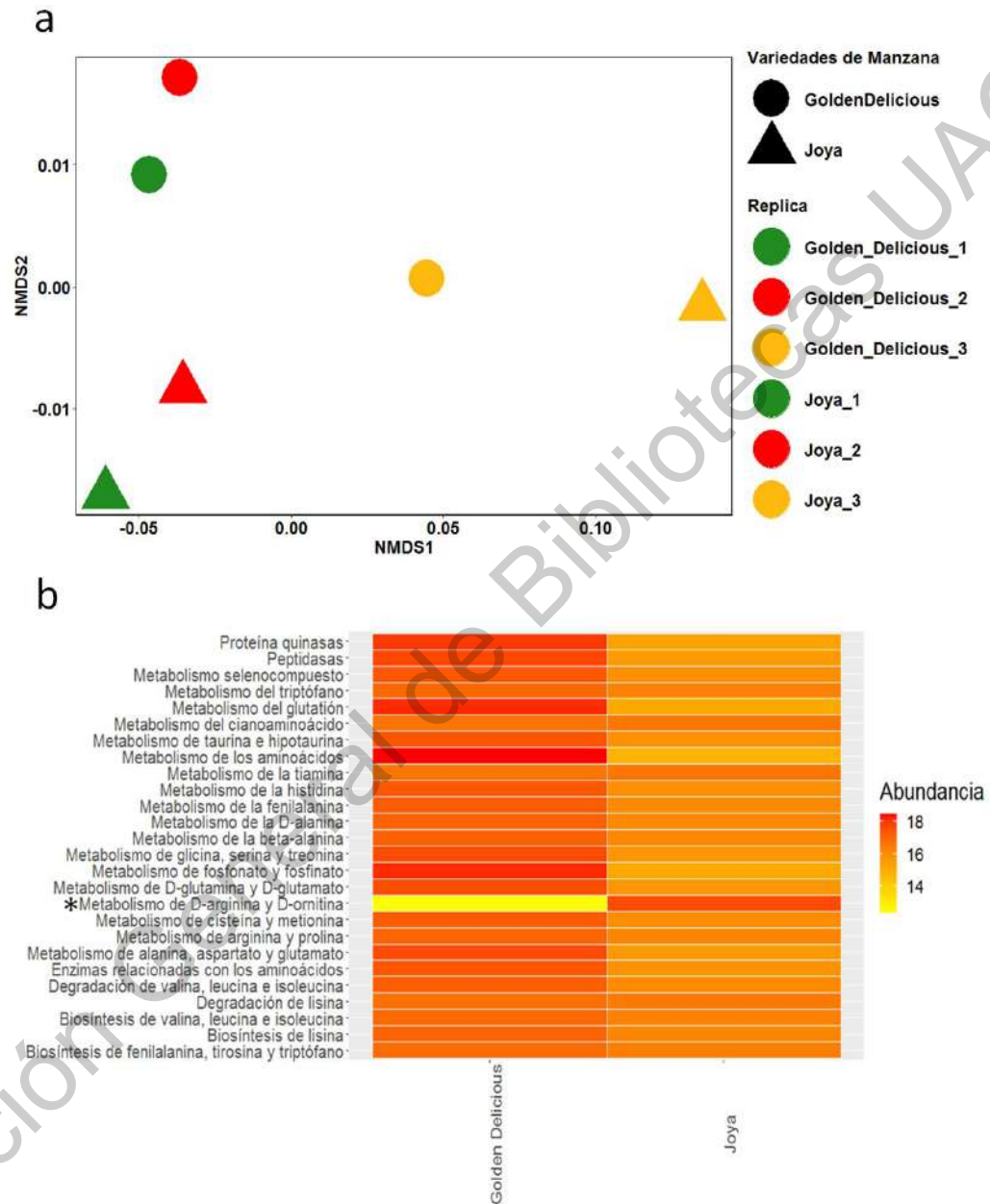


Figura 19. Análisis de las vías relacionadas con metabolismo de aminoácidos predichas por PICRUST en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. a) Agrupación de NMDS de las vías predichas en la variedad ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos), en las repeticiones biológicas estudiadas (1-3). b) Mapa de calor de las vías de metabolismo de aminoácidos, las vías con

asterisco (*) representan diferencias estadísticas entre las variedades (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

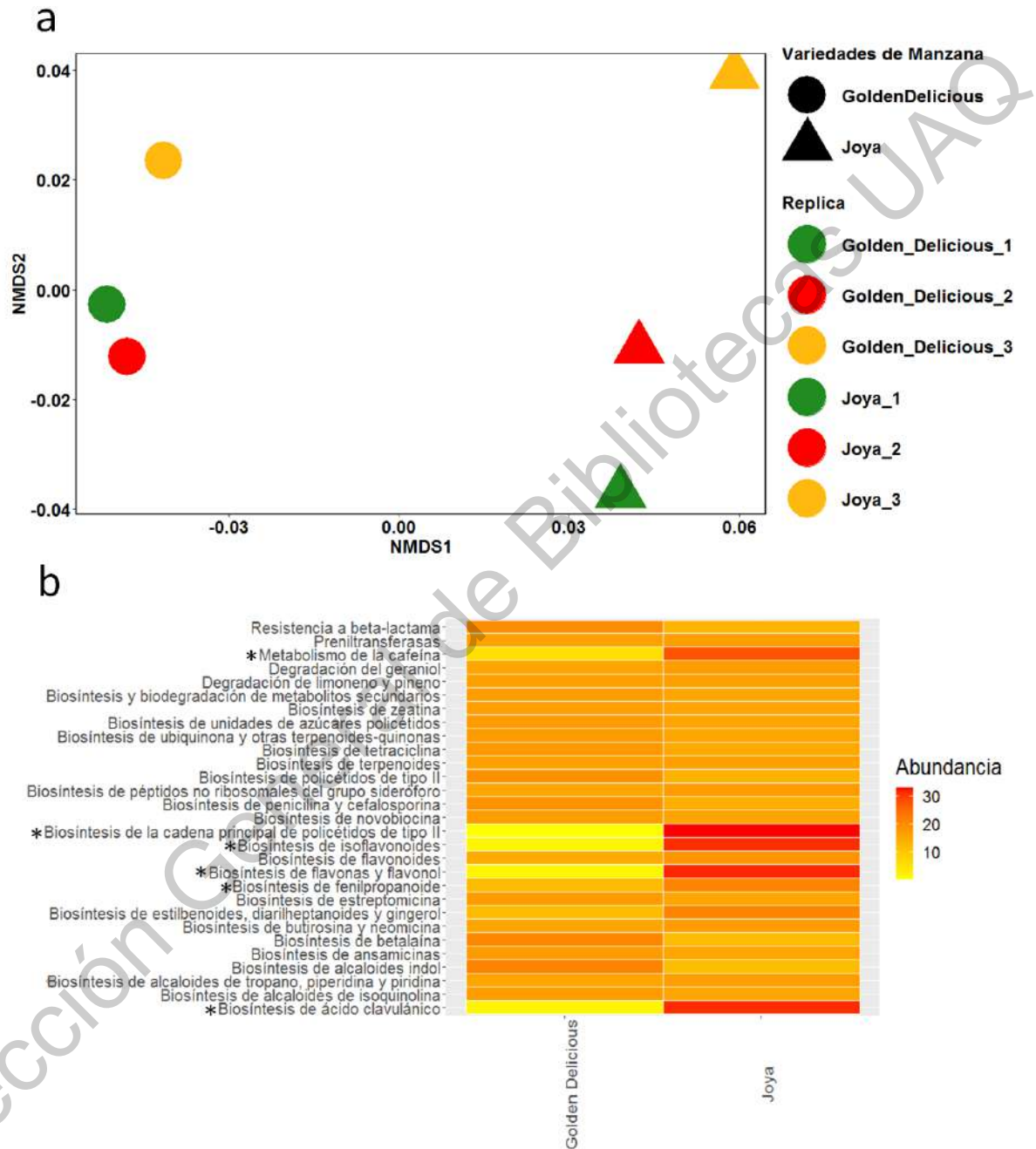


Figura 20. Análisis de las vías relacionadas con metabolismo secundario predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. a) Agrupación de NMDS de las vías predichas en la variedad ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos), en las repeticiones biológicas estudiadas

(1-3). b) Mapa de calor de las vías de metabolismo secundario, las vías con asterisco (*) representan diferencias estadísticas entre las variedades (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

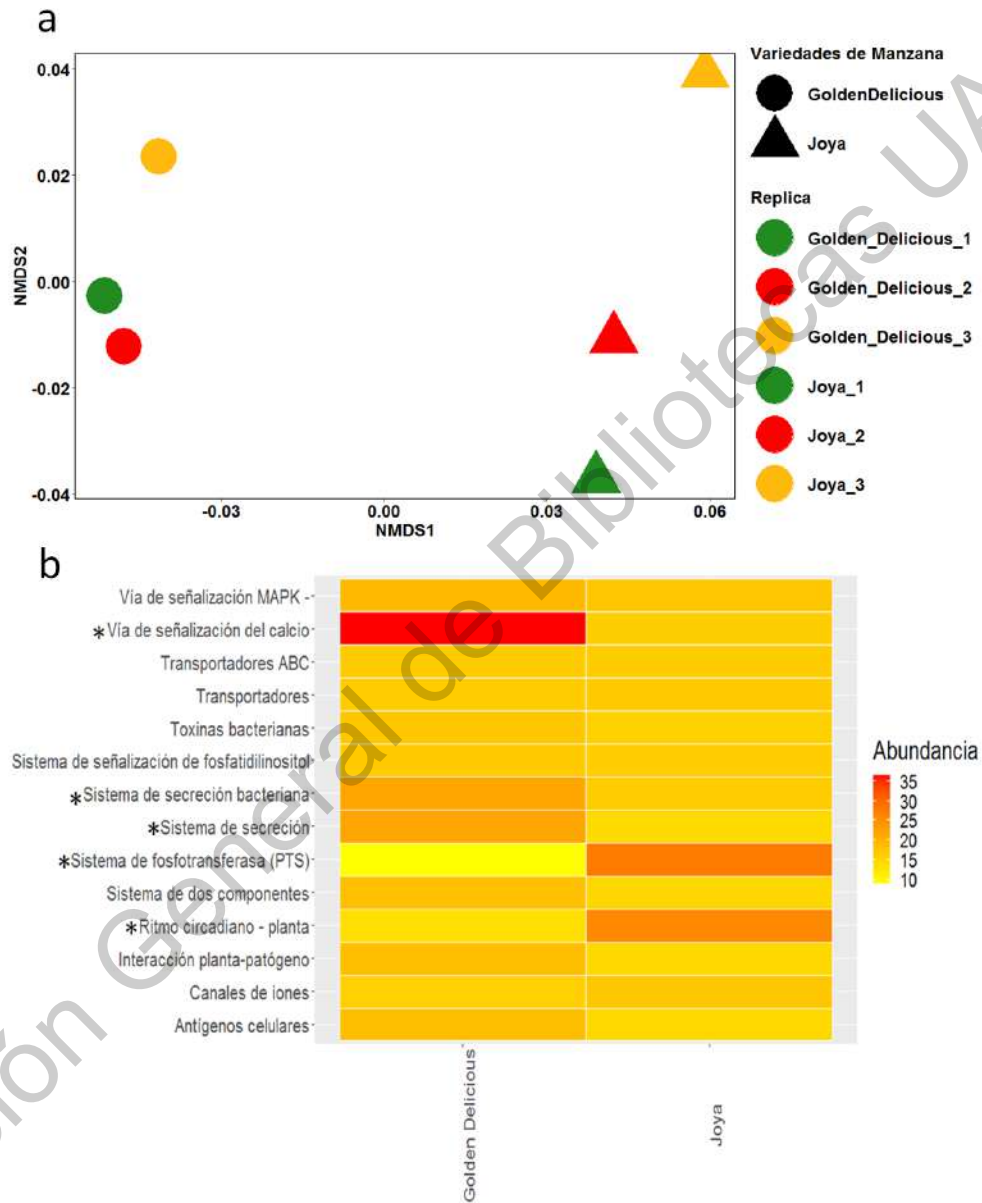


Figura 21. Análisis de las vías relacionadas con metabolismo del procesamiento de información ambiental predichas por PICRUSt en las poblaciones bacterianas presentes en el fruto maduro de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. a) Agrupación de NMDS de las vías predichas en la variedad ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos), en las repeticiones biológicas estudiadas (1-3). b) Mapa de calor de las

vías de metabolismo del procesamiento de información ambiental, las vías con asterisco (*) representan diferencias estadísticas entre las variedades (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

4.1.2.1 Población fúngica

En los análisis para la determinación de las poblaciones fúngicas, se obtuvieron un total de 1, 324, 698 secuencias para la variedad 'Golden Delicious' y 1, 403, 862 para la variedad 'Joya'. Estas secuencias se clasificaron en 40 OTUs para ambas variedades (Tabla 7). Las curvas de rarefacción mostraron, que al igual que las poblaciones bacterianas en todas las muestras los OTUs fúngicos detectados alcanzaron la saturación (asíntota) (Anexo VI). Los índices de diversidad calculados a nivel de familia y géneros fúngicos no mostraron diferencias entre las variedades estudiadas (Tabla 7). El análisis de PERMANOVA coincidió con los datos de diversidad, donde no se encontró ningún efecto significativo en la composición de OTUs fúngicos debido a la variedad o la repetición biológica ($P > 0.05$). Las comparaciones de las poblaciones fúngicas epífitas entre diferentes variedades de manzana no se han reportado hasta el momento. Sin embargo, los enfoques que si se han abordado son la comparación de este tipo de poblaciones entre una misma variedad de manzana en diferentes sitios (Vepškaitė-Monstavičė y col., 2018), sistemas de cultivo (Shen y col., 2017), el tipo de almacenamiento (Shen y col., 2018) y tratamiento poscosecha (Abdelfattah y col., 2020; Bösch y col., 2021). En todos los casos, se observó un cambio en la diversidad y composición de las poblaciones fúngicas con base en el factor que se evaluó, encontrando que tanto el sitio de muestreo, sistema de cultivo, almacenamiento y tratamiento poscosecha tienen un efecto en las poblaciones fúngicas. En nuestro estudio, no se observaron diferencias en la composición y diversidad de las poblaciones fúngicas entre las variedades, probablemente porque la diferenciación sólo alcanzó hasta nivel de género. Esto difiere con lo encontrado en otros frutos, como la uva de vino, donde tanto las poblaciones bacterianas como las fúngicas se ven afectadas por la variedad del fruto (Bokulich y col., 2013).

Tabla 7. Diversidad fúngica estimada basada en la secuenciación de amplicones en la etapa de fruto maduro de las dos variedades estudiadas.

Variedad	Índice de Shannon (H')			Índice de Simpson	
	Númer o OTUs	Familia	Género	Familia	Género
Golden Delicious	40 ± 1a	1.5 ± 0.1a	1.5 ± 0.1a	0.65 ± 0.01a	0.67 ± 0.02a
Joya	40 ± 0a	1.3 ± 0.04a	1.4 ± 0.04a	0.67 ± 0.02a	0.65 ± 0.01a

Los valores representan el promedio de tres repeticiones; los valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey's, $p < 0.05$).

Las familias más abundantes en ambas variedades fueron la familia de hongos filamentosos *Cladosporiaceae* ('Golden Delicious' = 36.5 %AR, 'Joya' = 47.3 %AR) y la familia de hongos levaduriforme *Aureobasidiaceae* ('Golden Delicious' = 42.3 %AR, 'Joya' = 33.7 %AR) (Figura 22). A nivel de género los dominantes fueron *Cladosporium* ('Golden Delicious' = 36.5 %AR, 'Joya' = 47.3 %AR) y *Aureobasidium* ('Golden Delicious' = 42.3 %AR, 'Joya' = 33.7 %AR) (Figura 23). Ambos géneros fueron encontrados mediante técnicas dependientes de cultivo en etapas de fruto maduro en ambas variedades en los años anteriores de muestreo, este dato coincide con los encontrados por Bösch y col. (2021), en donde los géneros *Cladosporium* y *Aureobasidium* fueron los más abundantes de las poblaciones fúngicas epífitas en las tres variedades de manzanas 'Ariane', 'Otava' y 'Topaz'. La dominancia de estos dos géneros también se ha descrito en las poblaciones epífitas de otros frutos, como uva (Bokulich y col., 2013; Carmichael y col., 2017) y mango (Taïbi y col., 2020). Además ambos hongos también se han reportado como géneros abundantes en hojas de manzana de la variedad 'Empire' (Glenn y col., 2015). Estos estudios al igual que el nuestro, muestran que el microambiente que se forma en la filósfera es aprovechado por *Cladosporium* y *Aureobasidium* para colonizar. Interesantemente, ambos géneros se han relacionado con la actividad antagónica contra otros microorganismos. Köhl y col. (2015), demostraron que la cepa *Cladosporium cladosporioides* H39 puede controlar a *Venturia inaequalis* (agente causal de la sarna del manzano) en frutos y hojas de manzano, en

condiciones de campo tanto en un sistema convencional como en sistemas orgánicos. Por otro lado, Mari y col. (2012) encontraron que las cepas *Aureobasidium pullulans* L1 y L8, pueden disminuir el daño por los fitopatógenos *Botrytis cinerea* (pudrición girs), *Colletotrichum acutatum* (pudrición amarga) y *Penicillium expansum* (pudrición azul), en manzanas de la variedad ‘Gala’ en hasta un 89 %, resultado ser cepas muy prometedoras para el control biológico en manzana. Por otro lado, con base en los datos moleculares (‘Golden Delicious’ = 0.02 %AR, ‘Joya’ = 0.004 %AR), se confirmó que el género de *Penicillium*, principal género patógeno de la manzana, estuvo presente en muy baja abundancia. Estos datos coinciden con lo encontrado en otros estudios, donde durante el cultivo de la manzana la abundancia de *Penicillium* es muy baja, y durante el almacenamiento aumenta su abundancia, si las condiciones lo favorecen (Bösch y col., 2021; Shen y col., 2018).

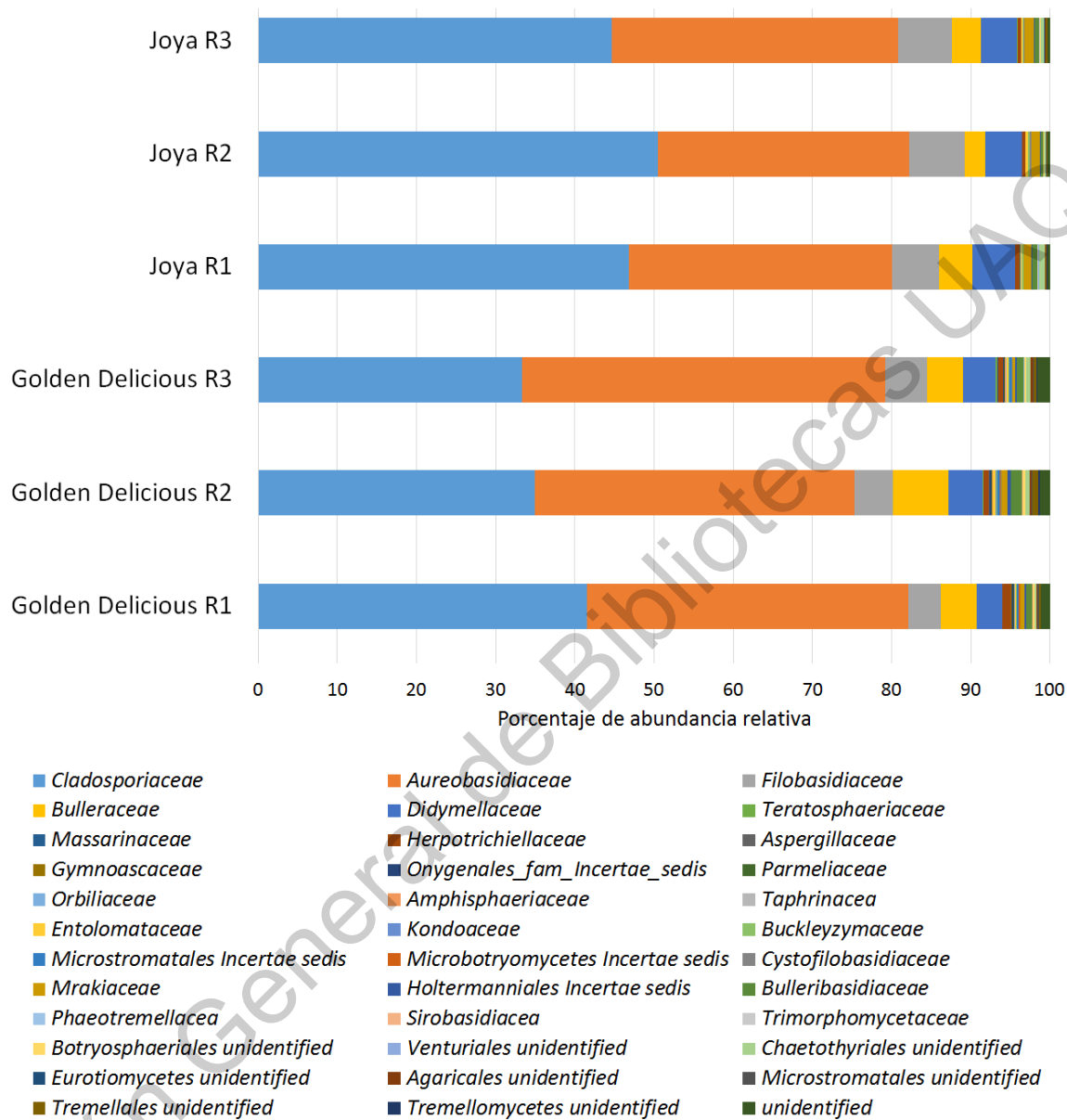


Figura 22. Distribución y abundancia taxonómica a nivel de familia de los grupos fúngicos asociados a la superficie de las replicas biológicas (R) de los frutos maduros de manzana de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.

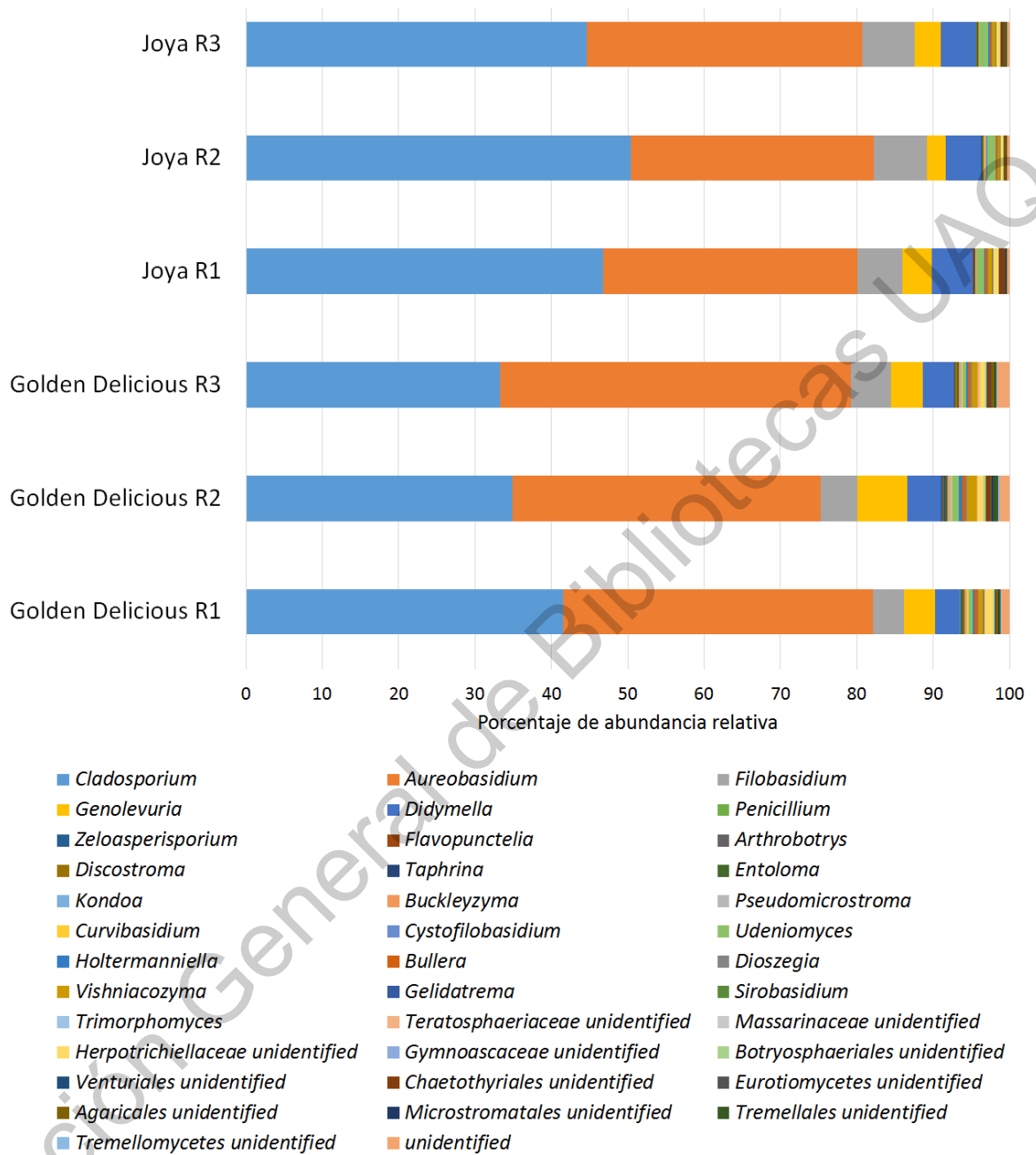


Figura 23. Distribución y abundancia taxonómica a nivel de género de los grupos fúngicos asociados a la superficie de las replicas biológicas (R) frutos maduros de manzana de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.

4.2 Capacidad antagonista de las poblaciones bacterianas epífita contra *P. expansum*

4.2.1 Actividad *in vitro* y en fruto del año 2017

La determinación de la actividad antagonista de las poblaciones bacterias asociadas a las variedades de manzanas estudiadas, mostró que existen bacterias con la capacidad de limitar el crecimiento y daño ocasionado por *P. expansum*. En el año 2017, el 33 % (10/30 morfotipos) de las cepas aisladas de las variedades ‘Royal Gala’ y ‘Joya’, tuvieron la mayor capacidad de inhibición (≥ 30 %, del porcentaje de inhibición del crecimiento radial: PICR) del crecimiento radial de *P. expansum*. Estos morfotipos bacterianos pertenecieron principalmente al género *Bacillus*, siendo *B. methylotrophicus* M9 y *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M26 (51.6 ± 1.7 %PICR y 55.4 ± 1.4 %PICR) las cepas con mayor actividad antagonista contra el hongo, con valores más altos inclusive que los controles positivos como el fungicida químico Nistatina (46.1 ± 5.5 %PICR) y el agente comercial de biocontrol *B. subtilis* Q11 (35.2 ± 1.9 %PICR) (Tabla 8, Figura 24). El género *Bacillus*, con frecuencia se ha reportado como antagonista de hongos fitopatógenos, esto es debido a sus múltiples mecanismos para ejercer este efecto, además de su habilidad de replicarse rápido y su resistencia a los cambios ambientales (Shafi y col., 2017). Por otro lado, en los ensayos en fruto, el fungicida químico mostró el mayor porcentaje de reducción de la pudrición del fruto (%PRPF), seguido por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M24 (66.9 ± 6.5 %PRPF), *B. mojavensis* M18 (49.3 ± 4.7 % of PRFR), *B. halotolerans* M5 (48.0 ± 10.4 %PRPF), el agente comercial de biocontrol *B. subtilis* Q11 (44.7 ± 10.0 %PRPF) y *B. methylotrophicus* M9 (40.3 ± 3.6 %PRPF) (Tabla 8 y Figura 25). Las cepas identificadas como *B. subtilis* subsp. *spizizenii* fueron las que mostraron la mayor inhibición del hongo, tanto *in vitro* como en fruto. Estos resultados son similares a los encontrados por Wen y col. (2015), los cuales encontraron como epífita de alfalfa a *B. subtilis* subsp. *Spizizenii*, cepa que mostró controlar *in vitro* y en planta la pudrición ocasionada por *Fusarium semitectum*.

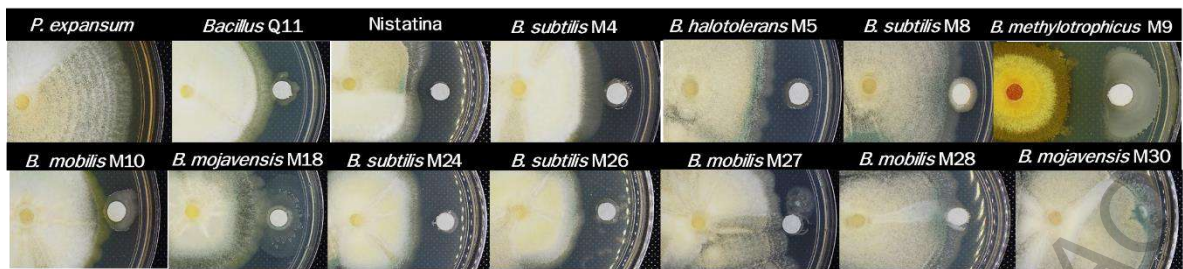


Figura 24. Ensayo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas en el año 2017 con la mayor actividad antagonista contra *P. expansum*.

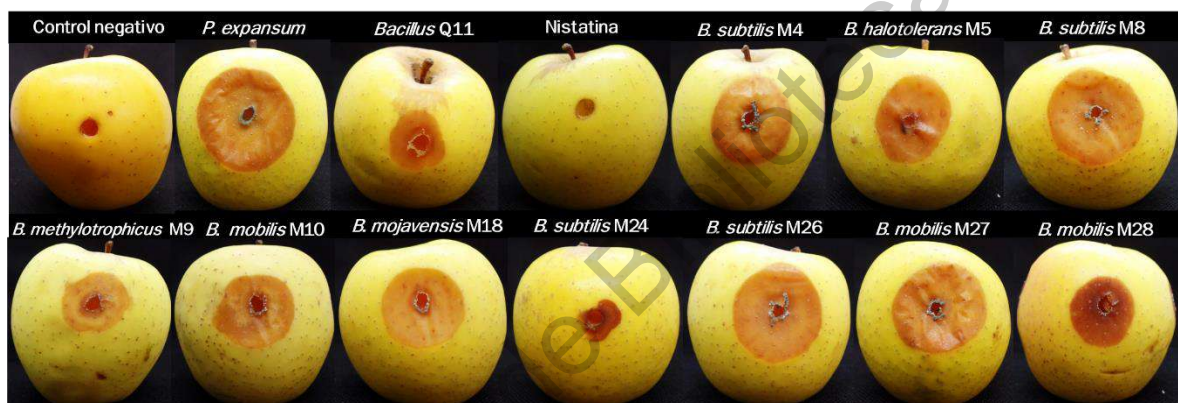


Figura 25. Ensayo antagonista en fruto de cepas bacterianas aisladas en el año 2017 con mayor actividad antagonista *in vitro* frente a *P. expansum*.

El análisis de PERMANOVA mostró que la composición de las bacterias con actividad antagonista asociadas a la variedad ‘Royal Gala’ estuvo influenciada principalmente por la etapa de desarrollo del fruto ($R^2=0.43$, $P<0.01$) explicando el 43 % de la variación observada, agrupándose las cepas encontradas en la etapa de fruto maduro y separándose de las bacterias de otras etapas (Figura 26a). Por otro lado, en la variedad ‘Joya’ el análisis de PERMANOVA no mostró diferencias entre la composición de las bacterias asociadas en las diferentes etapas ($P>0.01$) (Figura 26b). Al observar la abundancia de las cepas antagonistas en las diferentes etapas de desarrollo en la variedad ‘Royal Gala’, se encontró que la mayor abundancia de cepas antagonistas estuvo en la etapa de fruto maduro (47.5 % AR) y la menor en la etapa de fruto verde 2 (7.6 % AR). A diferencia de la variedad ‘Joya’, donde la mayor abundancia de bacterias antagonistas se encontró en la etapa de fruto verde 2 (51.9 % AR) y la menor en la etapa de fruto verde 1 (26.6 % AR). Estos cambios en

la presencia de bacterias antagonistas por etapa de desarrollo y variedades de manzana, pueden estar relacionadas con los cambios en los perfiles de exudados del fruto. Aunque en nuestros datos de perfiles de exudados de manzanas no logramos identificar el aumento de algún azúcar durante el desarrollo del fruto, como lo han hecho para otras variedades de manzana (Grabowski y col., 2004), es posible que estos compuestos estén en concentraciones muy bajas pero suficientes para ejercer un efecto en las poblaciones bacterianas, incluyendo las antagonistas. Este aumento de concentración de azúcares en el fruto maduro, explica la aparición y aumento de hongos fitopatógenos (Fourie y Holz, 1998), lo cual puede inducir a que las cepas presentes en este mismo nicho desarrollen habilidades para coexistir en el fruto maduro, a diferencia de otras etapas de desarrollo.

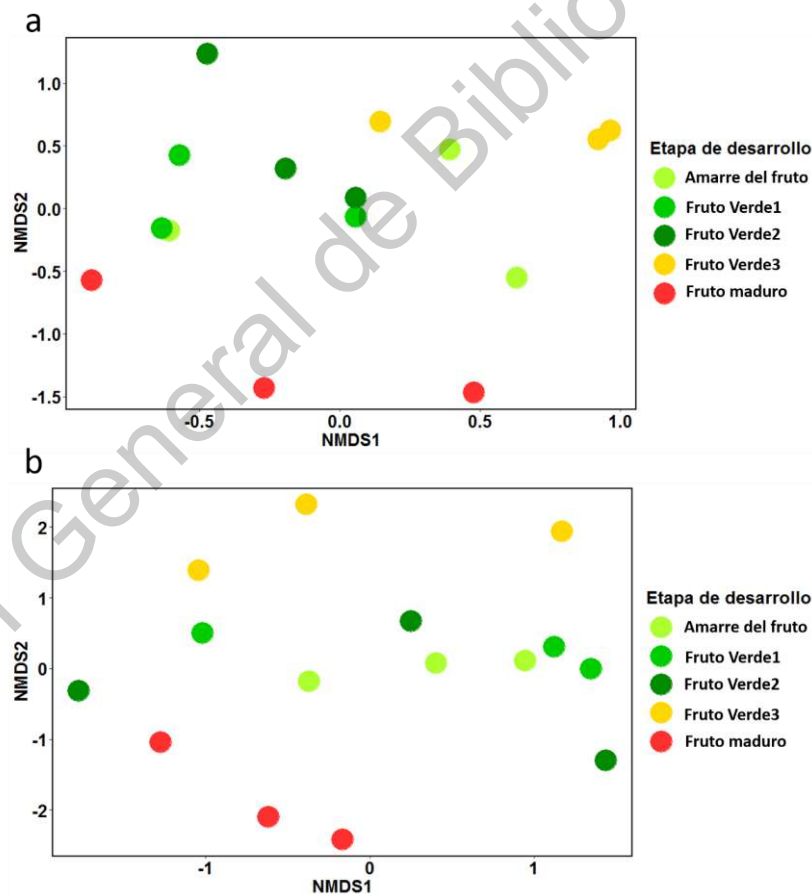


Figura 26. Agrupación de NMDS de las bacterias antagonistas aisladas en el año 2017 asociadas a la variedad ‘Royal Gala’ (a) y ‘Joya’ (b) en las diferentes etapas de desarrollo estudiadas en ese año.

Tabla 8. Caracterización de la actividad antagonista contra *P. expansum* de los aislados bacterianos y características fisicoquímicas relacionadas con la actividad antifúngica.

Año	Bacteria	Variedad de manzana ^A	Etapas de desarrollo	Ensayo <i>In vitro</i> PICR (%) ^B	Ensayo <i>In vivo</i> PRPF (%) ^C	Producción de sideróforos ^D	Actividad surfactante ^D
2017	Control: Nistatina			46.1±5.5 ^{bc}	100.0±0.0 ^a		
	Control: <i>B. subtilis</i> Q11			35.2±1.9 ^{dec}	44.7±10.0 ^c		
	<i>B. subtilis</i> M4	RG/JO	Fruto verde 3	39.8±1.6 ^{cd}	17.0±3.7 ^{def}	++	+++
	<i>B. halotolerans</i> M5	RG/JO	Amarre de fruto y fruto verde 1-2	36.2±6.9 ^{de}	48.0±10.4 ^c	+	+++
	<i>B. subtilis</i> M8	RG	Amarre de fruto, fruto verde 2-3 y fruto maduro	30.7±1.7 ^{ef}	12.6±6.7 ^f	+	++
	<i>B. methylotrophicus</i> M9	RG/JO	Fruto verde 3 y fruto maduro	55.4±1.4 ^a	40.3±3.6 ^c	+++	+++
	<i>B. mobilis</i> M10	RG/JO	Amarre de fruto y fruto verde 1-2	28.3±1.3 ^f	26.1±4.1 ^d	-	+
	<i>B. mojavensis</i> M18	RG/JO	Fruto verde 3	36.1±1.4 ^{de}	49.3±4.7 ^c	+++	+++
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> M24	RG/JO	Fruto maduro	39.3±3.3 ^{cd}	66.9±6.5 ^b	++	+++
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> M26	RG/JO	Fruto maduro	51.6±1.7 ^{ab}	21.5±6.8 ^{de}	++	++
	<i>B. mobilis</i> M27	RG/JO	Fruto maduro	30.5±2.1 ^{ef}	12.9±1.6 ^{ef}	-	+
	<i>B. mobilis</i> M28	RG	Fruto maduro	30.2±2.9 ^{ef}	21.4±8.7 ^{def}	-	++
	Control: Nistatina			36.1±0.3 ^{gh}	100.0±0.0 ^a		
Control: <i>B. subtilis</i> Q11			41.3±0.8 ^{cd}	40.6±0.4 ^b			
<i>A. pascens</i> M4.18	JO/GD	Amarre de fruto y fruto verde 3	33.5±1.0 ⁱ	23.1±2.1 ^{cdef}	-	-	
<i>A. gandavensis</i> M3.18	GD	Amarre de fruto	33.7±0.7 ⁱ	12.1±2.8 ^h	-	-	
<i>B. licheniformis</i> M8.18	GD	Amarre de fruto	40.5±1.1 ^{de}	23.0±2.2 ^{cdef}	-	+	

Año	Bacteria	Variedad de manzana ^A	Etapa de desarrollo	Ensayo <i>In vitro</i> PICR (%) ^B	Ensayo <i>In vivo</i> PRPF (%) ^C	Producción de sideróforos ^D	Actividad surfactante ^D
2018	<i>B. mediterraneensis</i> M9.18	GD	Amarre de fruto	33.8±0.9 ⁱ	11.9±4.1 ^h	-	-
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> M15.18	GD	Fruto maduro	41.4±0.4 ^{cd}	13.5±1.4 ^{gh}	+	++
	<i>B. tequilensis</i> M16.18	GD	Amarre de fruto	36.7±1.1 ^{gh}	17.2±0.8 ^{fgh}	-	++
	<i>B. toyonensis</i> M17.18	JO/GD	Fruto maduro	43.1±0.3 ^c	21.6±2.0 ^{cdef}	-	-
	<i>C. piscis</i> M20.18	GD	Fruto maduro	42.4±0.2 ^{cd}	25.3±1.7 ^{cde}	-	+
	<i>C. flaccumfaciens</i> M21.18	RG/JO/GD	Amarre de fruto-fruto maduro	36.0±0.6 ^h	19.2±2 ^{defgh}	-	-
	<i>E. cloacae</i> M22.18	GD	Fruto maduro	53.7±0.2 ^a	18.2±2.0 ^{efgh}	+	-
	<i>E. billingiae</i> M23.18	GD	Fruto verde 3	46.4±0.2 ^b	20.5±1.2 ^{cdefg}	++	++
	<i>L. chungkukjangi</i> M26.18	GD	Amarre de fruto	38.4±0.7 ^{fg}	22.1±6.2 ^{cdef}	-	-
	<i>M. goesingense</i> M27.18	GD	Fruto maduro	45.4±0.5 ^b	14.0±0.9 ^{gh}	-	-
	<i>Pantoea</i> sp. M31.18	GD	Fruto maduro	39.1±0.7 ^{ef}	40.2±0.9 ^b	+	-
	<i>P. asturiensis</i> M33.18	GD	Fruto verde 3	41.9±0.1 ^{cd}	26.1±1.4 ^{cd}	+	-
	<i>P. caspiana</i> M34.18	GD	Fruto verde 3	39.1±0.7 ^{ef}	24.3±2.0 ^{cdef}	+	-
	<i>S. aerolata</i> M36.18	GD	Fruto verde 3	46.4±0.2 ^b	26.9±3.1 ^c	+	-

^AVariedades de las manzanas estudiadas: RG= 'Royal Gala', JO= 'Joya' y GD= 'Golden Delicious'. ^BPICR: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial. ^CPRFR: Porcentaje de reducción de la pudrición del fruto los valores representan el promedio de tres réplicas. ^BC Los valores con una letra diferente en la misma columna por año son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, p <0.05). ^DCompuestos antifúngicos: -: no detectado; +++=alto; ++= medio; +=bajo.

4.2.2 Actividad *in vitro* y en fruto del año 2018

En el año 2018, el 47 % (17 de 36 morfotipos) de las cepas aisladas de las variedades ‘Royal Gala’, ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’, tuvieron la mayor capacidad de inhibición (≥ 30 %PICR) del crecimiento radial de *P. expansum* (Tabla 8). Ese año también se encontraron diversas cepas del género de *Bacillus* con capacidad antagonista *in vitro*; sin embargo, la cepa con mayor actividad antagonista *in vitro* fue *E. cloacae* M22.18 (53.7 ± 0.2 %PICR) aislada de la etapa de fruto maduro (Tabla 8 y Figura 27). *E. cloacae* ya ha sido reportado como parte de la microbiota de las plantas, y la cual ha demostrado también tener efecto de biocontrol contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Yuliar y col., 2018; Abdel-Salam y col., 2007). En los ensayos en fruto, la cepa que más disminuyó el daño fue *Pantoea* sp. M31.18 (40.2 ± 0.9 %PRPF), aislada de igual manera del fruto maduro (Tabla 8 y Figura 28). El género de *Pantoea* ya ha sido reportado como parte de la microbiota asociada a manzanas de las variedades ‘Golden Delicious’, ‘Belleza de Roma’ y ‘Starking Delicious’, la cual además ha demostrado ser muy efectiva para el control de *P. expansum* tanto para manzanas como para peras, incluso en condiciones de almacenamiento poscosecha (Torres y col., 2003). Además, *Pantoea* también ha resultado ser un excelente agente de biocontrol contra *Erwinia amylovora*, agente causal del fuego bacteriano en las flores de manzana; su eficacia radica en que puede colonizar los estigmas de las flores y esto hace que el principal mecanismo de acción contra *E. amylovora* sea la competencia por espacio y nutrientes (Pusey y col., 2011). Tanto *E. cloacae* M22.18 como *Pantoea* sp. M31.18 mostraron tener la capacidad de producir sideróforos *in vitro*. La producción de este tipo de metabolitos ha sido reportada como una de las estrategias principales para la competencia de nutrientes por parte de las cepas antagonistas, reduciendo la concentración de hierro disponible y limitando así, el crecimiento y establecimiento de los fitopatógenos (Yu y col., 2011).

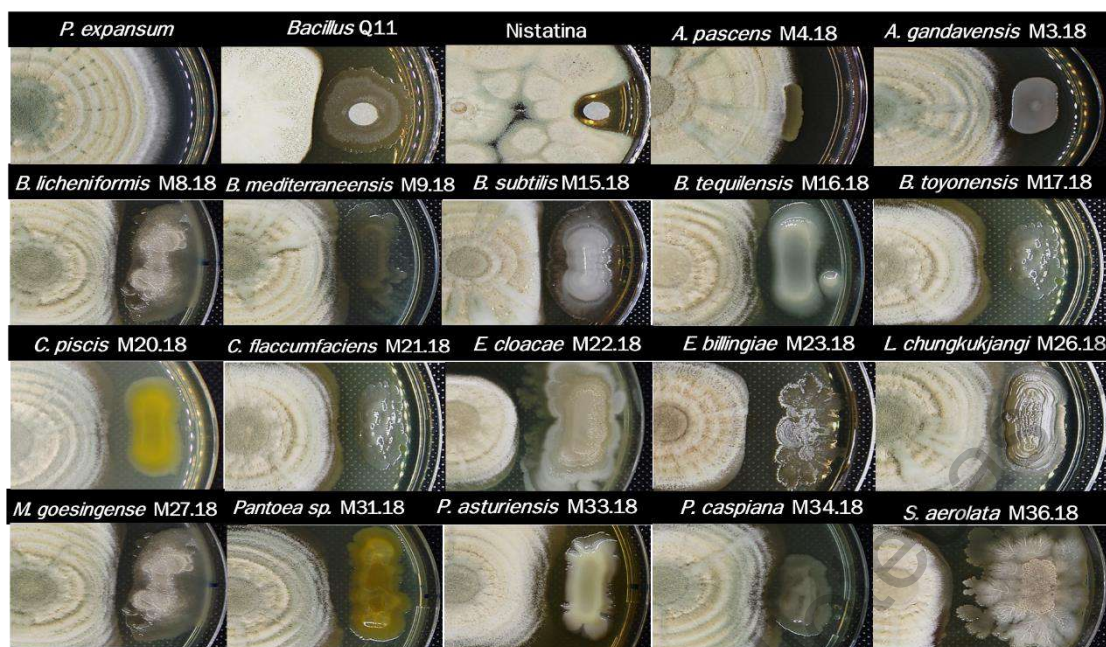


Figura 27. Ensayo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas en el año 2018 con la mayor actividad antagonista contra *P. expansum*.

Al igual que el año anterior, se encontró que la cepa con mayor actividad antagonista *in vitro* no fue la mejor en los ensayos en fruto; este fenómeno ya ha sido reportado en otros estudios, donde encontraron que las cepas con actividad antagonista *in vitro* contra hongos fitopatógenos no siempre son las mejores cuando se utilizan en el órgano de la planta. El comportamiento puede deberse a las interacciones que se dan entre la bacteria y la planta como la inducción de la resistencia sistémica por parte de algunas bacterias, lo cual provoca una respuesta más eficiente de la planta ante el patógeno (Besset-Manzoni y col., 2019).

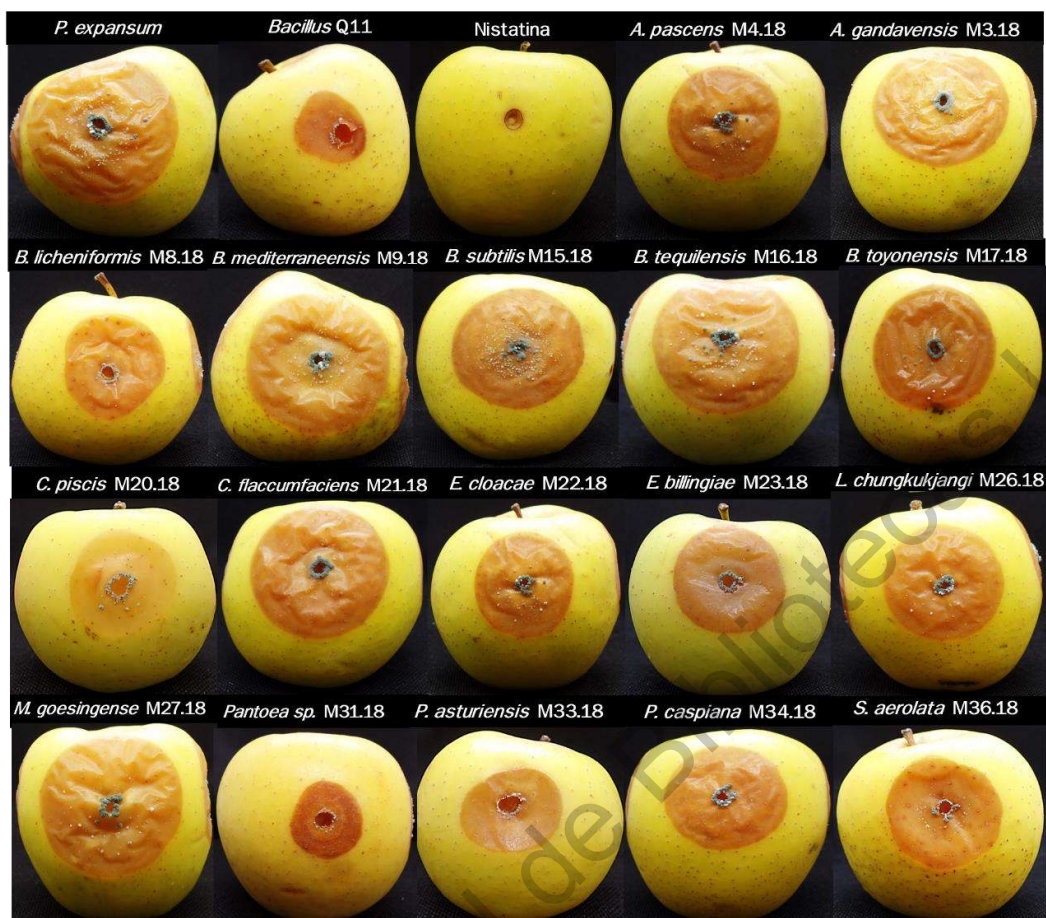


Figura 28. Ensayo en fruto de antagonismo contra *P. expansum*, utilizando las cepas bacterianas aisladas en el año 2018 que exhibieron la mayor actividad antagonista.

El análisis de PERMANOVA mostró que al igual que en el año 2017, la composición de las bacterias con actividad antagonista asociadas a la variedad ‘Royal Gala’ y ‘Joya’ estuvo influenciada principalmente por la etapa de desarrollo del fruto (‘Royal Gala’: $R^2=0.52$ y ‘Joya’: $R^2=0.42$, $P<0.01$) explicando el 52 % y 42 % de la variación observada, respectivamente (Figura 29a y 29b). Por otro lado, en la variedad ‘Golden Delicious’ no se encontraron diferencias significativas en la composición de las bacterias con actividad antagonista entre las etapas de desarrollo ($p>0.01$) (Figura 29c). Las diferencias observadas entre variedades pueden estar influenciadas por los compuestos presentes en la superficie de las manzanas rojas y verdes, donde posiblemente los polifenoles juegan un papel importante, ya que con base a los datos de perfiles de exudados encontrados en este estudio, es una de las

principales diferencias durante el desarrollo del fruto entre las variedades de manzana rojas y verdes.

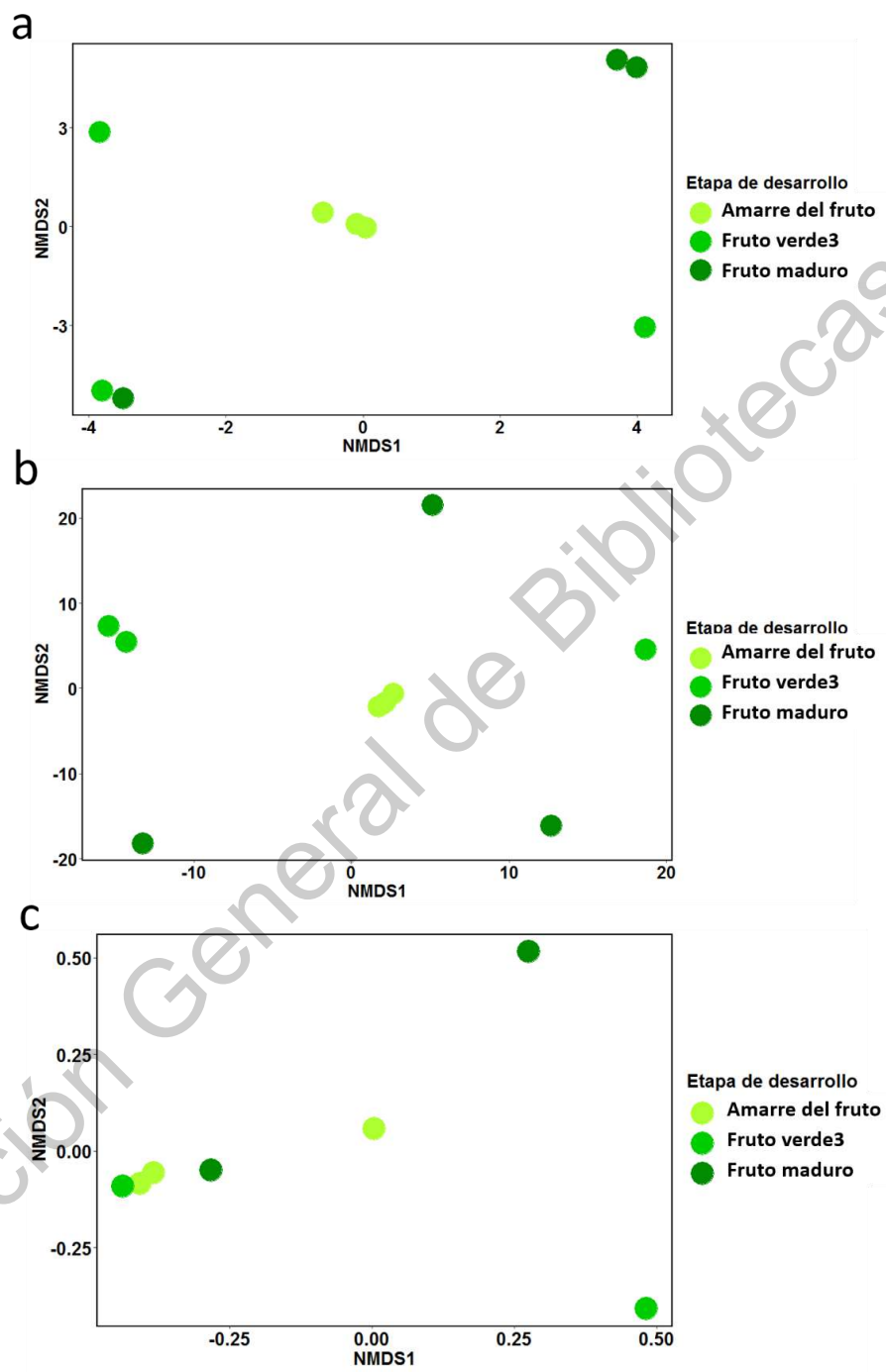


Figura 29. Agrupación de NMDS de las bacterias antagonistas aisladas en el año 2018 asociadas en las diferentes etapas de desarrollo de los frutos de las variedades estudiadas. ‘Royal Gala’ (a), ‘Joya’ (b) y ‘Golden Delicious’ (c).

4.2.3 Actividad antagonista de consorcios bacterianos en fruto

Al observar que varias de las cepas bacterianas con actividad antagonista estaban presentes en ciertas etapas del fruto, se decidió generar consorcios bacterianos por etapa para determinar la actividad antagonista en conjunto contra *P. expansum* en fruto. Se observó que los consorcios de las etapas de fruto verde 2 (26.8 ± 8.6 %PRPF), fruto verde 3 (23.9 ± 3.6 %PRPF) y fruto maduro (27.1 ± 6.6 %PRPF) fueron los consorcios que obtuvieron la mayor inhibición de la pudrición del fruto (Figura 30); sin embargo, no superaron los porcentajes obtenidos de forma individual por las cepas. Janisiewicz (1996) encontró que una forma efectiva de generar consorcios bacterianos con mayor actividad contra *P. expansum* en manzana, fue seleccionando cepas que ocupan diferentes nichos (manzanas) y fuentes de carbono para poder coexistir y ser consorcios de biocontrol más efectivos. Esto coincide con nuestros resultados, ya que los consorcios las bacterias aisladas en la misma etapa de desarrollo (mismo nicho) no tienen mayor actividad antagonista que las cepas individuales.

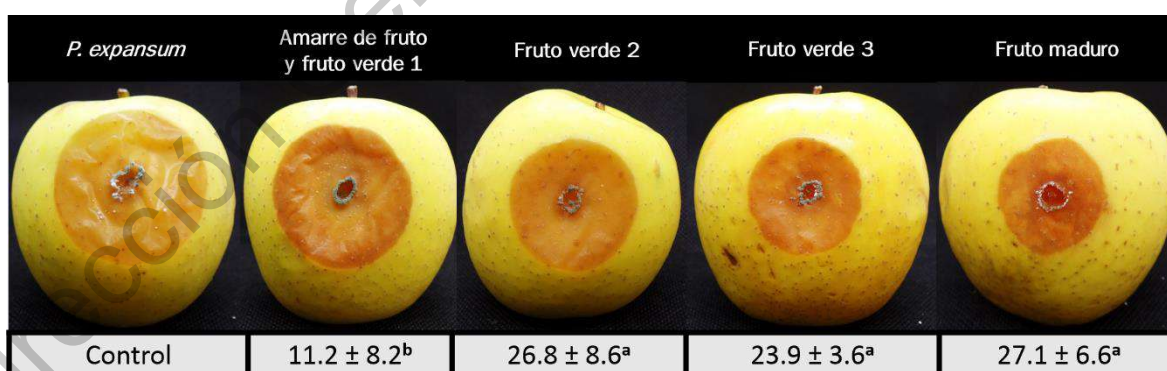


Figura 30. Ensayo antagonista en fruto de los consorcios bacterianos por etapa de las cepas con actividad antagonista aisladas en el año 2017 con mayor actividad antagonista *in vitro* frente a *P. expansum*. Los valores representan el porcentaje de reducción de la

podrición del fruto del promedio de tres réplicas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

Al igual que las cepas bacterianas del año 2017, se hicieron consorcios bacterianos con las cepas con actividad antagonista encontradas en cada etapa de desarrollo para el año 2018, principalmente de la variedad ‘Golden Delicious’, ya que fue la variedad donde se encontraron la mayor parte de las cepas con actividad antagonista. Se observó que al igual que en los consorcios de las variedades rojas del año 2017, la mayor inhibición de la pudrición del fruto la obtuvo el consorcio del fruto maduro (26.9 ± 1.2 %PRPF) (Figura 31); sin embargo, nuevamente se observó que no superaron los porcentajes obtenidos de forma individual por las cepas.

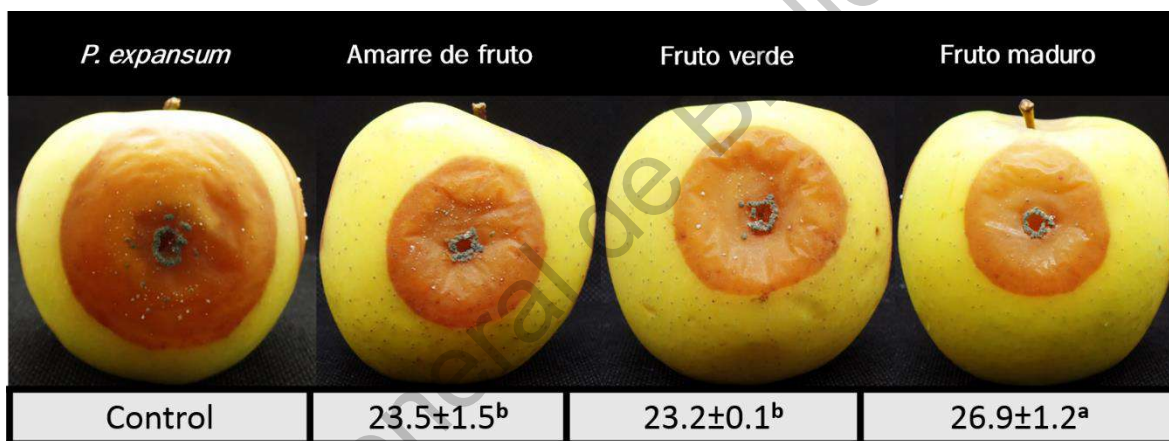


Figura 31. Ensayo antagonista en fruto de los consorcios bacterianos por etapa de las cepas con actividad antagonista aisladas en el año 2018 de la variedad ‘Golden Delicious’ con mayor actividad antagonista *in vitro* frente a *P. expansum*. Los valores representan el porcentaje de reducción de la pudrición del fruto del promedio de tres réplicas. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

4.2.4 Compuestos bacterianos relacionados con la actividad antagonista

El 100 % de las cepas con actividad antagonista tuvieron capacidad surfactante en el medio de agar sangre, mientras que el 87.5 % de las cepas produjeron sideróforos en el medio

CAS (Tabla 8). El análisis de MALDI-TOF-MS del sobrenadante de las cepas con mayor actividad antagonista en fruto, mostraron la producción de una mezcla de dos grupos de lipopéptidos. El primer grupo con los picos más abundantes y diversos fue detectado en un rango de 1440 a 1560 relación masa carga (m/z), sugiriendo isoformas protonadas de fengicinas y sus aductos de metales alcalinos (Figura 32). El perfil de lipopéptidos de la cepa de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M24, la cepa con la mayor actividad antagonista en el fruto, mostró que el pico más intenso fue atribuido a la fengicina B C-17 y sus aductos de sodio $[M+Na]^+$. Por otro lado, la cepa *B. mojavensis* M18, la segunda mejor antagonista en fruto, presentó los picos más intensos que correspondieron a fengicina A/B y fengicina A C-18. En las cepas de *B. halotolerans* M5 y *B. methylotrophicus* M9, el pico más intenso fue el de la fengicina B C-17. Además de las fengicinas, se detectó otro grupo de lipopéptidos menos abundante y diverso, en el rango de 1020 a 1100 m/z , el cual sugiere la presencia de compuestos tipo iturina. La producción de sideróforos y de lipopeptidos son dos de los metabolitos antimicrobianos más reportados para las cepas de *Bacillus* con actividad antagonista (Rodríguez-Chávez y col., 2019; Yu y col., 2011). Los lipopéptidos están conformados por tres principales familias: surfactinas, iturinas y fengicina, siendo esta última una de las familias más reportadas en la actividad antifúngica contra los hongos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pythium* (Hanif y col., 2019; Malfanova y col., 2011), *Botrytis* (Tosco y col., 2015) y *Penicilium* (Arrebola y col., 2010; Yu y col., 2011).

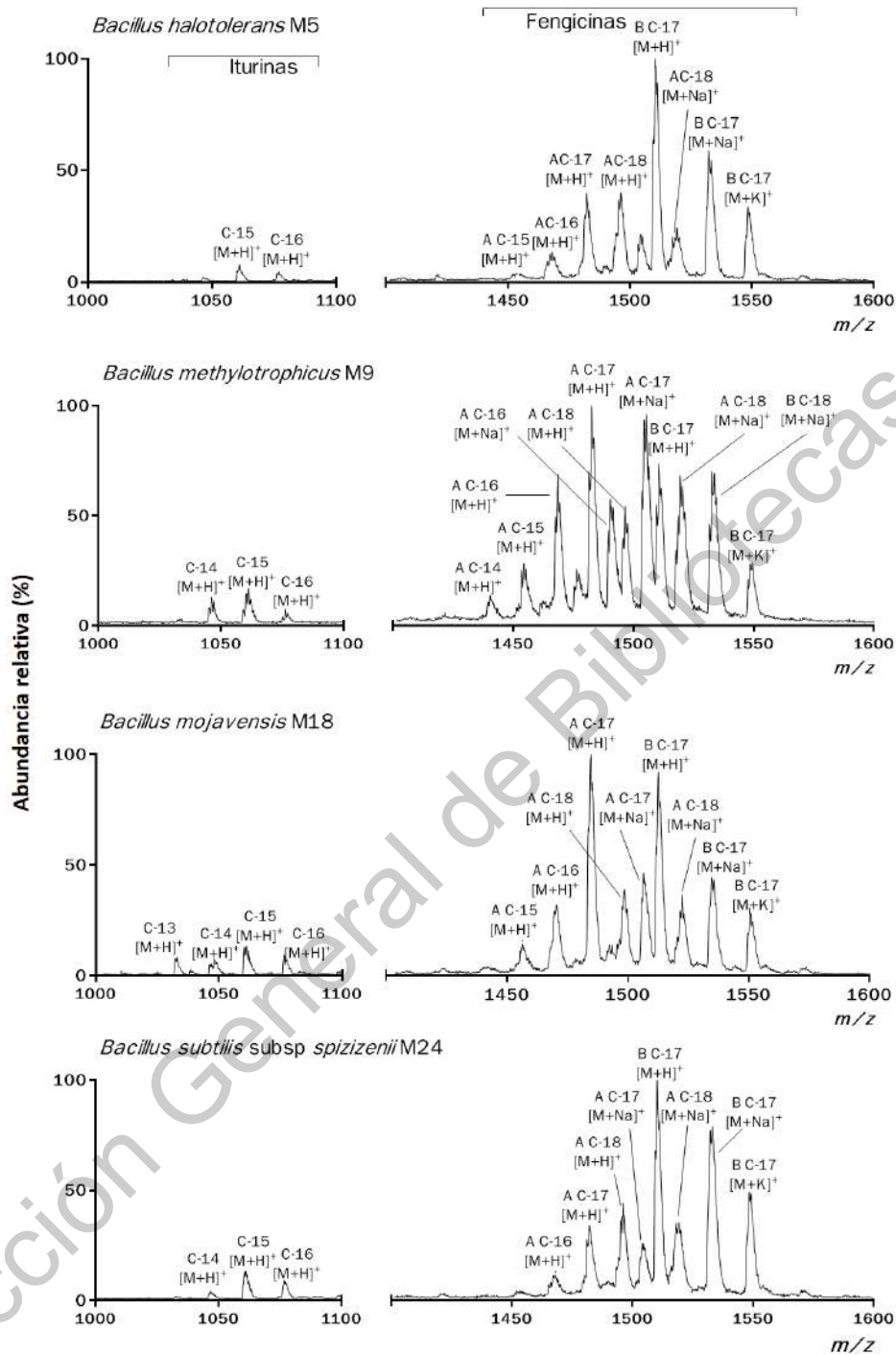


Figura 32. Espectrometría de masas MALDI-TOF de la fracción biosurfactante producida por las bacterias epífitas antagonistas del año 2017. El porcentaje de abundancia relativa de los lipopéptidos se detectó en el intervalo de m/z 900 a 1600.

4.3 Composición de los exudados del fruto y su relación con la microbiota epífita

4.3.1 Perfil de los exudados presentes en la superficie de los frutos

En la caracterización de los compuestos presentes en los exudados de las variedades seleccionadas, se encontró que existen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y polifenoles presentes en la superficie de la manzana durante su desarrollo. Se identificaron y cuantificaron los compuestos ácido málico, manitol, prolina, tirosina, glutamato, ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido vanílico (Tabla 9) (Anexo VII- XI). Todos los compuestos, excepto el manitol, se han identificado de forma endógena (jugo) en manzanas de variedades rojas y amarillas (Zhang y col., 2010; Swami y col., 2016; Lee y col., 2017; Ma y col., 2018; Plotkowski y Cline, 2021). En el caso del manitol, no ha sido reportado para frutos de manzana, pero sí en hojas y tallos (Sakai, 1966); además se ha encontrado presente en frutos de otras pomáceas como durazno (Muir y col., 2009) y otros frutos como sandía (Jovanovic-Malinovska y col., 2014) y frutillas (Mäkinen y Söderling, 1980). Algunos reportes, mencionan a los azúcares glucosa y fructosa, los cuales se encuentran en los frutos de manzana como azúcares predominantes (Castel y col., 2020; Wei y col., 2020), como sustratos utilizados por bacterias, hongos filamentosos y levaduras para la formación de manitol (Gonçalves y col., 2019; Rice y col., 2020; Solomon y col., 2007). Con base en nuestros datos, podría ser posible que la presencia del manitol en los exudados, sea debido al metabolismo microbiano que se lleva a cabo en la filósfera del fruto, tal como se ha demostrado en la rizósfera (Zhalnina y col., 2018; Jacoby y Kopriva, 2019).

El análisis de PERMANOVA reveló que los perfiles de compuestos identificados en los exudados de manzana estaban influenciados principalmente por la variedad ($R^2=0.53$, $P<0.001$), la cual explica un 53 % de la variación observada, seguido por la etapa ($R^2=0.17$, $P<0.001$) y la interacción etapa-variedad ($R^2=0.15$, $P<0.001$), explicando en conjunto el 85 % de la variación observada (Figura 33). Estos datos coinciden con lo descrito en raíces, donde la variedad y la etapa de desarrollo de la planta son factores que han demostrado que modulan los perfiles de exudados (Chaparro y col., 2013; Li y col., 2013; Zhang y col., 2020). En frutos de tomate, se ha observado que la variedad de la planta es un factor para el perfil

de los exudados, principalmente en el contenido de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos (Han y Micallef, 2016). En frutos de manzana se ha encontrado que la variedad es un factor que influye en el perfil de los compuestos endógenos, principalmente azúcares (Castel y col., 2020), aminoácidos (Ma y col., 2018), ácidos orgánicos (Wu y col., 2007) y polifenoles (Lee y col., 2013). También se ha encontrado que la etapa de desarrollo del fruto llega a influir en el perfil de los compuestos presentes en la manzana, principalmente en la presencia y concentración de azúcares, aminoácidos, polifenoles y ácidos orgánicos (Ackermann y col., 1992; Beshir y col., 2019; Zhang y col., 2010); se ha reportado que estos cambios persisten hasta la etapa poscosecha (Gerçekcioglu y col., 2004; Jan y Rab, 2012; Wei y col., 2020). Nuestros datos muestran que también la variedad y la etapa de desarrollo influyen en los compuestos de los exudados presentes en la filósfera de los frutos, algo que hasta el momento no ha sido descrito para el manzano.

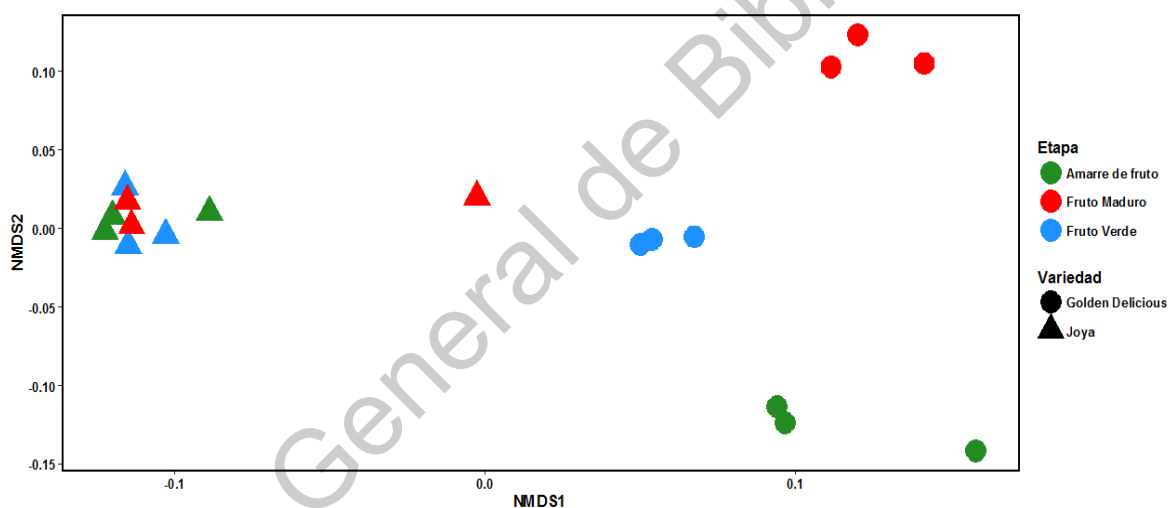


Figura 33. Método de escala multidimensional no métrica (NMDS) del perfil de exudados de las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’. Variedad ‘Joya’ (triángulos) y ‘Golden Delicious’ (círculos). Etapas: amarre de fruto (círculos, triángulos y cuadrados verdes), fruto verde 3 (círculos, triángulos y cuadrados azules) y fruto maduro (círculos, triángulos y cuadrados rojos).

En ambas variedades se encontraron diferencias en la concentración del aminoácido prolina, el cual fue disminuyendo conforme a la maduración del fruto (‘Golden Delicious’ = 76.3 ± 19.02 a 31.6 ± 0.3 nmol/fruto y ‘Joya’ = 76.3 ± 19.02 a 31.6 ± 0.3 nmol/fruto, $p < 0.05$)

(Tabla 9). La prolina es uno de los aminoácidos más abundantes que se ha encontrado en el jugo y flores de manzanos de variedades amarillas y rojas (Ma y col., 2018; Pusey y col., 2008). En jugo de manzanas de la variedad roja ‘Honeycrisp’, se encontró que la concentración de prolina va aumentando conforme a la maduración del fruto llegando a 8 mg/fruto (Zhang y col., 2010). Estos datos coinciden con los encontrados en jugo de uva para vinificación en diferentes variedades, donde las concentraciones más altas de prolina se encuentran en la pulpa del fruto maduro (Kliewer, 1970); además en exudados de este tipo de uvas también se ha encontrado que la concentración endógena de prolina va aumentando conforme a la maduración del fruto (Prakitchaiwattana y col., 2020). Sin embargo, nuestros datos muestran que para los exudados de las variedades de manzana estudiados, la prolina va disminuyendo, probablemente por la actividad de los microorganismos presentes en esta etapa del fruto, conforme a la maduración a diferencia de lo que se ha reportado en la parte interna del fruto (Ma y col., 2018). Otros aminoácidos que mostraron cambios en su concentración durante la maduración, fueron la tirosina, la cual, fue disminuyendo conforme a la maduración del fruto en ambas variedades (‘Golden Delicious’ = 34.3 ± 12.6 a 18.8 ± 0.3 nmol/fruto y ‘Joya’ = 33.1 ± 0.6 a 18.8 ± 0.3 nmol/fruto, $p < 0.05$). (Tabla 9), esto coincide con lo encontrado en manzanas ‘Honeycrisp’, donde la concentración endógena de la tirosina fue disminuyendo durante la maduración (Zhang y col., 2010), sin embargo, aunque este tipo de estudios no se han realizado en manzanas amarillas, la tirosina es uno de los aminoácidos presentes en la pulpa de variedades amarillas como ‘Golden Delicious’ y ‘Orin’ en etapa madura, lo que coincide con nuestros datos (Wu y col., 2007). Otro aminoácido con cambios durante el desarrollo fue el glutamato, el cual, solo se encontró en la variedad ‘Golden Delicious’ en la etapa de fruto maduro (9.0 ± 0.39 nmol/fruto) (Tabla 9), este resultado, no coincide con los datos reportados para este aminoácido dentro de los compuestos endógenos de manzanas de variedad roja y amarillas, donde la concentración va disminuyendo durante la maduración del fruto (Ackermann y col., 1992; Plotkowski y Cline, 2021), por lo que es posible que al igual que la prolina, la dinámica de los exudados sea opuesta a la dinámica endógena y se vea influenciada por la actividad microbiana.

En los exudados de la variedad ‘Golden Delicious’ se encontró una diferencia en la concentración del ácido málico, se observó un aumento en las últimas etapas de desarrollo

(de 0 a 174.5 ± 46.3 $\mu\text{g}/\text{fruto}$, $p < 0.05$) (Tabla 9). Estos datos difieren con lo encontrado en frutos de la variedad ‘Honeycrisp’, en donde este ácido va disminuyendo conforme a la maduración (Zhang y col., 2010) e incluso sigue bajando durante su almacenamiento poscosecha (Ackermann y col., 1992). Por otro lado, estos datos coinciden con lo encontrado en otras especies silvestres del género como *Malus sargentii* y *Malus manshurica*, donde durante el desarrollo del fruto va aumentando la concentración endógena del ácido málico (Ma y col., 2019). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de exudados de frutos de manzano donde se reporte la concentración de ácido málico, lo que nuestros resultados muestran es que si bien internamente la concentración de este ácido puede disminuir durante el desarrollo de manzanas comerciales, en el exterior se podría encontrar que se exuda más conforme a la maduración. Esto puede estar relacionado con la interacción del fruto con su microbiota, ya que se ha observado que el ácido málico en raíces activa la quimiotaxis para el reclutamiento y desarrollo de bacterias del género *Paenibacillus* con capacidad de biocontrol en la rizósfera (Ling y col., 2011), género que está presente en la etapa madura de la manzana.

El mayor número de diferencias entre los compuestos cuantificados entre las variedades, se encontró en la etapa 3 de desarrollo, siendo diferentes en la concentración de ácido málico (‘Golden Delicious’ = 174.5 ± 46.3 y ‘Joya’ = 357.4 ± 85.2 $\mu\text{g}/\text{fruto}$, $p < 0.05$), manitol (‘Golden Delicious’ = 16.3 ± 3.4 y ‘Joya’ = 2.4 ± 3.1 $\mu\text{g}/\text{fruto}$, $p < 0.05$), prolina (‘Golden Delicious’ = 16.3 ± 3.4 y ‘Joya’ = 47.1 ± 5.3 nmol/fruto , $p < 0.05$), tirosina (‘Golden Delicious’ = 14.3 ± 1.6 nmol/fruto y ‘Joya’ = 18.8 ± 0.3 nmol/fruto , $p < 0.05$) y glutamato (‘Golden Delicious’ = 9.0 ± 0.39 y ‘Joya’ = 0 ± 0 nmol/fruto , $p < 0.05$) (Tabla 9). Las diferencias en la concentración de ácido málico, prolina, tirosina y glutamato entre variedades amarillas y rojas se han descrito en otros trabajos para la parte interna del fruto (Wu y col., 2007; Feng y col., 2014; Ma y col., 2018). Como se comentó anteriormente, el manitol no es una azúcar que se haya descrito dentro de los compuestos endógenos de la manzana; sin embargo, su presencia puede estar relacionada con la fermentación de otros azúcares que dan como resultado el manitol, principalmente por bacterias el género *Lactobacillus* (Gonçalves y col., 2019), el cual es más abundante en la variedad de ‘Joya’ (Figura 16), lo cual podría asociarse a los valores más altos de manitol en esta variedad.

En la concentración de polifenoles, no se observaron diferencias durante el desarrollo del fruto de ambas variedades, sin embargo, sí se encontraron diferencias al comparar cada una de las etapas entre las variedades, observando que la mayoría de las diferencias en el contenido de polifenoles entre las variedades, se encontró en la primer etapa de desarrollo, en el ácido 3,4-dihidroxibenzoico ('Golden Delicious' = 0 y 'Joya' = 129.1 ± 90.6 $\mu\text{g}/\text{fruto}$, $p < 0.05$) y ácido 4-hidroxibenzoico ('Golden Delicious' = 0 y 'Joya' = 330.1 ± 96 $\mu\text{g}/\text{fruto}$, $p < 0.05$), encontrando los mayores valores 'Joya', la variedad roja en estudio. Esto coincide con lo encontrado en otros estudios, donde al comparar los perfiles y concentración de polifenoles endógenos, incluyendo los hidroxibenzoicos, se observó que las variedades de manzanas rojas tienen una mayor concentración de estos compuestos que las amarillas (Geana y col., 2021; Kondo y col., 2002; Lee y col., 2017; Piagentini y Pirovani, 2017). Nuestros datos muestran, que así como se ha observado de manera endógena, los compuestos polifenólicos exógenos se encuentran en mayor cantidad en las variedades rojas que en amarillas.

Tabla 9. Compuestos identificados en los exudados de los frutos entre las etapas de desarrollo en las variedades ‘Joya’ y ‘Golden Delicious’.

Variedad	Etapas	Ác. málico (µg/fruto)	Manitol (µg/fruto)	Prolina (nmol/fruto)	Tirosina (nmol/fruto)	Glutamato (nmol/fruto)	Ác. gálico (µg/fruto)	Ácido 3,4- dihidroxibenzoico (µg/fruto)	Ácido 4- hidroxibenzoico (µg/fruto)	Ácido vanílico (µg/fruto)
'Joya'	1	535.6±164 ^{A, a}	13.1±15.5 ^{A, a}	94.4.3±2.2 ^{A, a}	33.1±0.6 ^{A, a}	0 ^{A, a}	164.1±137 ^{A, a}	129.1±90.6 ^{A, a}	330.1±96 ^{A, a}	232.8±196 ^{A, a}
'Golden Delicious'	1	0 ^{B, b}	57.1±58.8 ^{A, a}	76.3±19.02 ^{A, a}	34.3±12.6 ^{A, a}	0 ^{A, a}	210.5±34.5 ^{A, a}	0 ^{B, a}	0 ^{B, a}	185.1±167 ^{A, a}
'Joya'	2	506.8±236.4 ^{A, a}	19.9±14.9 ^{A, a}	85.5±8.6 ^{A, a}	33.5±0.6 ^{A, a}	0 ^{A, a}	374.7±137 ^{A, a}	653.5±448 ^{A, a}	512.1±592 ^{A, a}	424.3±112 ^{A, a}
'Golden Delicious'	2	269.3±71.2 ^{A, a}	28.0±1.4 ^{A, a}	58.1±1.0 ^{B, a}	33.6±3.3 ^{A, a}	0 ^{A, a}	200.4±15.6 ^{A, a}	0 ^{A, a}	0 ^{A, a}	109±123 ^{B, a}
'Joya'	3	357.4±85.2 ^{A, a}	2.4±3.1 ^{B, a}	47.1±5.3 ^{A, b}	18.8±0.3 ^{A, b}	0 ^{B, a}	169.7±35.9 ^{A, a}	109.5±100 ^{A, a}	151.3±110 ^{A, a}	89.8±126 ^{A, a}
'Golden Delicious'	3	174.5±46.3 ^{B, a}	16.3±3.4 ^{A, a}	31.6±0.3 ^{B, b}	14.3±1.6 ^{B, b}	9.0±0.39 ^{A, b}	240.5±130 ^{A, a}	0 ^{A, a}	0 ^{A, a}	44.9±40 ^{A, a}

Los valores representan la media de tres réplicas; las letras mayúsculas representan las diferencias entre la misma etapa entre las dos variedades; las letras minúsculas representan las diferencias entre las etapas de desarrollo por variedad (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

4.3.2 Correlación entre el perfil de exudados obtenidos en los frutos y la microbiota epífita

4.3.2.1 Bacterias

Mediante el análisis restringido de coordenadas principales (CAP) se logró observar la relación entre la composición de las familias microbianas y los nueve compuestos presentes e identificados en los exudados en la etapa de fruto maduro de las dos variedades en estudio. Para las poblaciones bacterianas, el análisis CAP demostró que a nivel de géneros se encontraron cuatro compuestos que afectaron significativamente la composición de la población de bacterias ($p < 0.05$): la tirosina, prolina, el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figuras 35a y 35b); en contraste con lo observado a nivel de familia, donde solamente prolina (Figura 34a) y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figura 34b) mostraron tener un efecto sobre la composición bacteriana ($p < 0.05$). El efecto de los exudados de las plantas sobre la conformación de poblaciones bacterianas ha sido descrito principalmente en las raíces, donde se ha vinculado el aumento o disminución de las poblaciones bacterianas con algún metabolito o grupo de metabolitos (Aira y col., 2010; Chaparro y col., 2013; Zhalnina y col., 2018). Parte importante de los exudados de la raíz son los aminoácidos, los cuales junto a los azúcares son una fuente importante de carbono y nitrógeno, y que por tanto, la presencia o ausencia de estos aminoácidos puede afectar tanto la densidad como la diversidad de las poblaciones bacterianas (Baudoin y col., 2002, Phillips y col., 2004; Kumar y col., 2007; Tang y col., 2020). En el caso particular de la prolina, se ha reportado que además de ser una fuente de carbono, también actúa como un compuesto que permite a los microorganismos y plantas aumentar su osmolaridad celular durante la limitación de agua (Hayat y col., 2021; Verslues y Sharma, 2010). El estrés hídrico es una característica relevante en los ambientes de filósfera, y en donde el mecanismo mediado por prolina se ha descrito como parte de las estrategias utilizadas por las bacterias que colonizan este ambiente, como es el caso de *Bacillus altitudinis* FD48 en hojas de arroz, donde la producción de prolina por parte de la bacteria ayuda a la planta a contrarrestar el estrés hídrico (Kumar y col., 2017). Nuestros datos, muestran que la prolina también modula la conformación de las poblaciones presentes en las manzanas de las variedades estudiadas, y que posiblemente,

debido a la concentración diferente encontrada en cada variedad (Tabla 9), que en la variedad 'Joya' haya más potencial para el metabolismo de este aminoácido que en la variedad 'Golden Delicious', pero en ambos casos la presencia de prolina, podría estar ayudando a contrarrestar la falta de agua en la superficie del fruto.

Los compuestos fenólicos también se han reportado que forman parte de los exudados de las plantas y se ha descrito su posible efecto sobre las poblaciones bacterianas asociadas (Bradi y col., 2013; Chaparro y col., 2014). Uno de los polifenoles más estudiados es el 4-hydroxybenzoico, ya que se ha demostrado que es uno de los compuestos fenólicos con efecto sobre las poblaciones bacterianas asociadas a plantas; por ejemplo, en la población de bacterias asociadas a la rizósfera de la uva de vino (*Vitis vinifera*), la concentración alta del 4-hydroxybenzoico impacta sobre un aumento en la diversidad de las bacterias (Guo y col., 2015). Esto coincide con lo encontrado en nuestros resultados, donde la mayor concentración de 4-hydroxybenzoico se encontró en la variedad de 'Joya' (Tabla 9), variedad con la mayor diversidad de bacterias (Tabla 6). Estos datos muestran que al igual que en la rizósfera, el 4-hydroxybenzoico es un metabolito de importancia en los exudados del fruto de la manzana para la modulación de las poblaciones bacterianas.

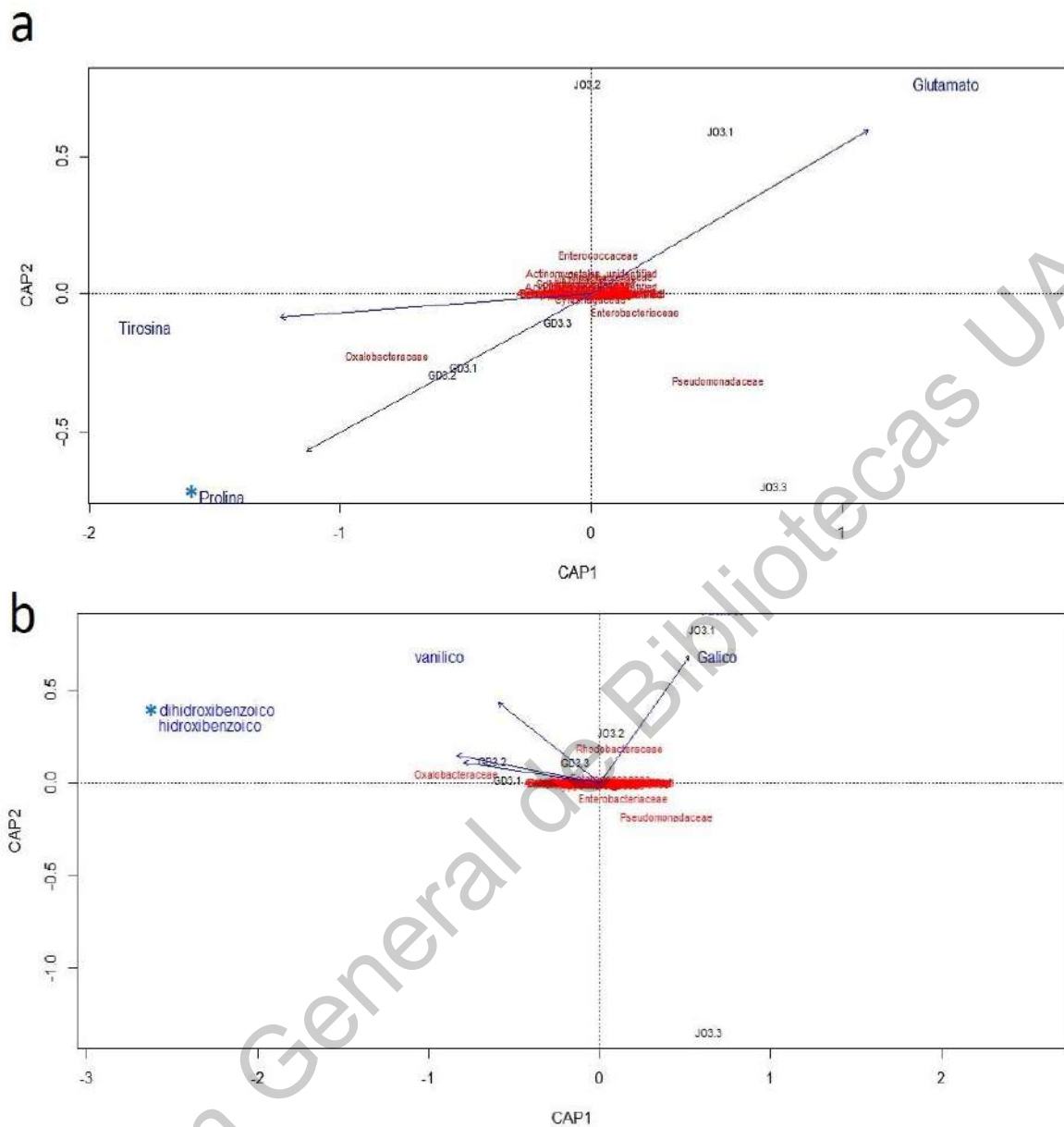


Figura 34. Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de las familias bacterianas y la concentración de aminoácidos (a) y polifenoles (b) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas. Se muestran con asterisco (*) los compuestos que mostraron tener un efecto en la composición bacteriana.

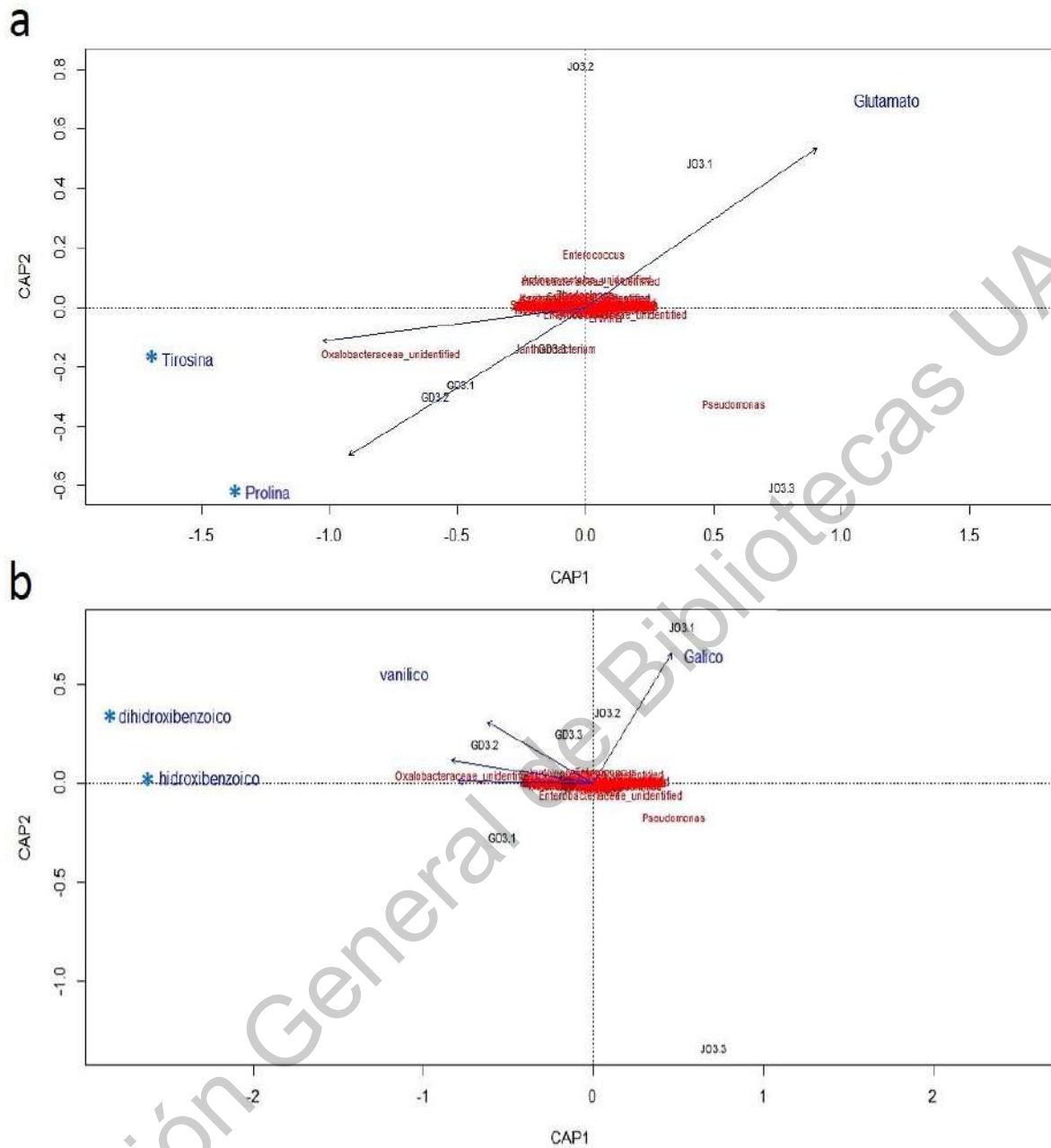


Figura 35. Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de los generos bacterianos y la concentración de aminoácidos (a) y polifenoles (b) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas. Se muestran con asterisco (*) los compuestos que mostraron tener un efecto en la composición bacteriana.

4.3.2.2 Hongos

En el caso de los hongos, el análisis de CAP mostró que un mayor número de compuestos mostraron tener efecto sobre la composición de la población fúngica a nivel de familia, en comparación con las bacterias, incluyendo el ácido málico, el manitol, el glutamato y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figura 36a, 36b y 36c; $p < 0.05$); mientras que a nivel de género solamente los ácidos 4-hidroxibenzoico y el vanílico tuvieron un efecto sobre la población bacteriana (Figura 37). El efecto de los exudados de las plantas sobre las poblaciones fúngicas se ha descrito en la rizósfera, donde la presencia o ausencia de ciertos compuestos como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos pueden estar relacionados con la diversidad de este tipo de microorganismos (Broeckling y col., 2008; Aira y col., 2010; Huang y col., 2014). En el caso del ácido málico, uno de los compuestos con efecto en las poblaciones fúngicas en nuestro estudio, se ha demostrado que junto con otros ácidos orgánicos como los ácidos oxálico y cítrico, pueden ser utilizados por hongos del género *Trichoderma*, favoreciendo así, su crecimiento en las raíces de pepino (Zhang y col., 2014). El manitol, también ha sido estudiado dentro de las interacciones entre los hongos que colonizan las raíces; por ejemplo, se ha encontrado que cuando el hongo *Heteroconium chaetospora* coloniza las raíces de la col china, disminuye la concentración de glucosa y aumenta la concentración de manitol en las raíces (Usuki y Narisawa, 2007). En hongos, el manitol se ha relacionado con la reserva de carbohidratos, resistencia a estrés ambiental y la dispersión de esporas (Solomon y col., 2007), lo cual podría explicar que para nuestros datos, este compuesto sí influyó en las poblaciones de hongos y no en las de bacterias. Por otro lado, en contraste con lo observado en las bacterias, el único aminoácido que tuvo efecto en las poblaciones fúngicas fue el glutamato. Hasta el momento no existen reportes relacionados con este aminoácido y la diversidad de hongos, pero se ha reportado que el glutamato juega un rol importante en el establecimiento de hongos patógenos como *Magnaporthe oryzae*, cuya patogénesis y desarrollo es afectado por la homeostasis del glutamato en la superficie de la planta (Zhou y col., 2018).

Al igual que las bacterias, se ha estudiado que en la relación planta-hongos el aumento de los polifenoles hidroxibenzoicos disminuye la densidad de hongos asociados a la raíz (Guo

y col., 2015). Esto coincide en lo descrito por Wu y col. (2009), los cuales encontraron que al crecer al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (principal patógeno del melón) en concentraciones elevadas del ácido hidroxibenzoico se inhibía el crecimiento del hongo, al igual que su esporulación. Por otro lado, uno de los polifenoles que también tuvo efecto fue el ácido vanílico; se ha demostrado que la presencia de este promueve el crecimiento y esporulación del hongo *Fusarium oxysporum* en plantas de *Rehmannia glutinosa* (Wu y col., 2015). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Speranza y col. (2020), donde observaron que en presencia del ácido vanílico, algunos hongos, incluyendo los géneros *Athelia*, *Fusarium* y *Penicillium* aumentaban su crecimiento. En conjunto estos datos muestran, que tanto para bacterias como para hongos, los exudados presentes en la superficie de la manzana pueden influir sobre la estructura de las poblaciones microbianas observadas.

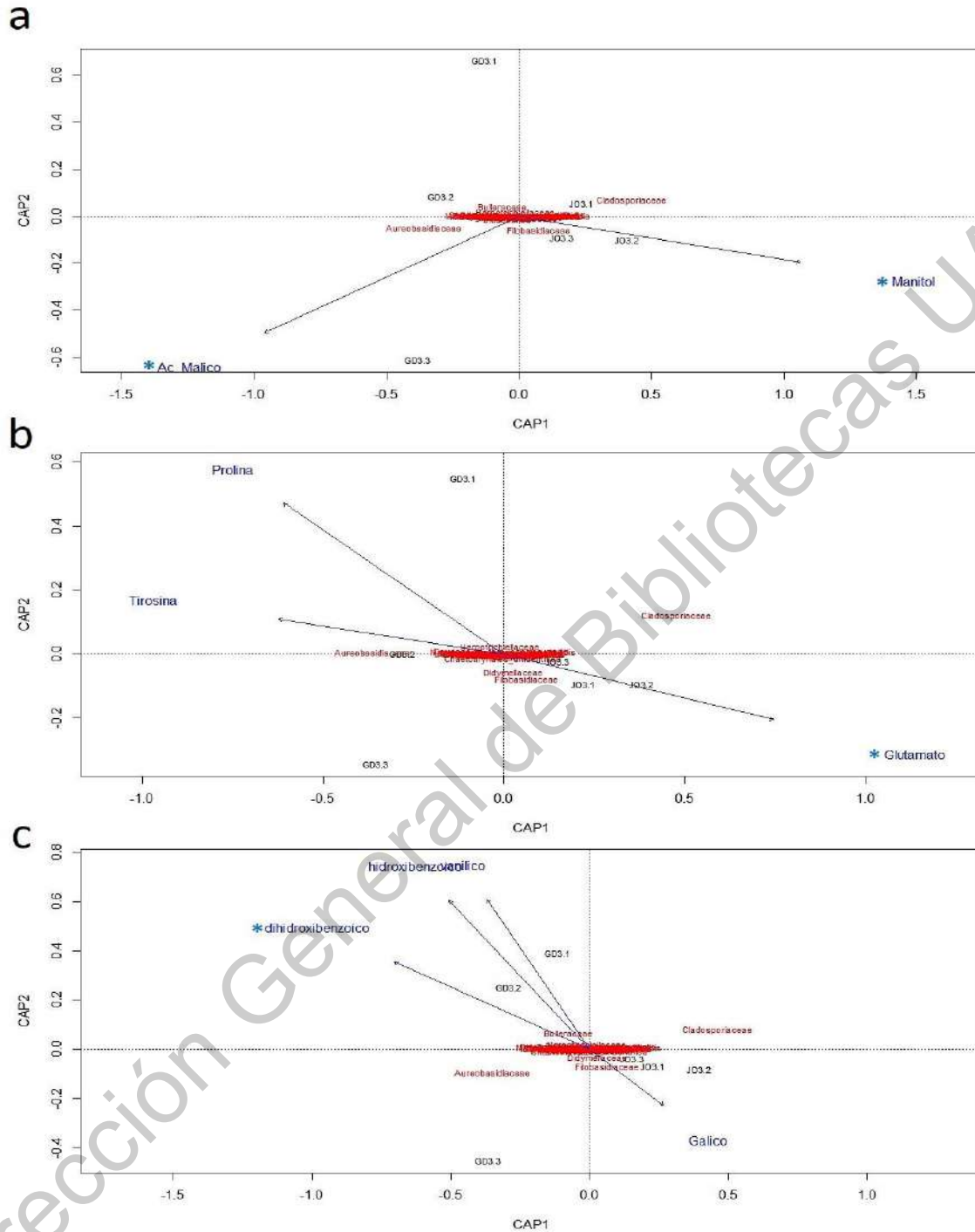


Figura 36. Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de las familias fungicas y la concentración de ácidos y azúcares (a), aminoácidos (b) y polifenoles (c) en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas. Se muestran con asterisco (*) los compuestos que mostraron tener un efecto en la composición bacteriana ($p < 0.05$).

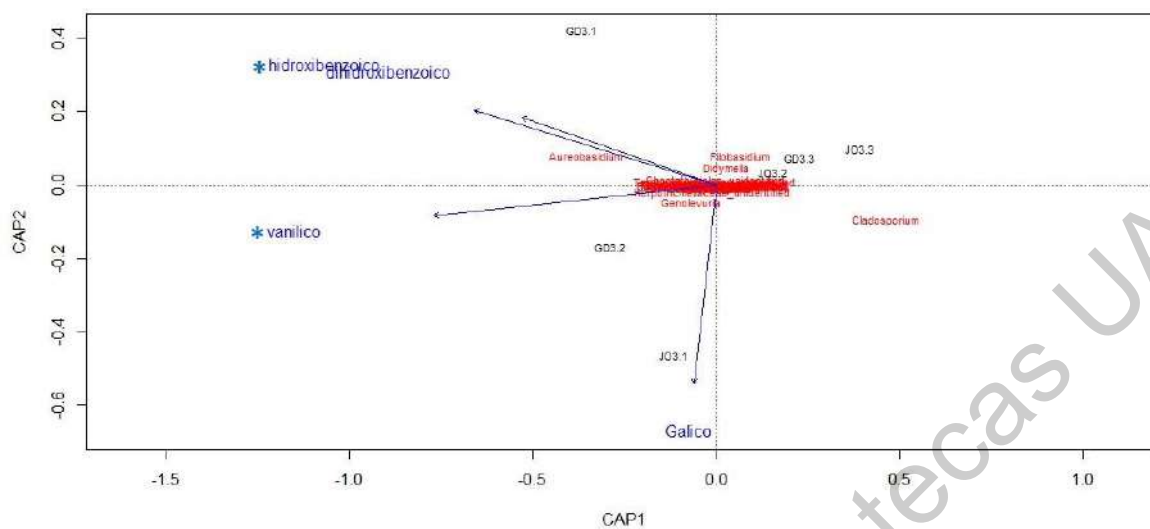


Figura 37. Análisis restringido de coordenadas principales (CAP) de los géneros fúngicos y la concentración de polifenoles en la etapa madura del fruto de las variedades estudiadas. Se muestran con asterisco (*) los compuestos que mostraron tener un efecto en la composición bacteriana ($p < 0.05$).

5 CONCLUSIONES

Las comunidades bacterianas y fúngicas de las variedades de manzanas evaluadas se van enriqueciendo (diversidad y densidad) durante el desarrollo del fruto en las tres variedades estudiadas ('Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious').

El género *Bacillus* fue el dominante en las poblaciones bacterianas determinadas en las variedades estudiadas en los años 2017 ('Joya', 'Royal Gala') y 2018 ('Joya', 'Royal Gala' y 'Golden Delicious') y las familias *Oxalobacteraceae* y *Pseudomonadaceae* fueron los dominantes en las poblaciones bacterianas en el fruto en el año 2019 ('Joya' y 'Golden Delicious'). En relación a las poblaciones fúngicas los predominantes fueron el género de hongos filamentosos *Cladosporium* y el género levaduriforme *Aureobasidium* en los tres años estudiados en las tres variedades de manzana.

Mediante técnicas moleculares se encontró que la variedad tuvo una influencia en la composición de las poblaciones bacterianas encontradas en el fruto ('Joya' y 'Golden Delicious') y con ello en el potencial metabólico relacionado con carbohidratos y aminoácidos; mientras que en las poblaciones fúngicas no fue relevante la variedad.

Las cepas bacterianas con capacidad antagonista contra *P. expansum* se encuentran en todas las etapas de desarrollo del fruto. Sin embargo, el fruto maduro es la etapa ideal para buscar bacterias con potencial antagonista en manzana, ya que se encuentran en mayor número, abundancia y potencial antifúngico.

La cepa *B. subtilis* subsp. *spizizenii* M24 aislada del fruto maduro de las variedades rojas 'Royal Gala' y 'Joya' en el año 2017, muestra potencial para desarrollar un inoculante microbiano para antagonizar *P. expansum*, la cual tiene capacidad de producir sideróforos y lipopéptidos pertenecientes a la familia de las fengicinas e iturinas, ambos posiblemente son los mecanismos de acción para el efecto antagonista contra *P. expansum*.

En el año 2018, los géneros *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lysinibacillus*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* aisladas de principalmente de la variedad ‘Golden Delicious’, mostraron capacidad antagonista contra *P. expansum*. A nivel de fruto, se encontró que la cepa *Pantoea* sp. M31.18 fue la que disminuyó la pudrición del fruto, mostrando que es capaz de producir sideróforos, lo cual posiblemente muestra que su mecanismo de acción contra *P. expansum* sea por competición de nutrientes.

En los exudados de los frutos (‘Joya’ y ‘Golden Delicious’) se detectó ácido málico, manitol, prolina, tirosina, glutamato, ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido vanílico. El ácido málico, la prolina, la tirosina y el glutamato son los principales compuestos que cambian durante el desarrollo del fruto en las variedades.

En la etapa de fruto maduro existen las mayores diferencias entre las variedades a nivel de los compuestos presentes en los exudados, siendo principalmente el ácido málico, el manitol, la prolina y la tirosina los compuestos diferenciales, y que mostraron mayores concentraciones en la variedad roja de ‘Joya’ en comparación con la variedad amarilla ‘Golden Delicious’.

Algunos compuestos presentes en los exudados de los frutos (‘Joya’ y ‘Golden Delicious’) se asocian a la composición microbiana presente. Una posibilidad es que los compuestos propicien la sobrevivencia de las poblaciones de microorganismos, a los que desde luego serían tolerantes, pero también es posible que sean producidos por los propios microorganismos. La tirosina, prolina, ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico se asocian con los géneros bacterianos; la prolina y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico con las familias bacterianas, el ácido málico, el manitol; el glutamato y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico con las poblaciones fúngicas a nivel de familia y el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido vanílico a nivel género de las poblaciones fúngicas.

En conjunto el presente estudio mostró la dinámicas que son las poblaciones microbianas asociadas de forma natural a la superficie de un fruto, en este caso la manzana, durante el proceso de maduración. El fruto, además de espacio de colonización, otorga a los microorganismos compuestos que posiblemente pueden ser utilizados por los microorganismos presentes, los cuales, en algunos casos pueden generar protección contra *P. expansum*, uno de los principales patógenos de la manzana en etapa poscosecha.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6 REFERENCIAS

- Abdelfattah, A., Whitehead, S. R., Macarisin, D., Liu, J., Burchard, E., Freilich, S. and Wisniewski, M. 2020. Effect of washing, waxing and low-temperature storage on the postharvest microbiome of apple. *Microorganisms*. 8: 1-20.
- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S. and Schena, L. 2016. Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research*. 3: 1-12.
- Abdel-Salam, M. S., Abd El-Halim, M. M. and El-Hamshary, O. I. M. 2007. Enhancement of *Enterobacter cloacae* antagonistic effects against the plant pathogen *Fusarium oxysporium*. *Journal of Applied Sciences Research*. 3: 848-852.
- Abdi, H. and Williams, L. J. 2010. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2: 433-459.
- Ackermann, J., Fischer, M., and Amado, R. 1992. Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Glockenapfel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1131-1134.
- Agirman, B. and Erten, H. 2020. Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* DSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing postharvest diseases. *Yeast*. 37: 437-448.
- Aira, M., Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Baath, E. and Domínguez, J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 2276-2281.
- Albdaiwi, R. N., Khyami-Horani, H., Ayad, J. Y., Alananbeh, K. M. and Al-Sayaydeh, R. 2019. Isolation and characterization of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria from durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) cultivated in saline areas of the dead sea region. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-16.

- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Couto, M., Judacewski, P., Mafra, L. I. and Nogueira, A. 2017. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. *Journal of Food Science and Technology*. 54: 1511-1518.
- Allard, S. M., Ottesen, A. R., and Micallef, S. A. 2020. Rain induces temporary shifts in epiphytic bacterial communities of cucumber and tomato fruit. *Scientific Reports*. 10: 1-10.
- Altieri, M.A. 2004. Linking ecologists and traditional farmers in the search for sustainable agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2, 35-42.
- Anderson M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*. 26: 32-46.
- Anderson, M. J. and Willis, T. J. 2003. Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology. *Ecology*. 84, 511-525.
- Andrews, S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data (Online).
- Angeli, D., Sare, A. R., Jijakli, M. H., Pertot, I. and Massart, S. 2019. Insights gained from metagenomic shotgun sequencing of apple fruit epiphytic microbiota. *Postharvest Biology and Technology*. 153: 96-106.
- Anguita-Maeso, M., Olivares-García, C., Haro, C., Imperial, J., Navas-Cortés, J. A. and Landa, B. B. 2020. Culture-dependent and culture-independent characterization of the olive xylem microbiota: effect of sap extraction methods. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1-14.
- Arif, I., Batool, M. and Schenk, P. M. 2020. Plant microbiome engineering: expected benefits for improved crop growth and resilience. *Trends in Biotechnology*. 38: 1385-1396.
- Armada, E., Roldán, A. and Azcon, R. 2014. Differential Activity of Autochthonous Bacteria in Controlling Drought Stress in Native Lavandula and Salvia Plants Species Under Drought Conditions in Natural Arid Soil. *Microbial Ecology*. 67: 410-420.
- Arrigoni, E., Antonielli, L., Pindo, M., Pertot, I. and Perazzolli, M. 2018. Tissue age and plant genotype affect the microbiota of apple and pear bark. *Microbiological Research*. 211: 57-68.
- Augimeri, R. and Strap, J. 2015. The Phytohormone Ethylene Enhances Cellulose Production, Regulates CRP/FNRKx Transcription and Causes Differential Gene

- Expression within the Bacterial Cellulose Synthesis Operon of *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) xylinus* ATCC53582. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-19.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R. and Korsten, L. 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29(4): 369-377.
- Aziz, M., Nadipalli, R., Xie, X., Sun, Y., Surowiec, K. and Zhang, J. 2016. Augmenting Sulfur Metabolism and Herbivore Defense in *Arabidopsis* by Bacterial Volatile Signaling. *Frontiers in Plant Science*. 7:458.
- Badri, D. V., Chaparro, J. M., Zhang, R., Shen, Q. and Vivanco, J. M. 2013. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *Journal of Biological Chemistry*. 288(7): 4502-4512.
- Ball, S. and Lloyd, L. 2011. Agilent Hi-Plex columns for carbohydrates, alcohols, and acids. *Application Note. Publication*. 4: 5990-8264.
- Baltrus, D. 2017, Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Current Opinion in Plant Biology*. 38,109-116.
- Baudoin, E., Benizri, E. and Guckert, A. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*. 19:135-145.
- Baum, C., El-Tohamy, W. and Gruda, N. 2015. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae*. 187: 131-141.
- Bensch, K., Groenewald, J., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B., Shin, H., Schroers, H., Braun, U y Crous, P. 2010. Species and acological diversity within the *Cladosporium cladosporoides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*. 67: 1-94.
- Berg, G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 11-18.
- Beshir, W. F., Tohge, T., Watanabe, M., Hertog, M. L., Hoefgen, R., Fernie, A. R. and Nicolai, B. M. 2019. Non-aqueous fractionation revealed changing subcellular

- metabolite distribution during apple fruit development. *Horticulture Research*. 6(1): 1-12.
- Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudière, O., Langin, T. and Prigent-Combaret, C. 2019. Does *in vitro* selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. *PloS one*. 14(12),1-12.
- Bevardi, M., Frece, J., Mesarek, D., Bošnjir, J., Mrvčić, J., Delaš, F. and Markov, K. 2013. Antifungal and antipatulic activity of *Gluconobacter oxydans* isolated from apple surface. *Arh Hig Rada Toksikol*. 64: 279-284.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M. and Mills, D. A. 2013. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111: 139-148.
- Bösch, Y., Britt, E., Perren, S., Naef, A., Frey, J. E. and Bühlmann, A. 2021. Dynamics of the Apple Fruit Microbiome after Harvest and Implications for Fruit Quality. *Microorganisms*. 9(2), 272.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K. and Vivanco, J. M. 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(3), 738-744.
- Brown, S. K. *Apple Varieties of Commercial Interest*. 1993. New York State Agricultural Experiment Station. Geneva, New York.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. and Schulze-Lefert, P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plant. *Annual Review of Plant Biology*. 64: 807-834.
- Burch, A., Do, P., Sbodio, A., Suslow, T and Lindowa, S. 2016. High-level culturability of epiphytic bacteria and frequency of biosurfactant producers on leaves. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 5997-6009.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M. E., Benuzzi, D., & de Tosetti, M. I. S. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 251-257.

- Cao, X. H., Liao, Z. Y., Wang, C. L., Yang, W. Y. and Lu, M. F. 2009. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 373-379.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K. and Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7, 335-336.
- Carmichael, P. C., Siyoum, N., Chidamba, L. and Korsten, L. 2017. Characterization of fungal communities of developmental stages in table grape grown in the northern region of South Africa. *Journal of Applied Microbiology*. 123: 1251-1262.
- Carvalhais, L., Dennis, P., Badri, D., Kidd, B., Vivanco, J. and Schenk, M. 2015. Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 9: 1049-1058.
- Castel, L., Irisarri, P., Pina, A. and Errea, P. 2020. Sugar content and organic acid profiles of local apple cultivars recovered from mountain zones. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 93: 217-224.
- Chaparro, J. M., Bradi D. and Vivanco J. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The International Society for Microbial Ecology Journal*. 8: 790-803.
- Chaparro, J. M., Bradi D., Bakker, M., Sugiyama, A., Manter, D. and Vivanco J. 2013. Root Exudation of Phytochemicals in *Arabidopsis* Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *PLOS ONE*. 8: 1-10.
- Chen, P. H., Chen, R. Y. and Chou, J. Y. 2018. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*. 46, 33-46.
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y. and Wang, Q. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology*. 115: 113-121.
- Chen, Y., Li, B., Zhang, Z. and Tian, S. 2017. Pathogenicity assay of *Penicillium expansum* on apple fruits. *Bio-Protocol*. 7: 1-6.

- Chou, M. Y., Heuvel, J. V., Bell, T. H., Panke-Buisse, K. and Kao-Kniffin, J. 2018. Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Scientific Reports*. 8: 1-9.
- Coleman-Derr, D. and Tringe, S. G. 2014. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-6.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Tanja Gretchen, W., Visel, A., Partida-Martinez, L. and Tringe, S. 2016. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*. 209: 798–811.
- Comeau, D., Novinscak, A., Joly, D. L. and Fillion, M. 2020. Spatio-temporal and cultivar-dependent variations in the cannabis microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1-14.
- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W. and Guttman, D. S. 2015. Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28: 274-285.
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M. and Vigentini, I. 2017. Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-20.
- Cosme, M., Lu, L., Stout, M., Franken, P. and Wurst, S. 2016. A fungal endophyte helps plants to tolerate root herbivory through changes in gibberellin and jasmonate signaling. *New Phytologist*. 211: 1065-1076.
- Cui, E., Fan, X., Li, Z., Liu, Y., Neal, A. L., Hu, C. and Gao, F. 2019. Variations in soil and plant-microbiome composition with different quality irrigation waters and biochar supplementation. *Applied Soil Ecology*. 142: 99-109.
- Cureau, N., Threlfall, R., Savin, M., Marasini, D., Lavefve, L. and Carbonero, F. 2021. Year, location, and variety impact on grape-, soil-, and leaf-associated fungal microbiota of Arkansas-grown table grapes. *Microbial Ecology*. 82: 73–86.
- Czarnecka, M., Żarowska, B., Połomska, X., Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2019. Role of biocontrol yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* in plants'

- defence mechanisms against *Monilinia fructicola* in apple fruits. Food Microbiology. 83: 1-8.
- Damm, C., Cannon, P. F., Johnst, P. R., Weir, B., Typifications, B. W. and Epitypifications, C. 2010. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology. 73, 1-36.
- DeGrand-Hoffman, G. and Perry, R.L. 1984. Apple Tree Growth and Development. Biological Monitoring in Apple Orchards. 5: 21-35.
- Demoz, B. T. and Korsten, L. 2006. Bacillus subtilis attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. Biological Control. 37: 68-74.
- Denman, S. Crous, P., Groenewald, J., Slippers, B., Wingfield, B. and Wingfield M. 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with *Proteaceae* based on morphology and DNA sequence data. Mycologia. 95: 294-307.
- Desgarences, D., Garrido, E., Torres-Gómez, M., Peña-Cabriales, J. and Partida-Martínez, L. 2014. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. FEMS Microbiology Ecology. 90: 844-857.
- Diskin, S., Feygenberg, O., Maurer, D., Droby, S., Prusky, D. and Alkan, N. 2017. Microbiome alterations are correlated with occurrence of postharvest stem-end rot in mango fruit. Phytobiomes. 1: 117-127.
- Domsch K.H., Gams W. y Anderson T.H. 2007. Compendium of Soil Fungi. (2da ed.) Alemania.
- Droby, S. and Wisniewski, M. 2018. The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. Postharvest Biology and Technology, 140: 107-112.
- Etminani, F. and Harighi, B. 2018. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. The Plant Pathology Journal, 34: 1- 20.
- Fan, S., Miao, L., Li, H., Lin, A., Song, F. and Zhang, P. 2020. Illumina-based analysis yields new insights into the diversity and composition of endophytic fungi in cultivated *Huperzia serrata*. PloS one. 15: 1-14.

- Feng, F., Li, M., Ma, F. and Cheng, L. 2014. Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus x domestica*) cultivars. Horticulture Research. 1: 1-7.
- Fernández, M.R., Parra, R. A. Pérez, S., Vera, J.M: y Zacatenco, M.G. 2010. Variedades de manzanas recomendadas para las serranías de Hidalgo Querétaro. INIFAP. Folleto Técnico No. 1-36. Distrito Federal, México.
- Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D. and Dangl, J. L. 2020. The plant microbiome: from ecology to reductionism and beyond. Annual review of microbiology. 74, 81-100
- Flores, M., Cerezo, F., Raya, F., Parra, G. y Cuellar, M. 2014. Producción de Manzana. Fautapo oficina regional chuquisaca. Sucre, Bolivia.
- Fourie, J. F. and Holz, G. 1998. Effects of fruit and pollen exudates on growth of *Botrytis cinerea* and infection of plum and nectarine fruit. Plant Disease. 82(2): 165-170.
- Francesco, A., Martini, C. and Mari, M. 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. European Journal of Plant Pathology. 145: 711-717.
- Fredriksson, N. J., Hermansson, M., & Wilén, B. M. 2013. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. PloS one. 8: 1-20.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. and Sarniguet, A. 2011. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiology Molecular Biology Reviews. 75:583-609.
- Galarza; L., Akagi, Y., Takao, K., Sun, C., Maekawa, N., Itai, A., Peralta, E. and Santos, E. 2015. Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. Journal of General Plant Pathology. 81: 201-210.
- Geană, E. I., Ciucure, C. T., Ionete, R. E., Ciocârlan, A., Aricu, A., Ficai, A. and Andronescu, E. 2021. Profiling of phenolic compounds and triterpene acids of twelve apple (*Malus domestica* borkh.) cultivars. Foods. 10: 1-16.

- Gercekcioglu, R. E. S. U. L., Cekic, C. and Filiz, A. 2004. Physiological and chemical changes during harvest maturity in apple cultivars. *Asian Journal of Chemistry*. 16: 1555-1561.
- Glenn, D. M., Bassett, C. and Dowd, S. E. 2015. Effect of pest management system on 'Empire' apple leaf phyllosphere populations. *Scientia Horticulturae*. 183: 58-65.
- Gomes, T., Pereira, J. A., Benhadi, J., Lino-Neto, T. and Baptista, P. 2018. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungal communities are shaped by different environmental factors in a Mediterranean ecosystem. *Microbial Ecology*. 76: 668-679.
- Gonçalves, C., Ferreira, C., Gonçalves, L. G., Turner, D. L., Leandro, M. J., Salema-Oom, M. and Gonçalves, P. 2019. A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-15.
- González López, M. D. C. 2012. Colonización de *Salmonella* spp. sobre manzanas 'Golden Delicious', 'Rayada' y 'Red Delicious' de la Sierra de Querétaro y su sobrevivencia a agentes germicidas (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro). Repositorio Institucional.
- Gopal, M. and Gupta, A. 2016. Microbiome Selection Could Spur Next Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-10.
- Granado, J., Thürig, B., Kieffer, E., Petrini, L., Fließbach, A., Tamm, L. and Wyss, G. S. 2008. Culturable fungi of stored 'golden delicious' apple fruits: a one-season comparison study of organic and integrated production systems in Switzerland. *Microbial Ecology*. 56: 720-732.
- Guo, X. W., Wang, B., Li, K., Liu, Z. D., Han, X., Xu, S. J. and Xie, H. G. 2015. Effect of 4-hydroxybenzoic acid on grape (*Vitis vinifera* L.) soil microbial community structure and functional diversity. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 29(4): 637-645.
- Han, S. and Micallef, S. 2016. Environmental Metabolomics of the Tomato Plant Surface Provides Insights on *Salmonella enterica* Colonization. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 3131-3142.

- Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M. and Gao, X. 2019. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins*. 11(5): 1-12.
- Harding, M., Nadworny, P., Buziak, B., Omar, A., Daniels, G. and Feng, J. 2019. Improved methods for treatment of phytopathogenic biofilms: metallic compounds as anti-bacterial coatings and fungicide tank-mix partners. *Molecules*. 24: 1-12.
- Harris, S., Robinson, J. and Juniper, B. 2002. Genetic clues to the origin of the Apple. *Trends in Genetics*. 8: 426-430.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemini, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior*. 7(11): 1456-1466.
- Hayes, R. A., Rebolleda-Gómez, M., Butela, K., Cabo, L. F., Cullen, N., Kaufmann, N., and Ashman, T. L. 2021. Spatially explicit depiction of a floral epiphytic bacterial community reveals role for environmental filtering within petals. *Microbiology Open*. 10: 1-15.
- Henderson, J. W., Ricker, R. D. and Bidlingmeyer, B. A. 2000. Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC. *Agilent Technical Note*.
- Hong, C. E., Kim, J. U., Lee, J. W., Bang, K. H. and Jo, I. H. 2019. Metagenomic analysis of bacterial endophyte community structure and functions in *Panax ginseng* at different ages. *3 Biotech*. 9: 1-8.
- Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q. and Vivanco, J. M. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*. 92(4): 267-275.
- Huo, Y., Kang, J. P., Park, J. K., Li, J., Chen, L. and Yang, D. C. 2018. *Rhodanobacter ginsengiterrae* sp. nov., an antagonistic bacterium against root rot fungal pathogen *Fusarium solani*, isolated from ginseng rhizospheric soil. *Archives of Microbiology*. 200(10): 1457-1463.
- Iglesias, I., Carbó, J. Bonany, J., Dalmau, R., Guanter, G., Montserrat, R. Moreno, A. y Pegés, J.M. 2001. *Manzano: Las variedades de más interés*. Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias. Montbui, Barcelona.

- Irvine, K. M., Dinger, E. C. and Sarr, D. 2011. A power analysis for multivariate tests of temporal trend in species composition. *Ecology*. 92: 1879-1886.
- Jackson, C. R., Randolph, K. C., Osborn, S. L. and Tyler, H. L. 2013. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiology*. 13: 1-12.
- Jacoby, R. P. and Kopriva, S. 2019. Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: new tools and approaches to analyse metabolic mechanisms of plant-microbe nutrient exchange. *Journal of Experimental Botany*. 70(4): 1087-1094.
- Jan, I. and Rab, A. 2012. Influence of storage duration on physico-chemical changes in fruit of apple cultivars. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 22: 708-714.
- Janisiewicz, W. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology*. 86(5): 473-479.
- Janisiewicz, W. J., Jurick, W. M. 2nd, Peter, K. A., Kurtzman, C. P. and Buyer, J. S. 2014. Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest. *Yeast* 31: 207-218.
- Janisiewicz, W. J., Nichols, B., Bauchan, G., Chao, T. C. and Jurick II, W. M. 2016. Wound responses of wild apples suggest multiple resistance mechanism against blue mold decay. *Postharvest Biology and Technology*. 117: 132-140.
- Jauk, F. 2019. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. In *Hematología: Volumen 23-Extraordinario XXIV Congreso Argentino (Vol. 4, p. 21)*. Sociedad Argentina de Hematología.
- Jiang, L., Jeong, J. C., Lee, J. S., Park, J. M., Yang, J. W., Lee, M. H. and Lee, J. 2019. Potential of *Pantoea dispersa* as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. *Scientific Reports*. 9: 1-13.
- Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S. and Winkelhausen, E. 2014. Oligosaccharide profile in fruits and vegetables as sources of prebiotics and functional foods. *International Journal of Food Properties*. 17: 949-965.
- Kameshwar, A. K. and Qin, W. 2018. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*. 9: 93-105.

- Kant, M. R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J. and Alba, J. M. 2015. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Annals of Botany*. 115: 1015-1051.
- Kartadi, S. F., and Salmah, A. 2019. Combined use of *Enterobacter cloacae* MB20 and the microelements of copper and manganese to control damping-off of tomato. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 308, No. 1, p. 012025). IOP Publishing.
- Klich M.A. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Australia.
- Kliewer, W. M. 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *Journal of Food Science*, 35, 17-21.
- Knief, C. 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-23.
- Kniskern, J.M., Traw, M.B. and Bergelson, J. 2007. Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 1512–1522.
- Köhl, J., Scheer, C., Holb, I. J., Masny, S. and Molhoek, W. 2015. Toward an integrated use of biological control by *Cladosporium cladosporioides* H39 in apple scab (*Venturia inaequalis*) management. *Plant Disease*. 99: 535-543.
- Koljalg U. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi. *Molecular Ecology*. 22: 5271-5277.
- Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N. and Ueda, J. E. 2002. Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*. 96(1-4): 177-185.
- Korsten, J.S. L. 1996. Microbes Associated with the Avocado Flower and Fruit: The Good, the Bad and the Ugly. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 19: 39-40. Pretoria, Sudrfrica.
- Kuczynski, J. 2012. Using QIIME to analyze 16s rRNA gene sequences from 398 microbial communities. *Current Protocols in Microbiology*, pp.1-28.

- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G. and Knight, R. 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*. 36: 10-7.
- Kumar, A. S., Sridar, R. and Uthandi, S. 2017. Mitigation of drought in rice by a phyllosphere bacterium *Bacillus altitudinis* FD48. *African Journal of Microbiology Research*. 11(45): 1614-1625.
- Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R. K., Dudeja, S. S. and Narula, N. 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Basic Microbiology*. 47: 436-439.
- Laforest-Lapointe, I., Messier, C. and Kembel, S. W. 2016. Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome*. 4: 1-10.
- Lamichhane, J. R. and Venturi, V. 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-13.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A. and Huttenhower, C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*. 31: 814-821.
- Leach, J. E., Triplett, L. R., Argueso, C. T. and Trivedi, P. 2017. Communication in the phytobiome. *Cell*. 169: 587-596.
- Lee, J., Chan, B. L. S. and Mitchell, A. E. 2017. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). *Food Chemistry*. 215: 301-310.
- Leff, J. W. and Fierer, N. 2013. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PloS One*. 8: 1-9.
- Li, M., Feng, F. and Cheng, L. 2012. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PloS One*. 7: 1-14.
- Li, Y., Han, L. R., Zhang, Y., Fu, X., Chen, X., Zhang, L. and Wang, Q. 2013. Biological control of apple ring rot on fruit by *Bacillus amyloliquefaciens* 9001. *The plant Pathology Journal*. 29: 168-173.

- Lindow, S.E. and Leveau, J. H. 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*.13, 238-243.
- Ling, N., Raza, W., Ma, J., Huang, Q., and Shen, Q. 2011. Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*. 47: 374-379.
- Liu, J., Abdelfattah, A., Norelli, J., Burchard, E., Schena, L., Droby, S. and Wisniewski, M. 2018. Apple endophytic microbiota of different rootstock/scion combinations suggests a genotype-specific influence. *Microbiome*. 6: 1-11.
- Luziatelli, F., Ficca, A. G., Colla, G., Baldassarre Švecová, E. and Ruzzi, M. 2019. Foliar application of vegetal-derived bioactive compounds stihhajeo mulates the growth of beneficial bacteria and enhances microbiome biodiversity in lettuce. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1-12.
- Ma, B., Ding, Y., Li, C., Li, M., Ma, F. and Yuan, Y. 2019. Comparative proteomic analysis reveals key proteins linked to the accumulation of soluble sugars and organic acids in the mature fruits of the wild *Malus* species. *Plants*. 8: 1-14.
- Ma, S., Neilson, A. P., Lahne, J., Peck, G. M., O'Keefe, S. F. and Stewart, A. C. 2018. Free amino acid composition of apple juices with potential for cider making as determined by UPLC-PDA. *Journal of the Institute of Brewing*. 124: 467-476.
- Mahmoud, H., Amgad, A. S., Anas, E. and Youne Y. M. 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato Fusarium Wilt. *The Plant Pathology Journal*. 31: 50-60.
- Mäkinen, K. K. and Söderllng, E. V. A. 1980. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. *Journal of Food Science*. 45: 367-371.
- Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Tikhonovich, I. and Lugtenberg, B. 2011. Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microbial Biotechnology*. 4(4): 523-532.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W. and Bertolini, P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 73: 56-62.

- Martínez, R. 2014. Catálogo de Genotipos De Manzana Para La Sierra De Querétaro: Descripción, calidad, tolerancia a enfermedades y vocación agroindustrial. CONACYT. Querétaro, QRO, México.
- Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A. and Minhas, P. S. 2017. Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1-14.
- Mercier J, and Lindow S.E: 2001. Field performance of antagonistic bacteria identified in a novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. *Biological Control*. 22: 66-71.
- Mimida, N. Kotoda, N., Ueda, T., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Iwanami, H., Moriya, S. and Abe, K. 2009. Four TFL1/CEN-Like Genes on Distinct Linkage Groups Show Different Expression Patterns to Regulate Vegetative and Reproductive Development in Apple (*Malus×domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiol*. 50: 394-412.
- Muir, J. G., Rose, R., Rosella, O., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J. and Gibson, P. R. 2009. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 554-565.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y. and Vorholt, J. A. 2016. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual review of genetics*. 50: 211-234.
- Munoz-Ucros, J., Zwetsloot, M. J., Cuellar-Gempeler, C. and Bauerle, T. L. 2021. Spatiotemporal patterns of rhizosphere microbiome assembly: From ecological theory to agricultural application. *Journal of Applied Ecology*. 58(5): 894-904.
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z. and Knight, R. 2013. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods in enzymology*. 531: 371-444.
- Nguyen, D., Rieu, I., Mariani, C., and Van Dam, N. 2016. How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory. *Plant Molecular Biology*. 91: 727-740.
- Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E. and Karaoglanidis, G. S. 2015. Identification, characterization and mycotoxigenic ability

- of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 197: 22-29.
- Oksanen J, Guillaume-Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH and Wagner H. 2013. VEGAN: community ecology package. R package, version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ortega-Beltran, A., Moral, J., Puckett, R. D., Morgan, D. P., Cotty, P. J. and Michailides, T. J. 2018. Fungal communities associated with almond throughout crop development: Implications for aflatoxin biocontrol management in California. *PLoS One*. 13: 1-15.
- Ortiz-Ojeda, P., Ogata-Gutiérrez, K. and Zúñiga-Dávila, D. 2017. Evaluation of plant growth promoting activity and heavy metal tolerance of psychrotrophic bacteria associated with maca (*Lepidium meyenii* Walp.) rhizosphere. *AIMS Microbiology*. 3: 1-12.
- Ottesen, A. R., Gorham, S., Reed, E., Newell, M. J., Ramachandran, P., Canida, T. and White, J. R. 2016. Using a control to better understand phyllosphere microbiota. *PLoS one*. 11: 1-16.
- Ottesen, A. R., Peña, A. G., White, J. R., Pettengill, J. B., Li, C., Allard, S. Rideout, S., Allard, M., Hill, T., Evans, P., Strain, E., Musser, S., Knight, R. and Brown, E. 2013. Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant. *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*. 13: 1-11.
- Ottesen, A., Skaltsas, D., White, J. R., Gorham, S., Ramachandran, P., Brown, E. and Walsh, C. 2016b. Using next generation sequencing to describe epiphytic microbiota associated with organic and conventionally managed apples. *International Journal of Environmental and Agriculture Research*. 2: 36-42.
- Padgett, M. and Morrison. J. 1990. Changes in Grape Berry Exudates during Fruit Development and Their Effect on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 115: 269- 273.
- Parakhia, M. V. and Golakiya, B. A. 2018. Manipulation of phytobiome: a new concept to control the plant disease and improve the productivity. *Journal Bacteriology Mycology Open Access*. 6: 322-324.
- Pereg, L. and McMillan, M. 2015. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 80: 349-358.

- Phillips, R. P. and Fahey, T. J. 2005. Patterns of rhizosphere carbon flux in sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula allegheniensis*) saplings. *Global Change Biology*. 11(6): 983-995.
- Piagentini, A. M. and Pirovani, M. E. 2017. Total phenolics content, antioxidant capacity, physicochemical attributes, and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. *International Journal of Fruit Science*. 17: 102-116.
- Piombo, E., Abdelfattah, A., Danino, Y., Salim, S., Feygenberg, O., Spadaro, D. and Droby, S. 2020. Characterizing the fungal microbiome in date (*Phoenix dactylifera*) fruit pulp and peel from early development to harvest. *Microorganisms*. 8: 1-15.
- Pitt J.I. 1991. A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO Division of Food Science. Australia.
- Plotkowski, D. and Cline, J. A. 2021. Evaluation of select cider apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars grown in Ontario. II. Juice Attributes. *Canadian Journal of Plant Science*. 56: 1041-1052.
- Prakitchaiwattana, C., Fleet, G. H. and Heard, G. M. 2020. Nutrients for yeast growth on grape berry exudates. *Science Technology and Engineering Journal (STEJ)*, 6(2): 1-11.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O. and Mazzola, M. 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 99: 571-581.
- Pusey, P. L., Stockwell, V. O., Reardon, C. L., Smits, T. H. M. and Duffy, B. 2011. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. *Phytopathology*. 101(10): 1234-1241.
- Qin, H., Lu, K., Strong, P.J., Xu, Q., Wu, Q., Xu, J., Wang, H. and Xu, Z. 2015. Long-term fertilizer application effects on the soil, root arbuscular mycorrhizal fungi and community composition in rotation agriculture. *Applied Soil Ecology*. 89: 35-43.
- Qin, S. J., Li, F. D., Lv, D. G. and Gao, W. S. 2012. Effect of preharvest bagging on fruit epidermis epiphyte community structure of 'Red Fuji' apple. *Middle East Journal of Scientific Research*. 12: 1276-1281.

- Rastogi, G., Gitta L. C. and Leveau, J. H. J. 2013. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiology Letters*. 348: 1-10.
- Rice, T., Sahin, A. W., Lynch, K. M., Arendt, E. K. and Coffey, A. 2020. Isolation, characterisation and exploitation of lactic acid bacteria capable of efficient conversion of sugars to mannitol. *International Journal of Food Microbiology*. 321: 1-9.
- Rocheffort, A., Briand, M., Marais, C., Wagner, M. H., Laperche, A., Vallée, P., and Sarniguet, A. 2019. Influence of environment and host plant genotype on the structure and diversity of the *Brassica napus* seed microbiota. *Phytobiomes Journal*. 3: 326-336.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Juárez-Campusano, Y. S., Delgado, G. and Pacheco Aguilar, J. R. 2019. Identification of lipopeptides from *Bacillus* strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. *Postharvest Biology Technology*. 155: 72-79.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E. and Droby, S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*. 55: 69-76.
- Ryffel, F., Helfrich, E., Kiefer, P., Peyriga, L., Portais, J-C., Piel, J and Vorholt, J. 2016. Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves. *The ISME Journal*. 10: 632-643.
- Sakai, A. 1966. Seasonal variations in the amounts of polyhydric alcohol and sugar in fruit trees. *Journal of Horticultural Science*. 41: 207-213.
- Saleem, M., Meckes, N., Pervaiz, Z. H., and T raw, M. B. 2017. Microbial interactions in the phyllosphere increase plant performance under herbivore biotic stress. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-10.
- Sartori, M., Nesci, A., Formento, A. and Etcheverry, M. 2015. Selection of potential biological control of *Exserohilum turcicum* with epiphytic microorganisms from maize. *Revista Argentina de Microbiología*. 47: 72-71.
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M. A., Sessitsch, A. and Hafeez, F. Y. 2018. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS ONE* 13: 1-15.

- Sasse, J., Martinoia, E. and Northen, T. 2017. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in plant science*. 23, 25-41.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R. and Bahadur, H. 2014. Trichoderma species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *Journal of Basic Microbiology*. 55: 195-206.
- Schlaeppli, K. and Bulgarelli, D. 2015. The Plant Microbiome at Work. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28: 212-217.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56.
- Shade, A., Jacques, M. A. and Barret, M. 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*. 37: 15-22.
- Shafi, J., Tian, H. and Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31(3): 446-459.
- Shen, Y., Nie, J., Li, Z., Li, H., Wu, Y., Dong, Y. and Zhang, J. 2018. Differentiated surface fungal communities at point of harvest on apple fruits from rural and peri-urban orchards. *Scientific Reports*. 8: 1-12.
- Shendure, J. and Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. 26: 1135-1145.
- Shrestha, B.K., Karki H.S., Groth D.E., Jungkhun N. and Ham J.H. 2016. Biological Control Activities of Rice-Associated *Bacillus* sp. Strains against Sheath Blight and Bacterial Panicle Blight of Rice. *PLoS ONE*. 11: 1-18.
- Shridhar, B. S. 2012. Nitrogen fixing microorganisms. *International Journal Microbiology*. 3: 46-52.
- Singh, P., Santoni, S., This, P. and Péros, J. P. 2018. Genotype-environment interaction shapes the microbial assemblage in grapevine's phyllosphere and carposphere: an NGS approach. *Microorganisms*. 6: 1-12.
- Singh, P., Santoni, S., Weber, A., This, P. and Péros, J. P. 2019. Understanding the phyllosphere microbiome assemblage in grape species (*Vitaceae*) with amplicon sequence data structures. *Scientific Reports*. 9: 1-11.

- Sista Kameshwar, A. K., and Qin, W. 2018. Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*. 9(2), 93-105.
- Soares, M., Hai-Yan L., Kurt P. K., Bergen, M., Torres, M. and White, F. 2016. Evaluation of the functional roles of fungal endophytes of *Phragmites australis* from high saline and low saline habitats. *Biological Invasions*. 9: 2689-2702.
- Solomon, P. S., Waters, O. D. and Oliver, R. P. 2007. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*. 15: 257-262.
- Soto-Muñoz, L. y Martínez-Peniche, R. A. 2009. Efecto de levaduras antagónicas y bicarbonato de sodio sobre *Penicillium expansum* Link en dos variedades de manzana. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 15: 211-216.
- Speranza, B., Cibelli, F., Baiano, A., Carlucci, A., Raimondo, M. L., Campaniello, D. and Rosaria Corbo, M. 2020. Removal Ability and Resistance to Cinnamic and Vanillic Acids by Fungi. *Microorganisms* 8(6): 1-19.
- Stephan, M., Bangerth, F. and Schneide, G. 1999. Quantification of endogenous gibberellins in exudates from fruits of *Malus domestica*. *Plant Growth Regulation*. 28: 55-58.
- Stewart, E. J. 2012. Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*, 194(16): 4151-4160.
- Sun, J., Janisiewicz, W. J., Nichols, B., Jurick II, W. M., and Chen, P. 2017. Composition of phenolic compounds in wild apple with multiple resistance mechanisms against postharvest blue mold decay. *Postharvest Biology and Technology*. 127: 68-75.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. and Mittler, R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*. 203, 32-43.
- Swain, H., Adak, T., Mukherjee, A. K., Mukherjee, P. K., Bhattacharyya, P., Behera, S. and Jena, M. 2018. Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. *Microbiological Research*. 214: 83-90.
- Swami, S., Muzammil, R., Saha, S., Shabeer, A., Oulkar, D., Banerjee, K. and Singh, S. B. 2016. Evaluation of ozonation technique for pesticide residue removal and its effect on ascorbic acid, cyanidin-3-glucoside, and polyphenols in apple (*Malus domestica*) fruits. *Environmental Monitoring and Assessment*. 188: 1-11.

- Taïbi, A., Rivallan, R., Broussolle, V., Pallet, D., Lortal, S., Meile, J. C. and Constancias, F. 2020. Terroir is the main driver of the epiphytic bacterial and fungal communities of mango carposphere in Reunion Island. *Frontiers in Microbiology*. 11: 1-19.
- Tang, H., Li, C., Li, W., Wen, L., Shi, L., Cheng, K. and Wang, K. 2021. Microbial structure of carbon source utilization in rice rhizosphere and non-rhizosphere soils with different short-term tillage management. *Land Degradation and Development*. 32(3): 1570-1580.
- TaoBing, Y., Lang, C., Qi, L., ShaSha, W., Yuan, Z., Hongbin, Z. and Tengxiang, L. 2021. Effects of Waterlogging on Soybean Rhizosphere Microbial Community Profiled Using Illumina MiSeq, LoopSeq, and PacBio 16S rRNA Genes Sequences. *Research Square*. 1: 1-31.
- Teixidó, N., Usall, J., Magan, N. and Viñas, I. 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Annals of Applied Biology*. 134: 109-116.
- Thapa, S. and Prasanna, R. 2018. Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome. *Annals of Microbiology*. 68: 229-245.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PloS one*. 7: 1-15.
- Toranzo, J. 2016. Producción mundial de manzanas y peras: Programa Nacional Frutales. Ediciones INTAAllen, Argentina.1: 1-40.
- Torres, R., Valentines, M. C., Usall, J., Vinas, I. and Larrigaudiere, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 27(3): 235-242.
- Tosco, A., Chobelet, A., Bathany, K., Schmitter, J. M., Buré, C. and Urdaci, M. C. 2015. Characterization by tandem mass spectrometry of biologically active compounds produced by *Bacillus* strains. *Journal of Applied Bioanalysis*. 1(1): 1-14.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T. and Singh, B. K. 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*. 18: 607-621.

- Usuki, F., and Narisawa, K. 2007. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia*. 99(2): 175-184.
- Vacher, C., Sauer, U., Hampe, A., Porté, A., Sauer, U., Compant, S. and Morris C. 2016. The Phyllosphere: Microbial Jungle at the Plant–Climate Interface. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.47: 1-24.
- Vandenkoornhuysen, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. and Dufresne, A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 206: 1196-1206.
- Vepškaitė Monstavičė, I., Lukša, J., Stanevičienė, R., Strazdaitė Žielienė, Ž., Yurchenko, V., Serva, S. and Servienė, E. 2018. Distribution of apple and blackcurrant microbiota in Lithuania and the Czech Republic. *Microbiological Research*. 206: 1-8.
- Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*/American Society of Plant Biologists. 8: 1-12.
- Vorholt, J. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews*. 10: 828-840.
- Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Tijana, G., Tringe, S. G., Dangl, J. L., and Mitchell-Olds, T. 2015. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications*. 7: 1-15.
- Wallace, R. L., Hirkala, D. L. and Nelson, L. M. 2017. Postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action. *Postharvest Biology Technology*. 133: 1-11.
- Wang, Y., Chai, X., Wang, X., Li, H., Xu, X., Wu, T. and Han, Z. 2020. Apple Scion Cultivars Regulate the Rhizosphere Microbiota of Scion/rootstock Combinations. *Research Square*. 1: 1-18.
- Wang, Y., Li, Y., Xu, W., Zheng, X., Zhang, X., Abdelhai, M. H. and Zhang, H. 2018. Exploring the effect of β -glucan on the biocontrol activity of *Cryptococcus podzolicus* against postharvest decay of apples and the possible mechanisms involved. *Biological Control*. 121: 14-22.
- Wassermann, B., Müller, H., and Berg, G. 2019. An apple a day: which bacteria do we eat with organic and conventional apples? *Frontiers in Microbiology*. 10: 16-29.

- Wei, K., Ma, C., Sun, K., Liu, Q., Zhao, N., Sun, Y. and Pan, L. 2020. Relationship between optical properties and soluble sugar contents of apple flesh during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 159: 1-19.
- Wen, C., Wu, L., Qin, Y., Van Nostrand, J. D., Ning, D., Sun, B., and Zhou, J. 2017. Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform. *PloS one*, 12, 1-20.
- Wen, Z., Duan, T., Christensen, M. J. and Nan, Z. 2015. *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* MB29 controls alfalfa root rot caused by *Fusarium semitectum*. *Biocontrol Science and Technology*. 25(8): 898-910.
- Wijesekara, W. M., Rajapakse, R. G. and Dissanayake, M. L. 2011. Effect of fruit and leaf exudates for the development of anthracnose and rust pathogens in uguressa. *The Journal of Agricultural Sciences*. 6: 77-83.
- Williams, T. R., Moyne, A. L., Harris, L. J. and Marco, M. L. 2013. Season, irrigation, leaf age, and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. *PloS one*. 8: 1-12.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J. and Schena, L. 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*. 122: 3-10.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., and Xiang, M. 2019. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 10: 127-140.
- Wu, H. S., Shen, S. H., Han, J. M., Liu, Y. D. and Liu, S. D. 2009. The effect in vitro of exogenously applied p-hydroxybenzoic acid on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathologia Mediterranea*. 48(3): 439-446.
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z. and Hu, X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*. 103: 88-93.
- Wu, L., Wang, J., Huang, W., Wu, H., Chen, J., Yang, Y. and Lin, W. 2015. Plant-microbe rhizosphere interactions mediated by *Rehmannia glutinosa* root exudates under consecutive monoculture. *Scientific Reports*. 5(1): 1-12.
- Yamagishi, N., Kishigami, R. and Yoshikawa, Y. 2014. Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant breeding

- technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotechnology Journal*. 1: 60-68.
- Yashiro, E. and McManus, P. S. (2012). Effect of streptomycin treatment on bacterial community structure in the apple phyllosphere. *PloS one*. 7: 1-8.
- Yashiro, E., Spear, R. N. and McManus, P. S. 2010. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology*. 110(5): 1284-1296.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L. and Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*. 47(2): 138-145.
- Zambell, C. B. and White, J. F. 2014. In the forest vine *Smilax rotundifolia*, fungal epiphytes show site-wide spatial correlation, while endophytes show evidence of niche partitioning. *Fungal Diversity*. 75: 279-297.
- Zeng, X., Wu, Q., Chen, D., Xie, F. and Li, Y. 2016. Phylogenetic analysis and symbiotic functional characterization of opa22-homologous genes in three rhizobial strains. *European Journal of Soil Biology*. 73: 15-25.
- Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U. N., Shi, S. and Brodie, E. L. 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*. 3: 470-480.
- Zhang, F., Meng, X., Yang, X., Ran, W. and Shen, Q. 2014. Quantification and role of organic acids in cucumber root exudates in *Trichoderma harzianum* T-E5 colonization. *Plant Physiology and Biochemistry*. 83: 250-257.
- Zhang, J., Wang, E. T., Singh, R. P., Guo, C., Shang, Y., Chen, J. and Liu, C. 2019. Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. *Journal of Applied Microbiology*. 126: 204-214.
- Zhang, Y., Li, P. and Cheng, L. 2010. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry*. 123: 1013-1018.

- Zhou, T., Chu, C., Liu, W. and Schaneider, K. 2001. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23: 246-252.
- Zhou, W., Shi, W., Xu, X. W., Li, Z. G., Yin, C. F., Peng, J. B. and Peng, Y. L. 2018. Glutamate synthase MoGlt1-mediated glutamate homeostasis is important for autophagy, virulence and conidiation in the rice blast fungus. *Molecular Plant Pathology*. 19(3): 564-578.
- Zhu, Z., Zhang, J., Wu, Y., Ran, W., & Shen, Q. 2013. Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(11): 2105-2114.

7 ANEXOS

Anexo I

Formulaciones de medios de cultivo y soluciones empleadas

- Solución amortiguadora de lavado: 6.75 g KH_2PO_4 , 8.75 g K_2HPO_4 , 1 mL Triton X-100 por litro, ajustado a un pH de 7.0.
- NYDA: Caldo nutritivo 8 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 10 g/L y agar 20 g/L.
- Agar V8: Jugo V8 200 mL/L, Carbonato de calcio 3 g/L y Agar 15 g/L.
- Agar de quitina coloidal al 0,5% (p/v): 7g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g K_2HPO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de caldo soya tripticasa, 15 g agar en un litro de agua destilada, ajustado a pH 6.0.
- Agar CAS: La solución 1 (indicador de Fe-CAS): contuvo 10 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM (en HCl 10 mM) y 50 ml de solución de CAS (1.21 mg ml⁻¹); la mezcla se añadió lentamente a 40 ml de una solución acuosa de HDTMA (1,82 mg/ml). La solución 2: contuvo 30,24 g de PIPES en 750 ml de una solución de sal (0,3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl), 1.0 g de NH_4Cl y 15 g de agar); el pH se ajustó a 6,8 con KOH al 50% y se añadió agua para llevar el volumen a 800 ml. La solución 3: contuvo 2 g de glucosa, 2 g de manitol, 493 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11 mg CaCl_2 , 1.17 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg H_3BO_3 , 0.04 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 1.2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 70 mL de agua destilada.

Anexo II

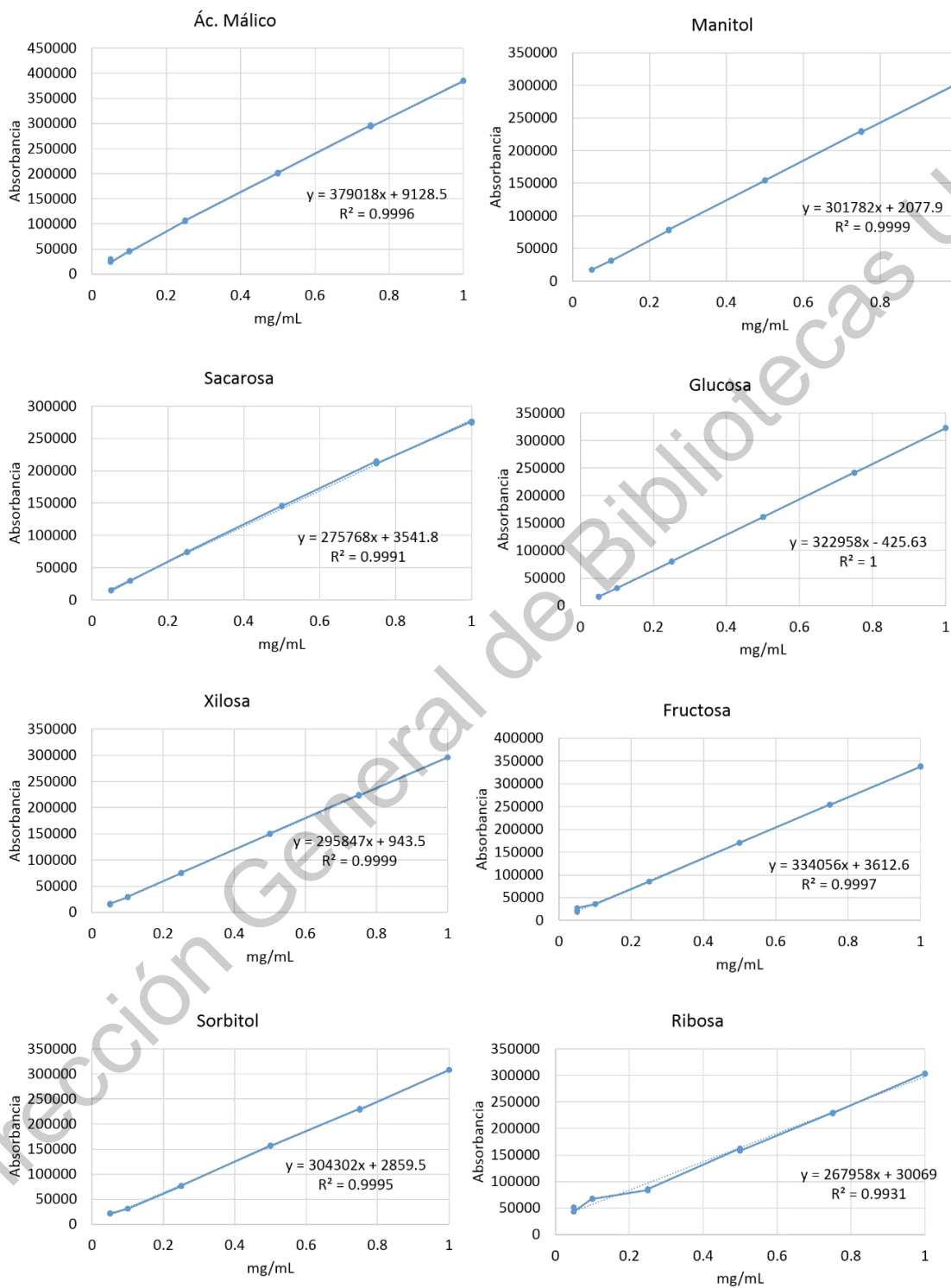


Figura A1. Curvas estándar de azúcares, azúcares alcoholes y ácidos orgánicos.

Anexo III

Tabla A1. Curvas estándar para aminoácidos.

Aminoácido	Tiempo de retención	Datos de la curva estándar (pmol/uL)
ASP	1.792	$y=0.0952x-0.2994$
GLU	3.79	$y=0.0879x-0.2168$
ASN	6.038	$y=2.0654x+2.6479$
SER	6.304	$y=0.0983x-0.2968$
GLN	6.936	$y=1.0107x+0.3716$
HIS	7.166	$y=0.0716x-0.4109$
GLY	7.503	$y=0.0956x-0.8918$
THR	7.699	$y=0.0990x-0.3423$
ARG	8.239	$y=0.1001x-0.5964$
ALA	8.889	$y=0.1029x-0.5381$
TYR	10.027	$y=0.0934x-0.4675$
CY2	11.492	$y=0.1472x-2.0912$
VAL	11.887	$y=0.1029x-0.3804$
MET	12.092	$y=0.1008x-0.4284$
TYP	12.895	$y=1.6446x+6.0767$
PHE	13.3	$y=0.0945x-0.5314$
ILE	13.4931	$y=0.0982x-0.3882$
LEU	14.125	$y=0.1001x-0.5408$
LYS	14.586	$y=0.1193x-3.0495$
PRO	17.654	$y=0.0690x+0.8281$

Anexo IV

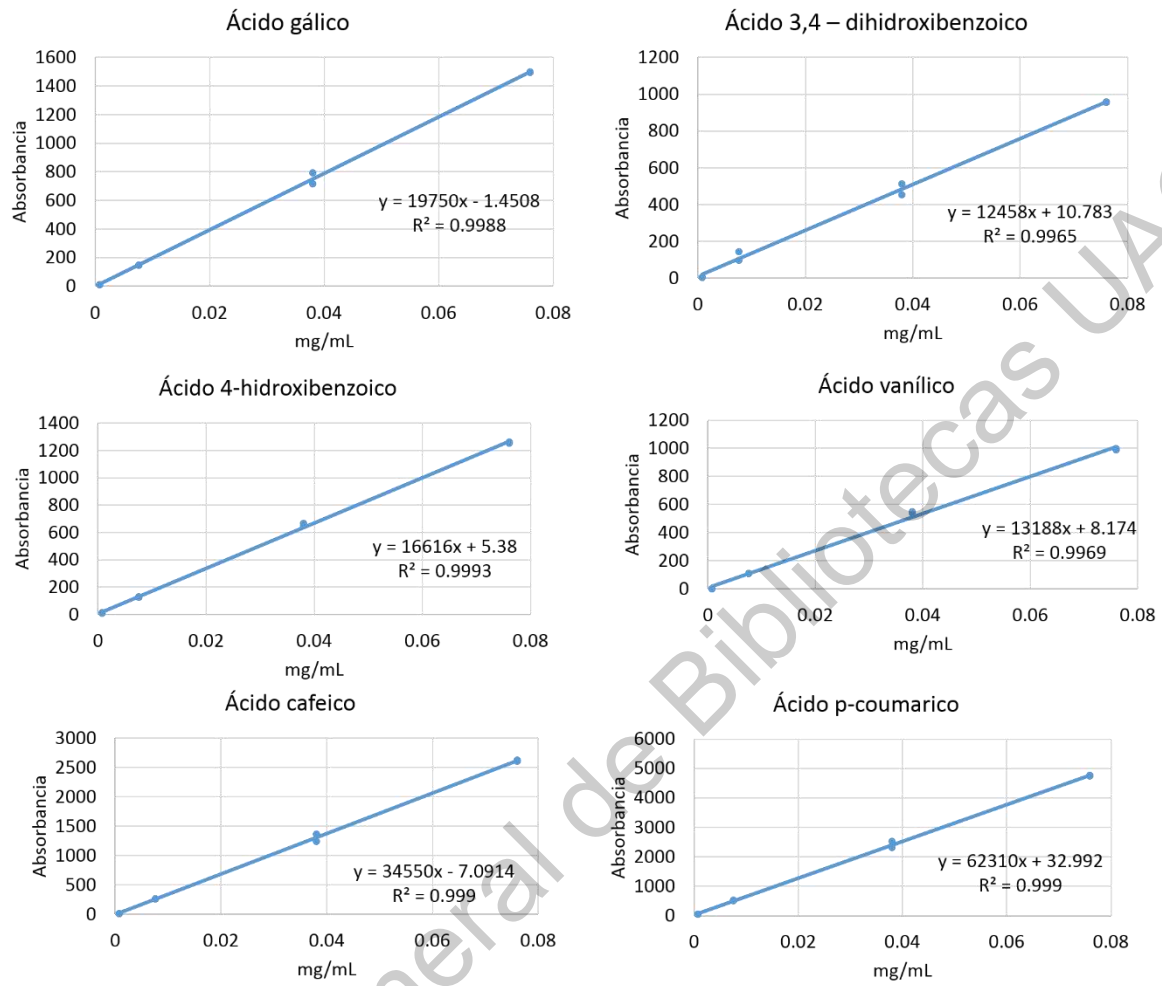


Figura A2. Curvas estándar para polifenoles.

Anexo V

Tabla A2. Identificación taxonómica a nivel de género de los hongos en los dos años de muestreo.

Año	ID ejemplo del morfotipo	Imagen macroscópica	Imagen microscópica	Género
	H5GJE1.2017			<i>Alternaria</i>
	H1GJE5.2017			<i>Cladosporium</i>
2017	H6GJE5.2017			<i>Colletotrichum</i>
	H10GJE5.2017			<i>Fusarium</i>

H7GJE5.2017



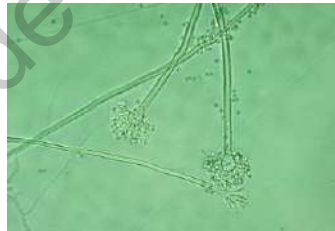
Penicillium

2018 H5GDE1.2018



Alternaria

H10GDE3.2018



Aspergillus

H5GJ E1.2018



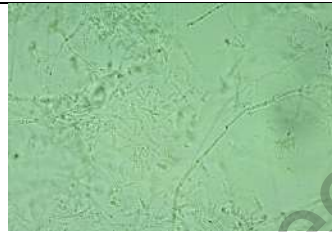
Beauveria

H2GDE1.2018



Cladosporium

H8GJE1.2018



Fusarium

H13GJE3.2018



Geotrichum

H11GJE1.2018



Penicillium

Anexo VI

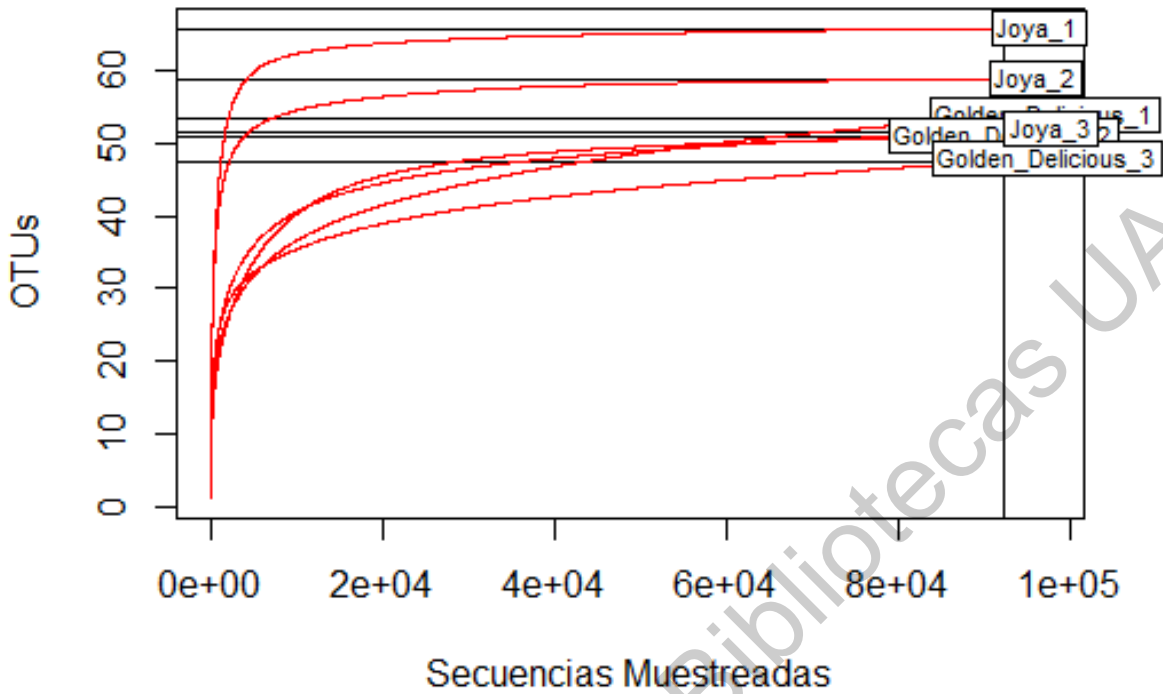


Figura A3. Curvas de rarefacción de las secuencias bacterianas en la etapa de fruto maduro de las muestras de las dos variedades estudiadas.

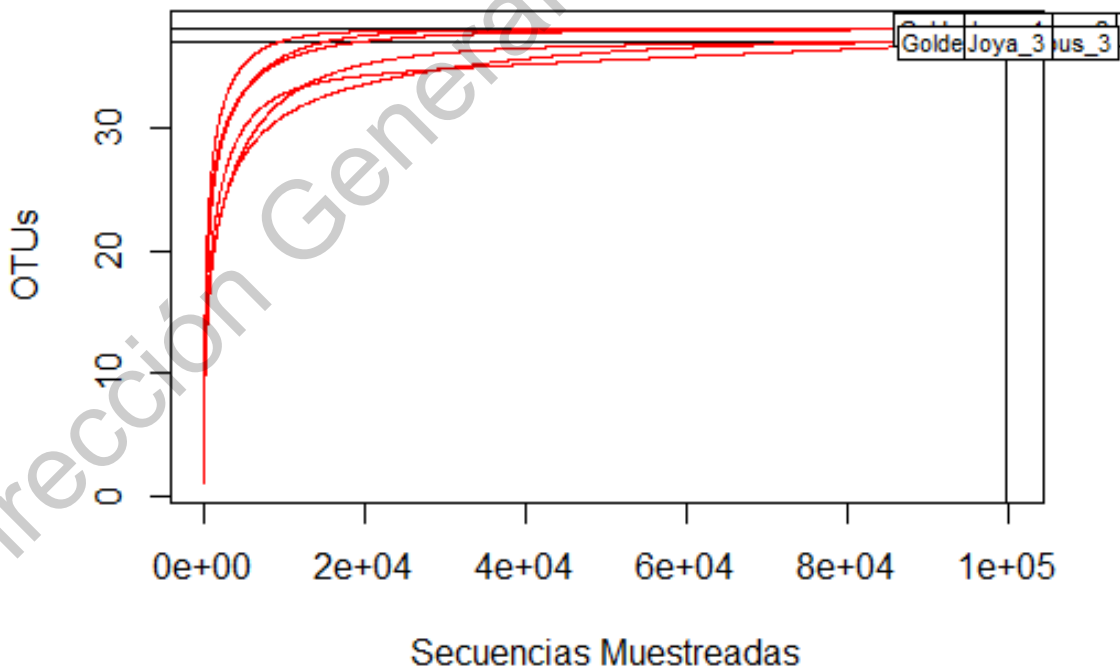


Figura A4. Curvas de rarefacción de las secuencias fungicas en la etapa de fruto maduro de las muestras de las dos variedades estudiadas.

Anexo VII

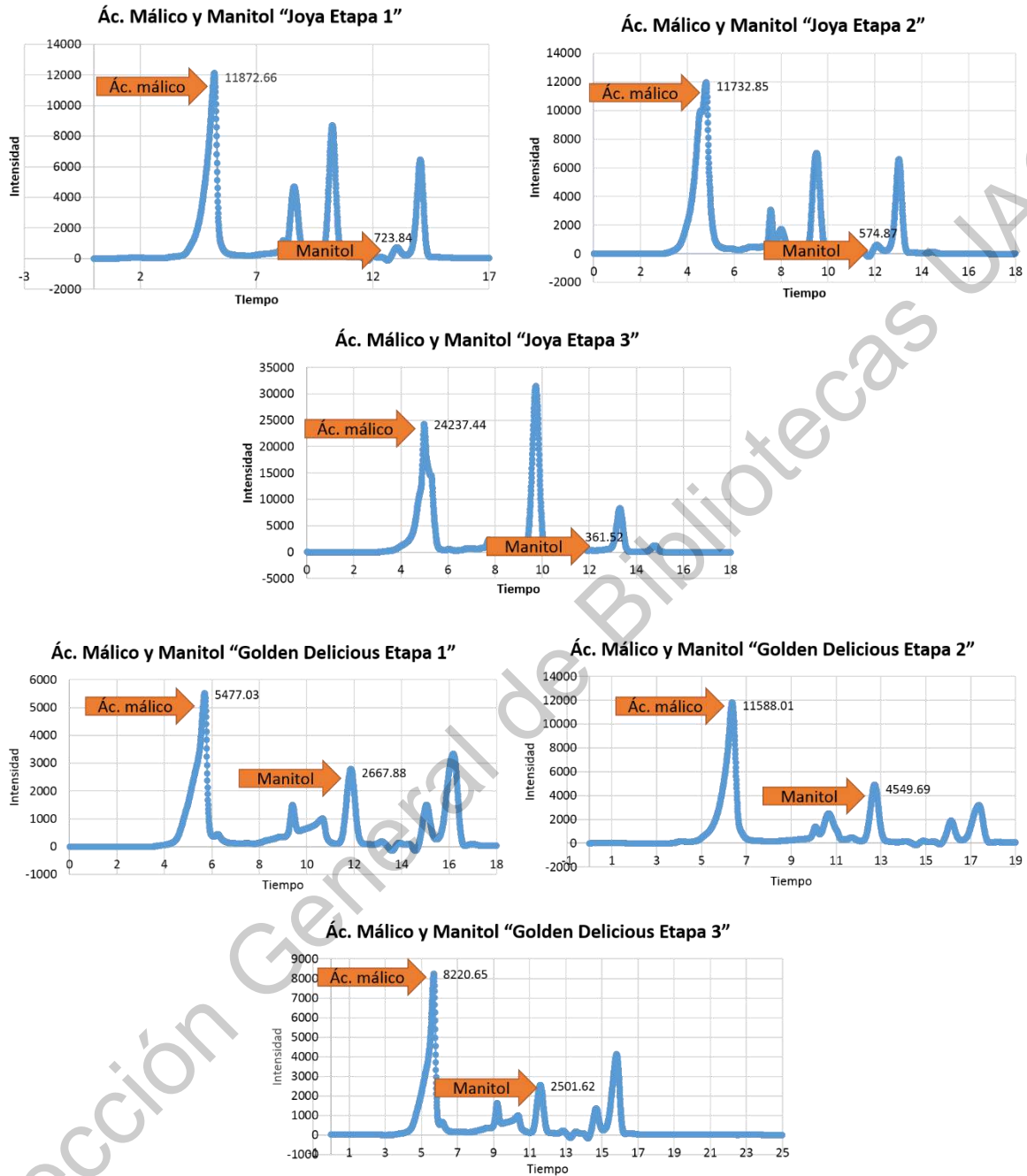
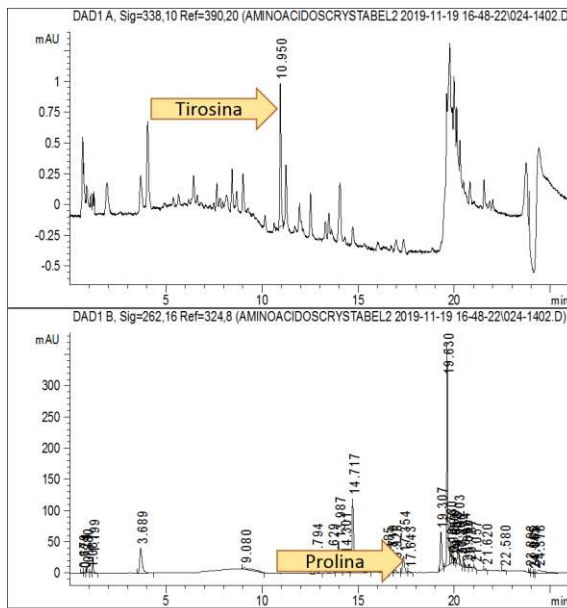


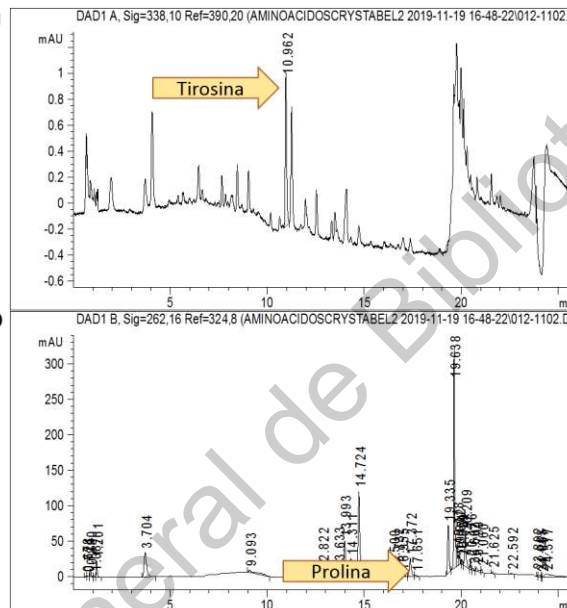
Figura A5. Perfiles de la identificación mediante HPLC del ácido málico y manitol.

Anexo VIII

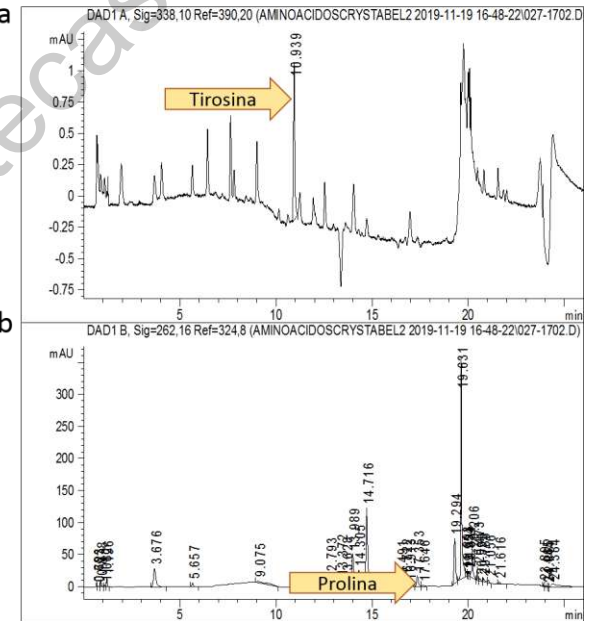
Aminoácidos "Joya Etapa 1"



Aminoácidos "Joya Etapa 2"



Aminoácidos "Joya Etapa 3"



Dirección General de Bibliotecas UAQ

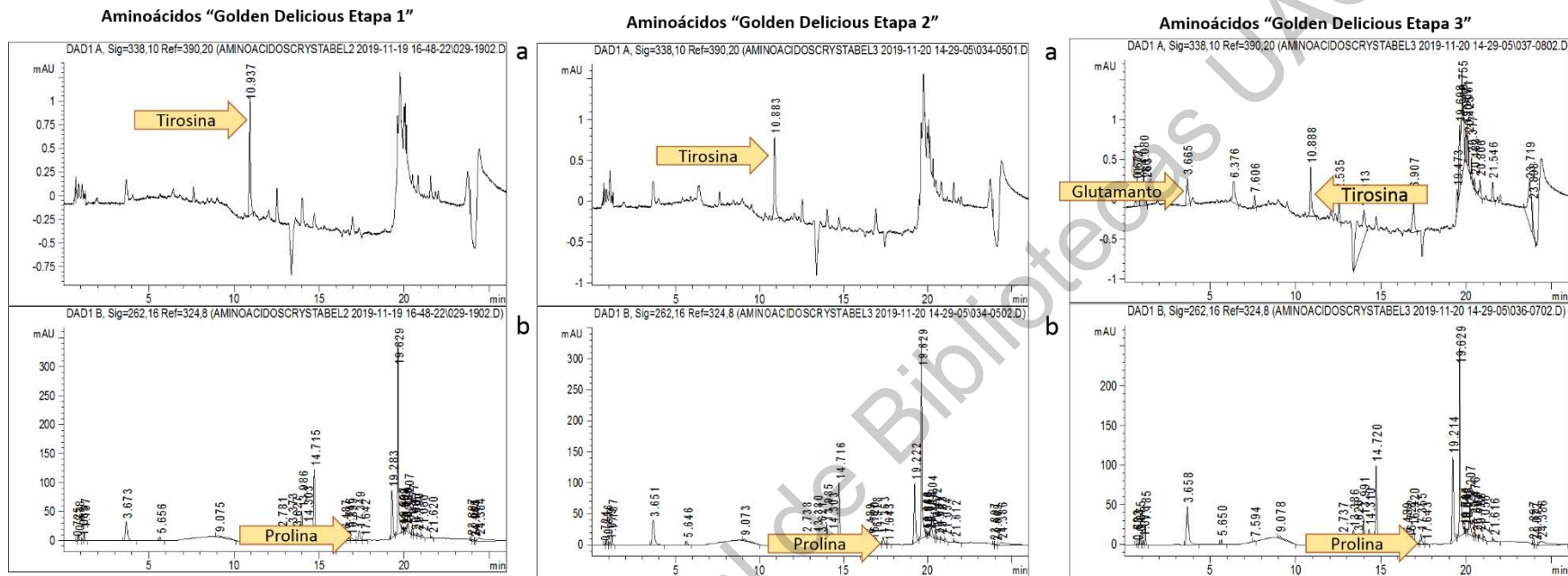


Figura A6. Perfiles de la identificación mediante HPLC de aminoácidos mediante una derivatización con oftalaldehído (OPA) (a) y y el cloruro de 9-fluoroenilmetil (FMOC) (b) en las dos variedades en las tres etapas estudiadas.

Dirección General de Bibliotecas UMQ

Anexo IX

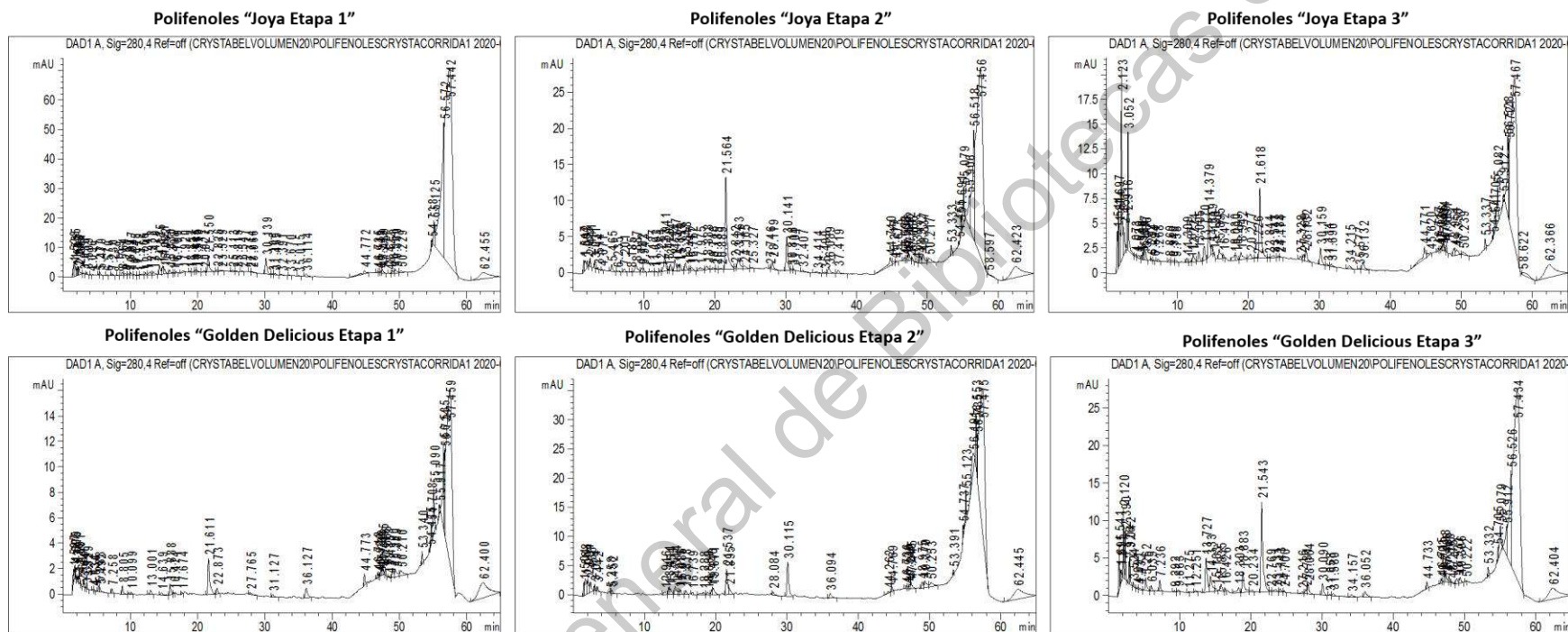


Figura A7. Perfiles de la identificación mediante HPLC de los polifenoles en las dos variedades en las tres etapas estudiadas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ