



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

Análisis y caracterización de sideróforos producidos por rizobacterias
para el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum*
gloeosporioides en frutos de aguacate

Tesis que presenta

IBQ. Guadalupe Coyolxauhqui Barrera Galicia

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias

En la especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de Tesis:

Dr. Juan José Peña Cabriales

Irapuato, Guanajuato.

Junio de 2016.

El presente trabajo se realizó en Laboratorio de Microbiología Ambiental bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriales. Su finalización fue posible gracias al apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y fue financiado parcialmente por el proyecto “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz (SEP-CONACyT-2012-179319)”.

Dedicatoria

A **mi Padre**: por acompañar mi vida, guiar mis pasos, y dedicar sus años a luchar por un país donde gobierne la justicia y la igualdad.

A **Sergio** mi compañero de vida, por brindarme todos los días la oportunidad de descubrir juntos nuestras virtudes, nuestros defectos y compartir nuestros sueños.

A **mi Madre y Hermanas**, las mujeres más valientes y honestas que he conocido.

A **mis Sobrinas y Sobrino**, porque su juventud es la alegría de nuestra familia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales, por todos los años que me ha permitido desarrollarme académica y profesionalmente formando parte de su equipo de trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo por regalarme siempre la calidez humana que lo caracteriza.

Al comité de sinodales, **Dr. John Paul Délano Frier** y **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim**, por sus valiosas sugerencias, comentarios durante el desarrollo de mi proyecto y por la revisión de este manuscrito.

A la Dra. Doralinda Guzmán Ortiz, Por facilitarme la cepa del hongo fitopatógeno con el cual realice mi proyecto. Por su apoyo desde mi llegada a Cinvestav hasta la fecha, brindándome siempre su amistad y valiosos consejos.

Al M. C. José Antonio Vera Núñez, por sus aportaciones durante el desarrollo y la revisión del manuscrito. Por su valiosa amistad y su apoyo fraterno durante toda mi estancia en el Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Al IBQ. Luis Ernesto Hernández Rodríguez, por su labor profesional en el laboratorio, pero principalmente por haberse convertido en un gran amigo y compañero, por los buenos momentos que hemos compartido, los momentos difíciles que hemos superado y su apoyo incondicional en todo momento.

Al M. C. Sergio Abraham Hernández Covarrubias, por sus consejos y aportaciones profesionales para la realización de mi trabajo, por sus contribuciones y correcciones al manuscrito.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Irapuato, por las instalaciones y equipos utilizados.

A los Ing. Esmeralda Rubí Acosta Paulín, Ing. Armando Chapa Magaña y al IBT. Oscar Álvarez por el apoyo en la realización de mi proyecto durante su estancia en el laboratorio y por permitirme contribuir en su formación académica.

A todos los compañeros del **Laboratorio de Microbiología Ambiental**: Milton Barcos, Francisco Saldaña, Daniel Torres, Conrado Guzmán, Mónica Uribe, Esmeralda Acosta, Aníbal Silva, Isidoro Reyes, Israel Penagos, Noé Martínez, Omar Avilés, Aránxa Pérez, Manuel Pérez, Jorge Sánchez, Oscar Álvarez, Esau Oliva, Magdalena Cervantes, Fernando Barajas, Armando Chapa, Jonatán Jaramillo, Luis León, Carlos Chávez, Abraham García, Jaime Mendoza, Daniel Martínez y Eduardo Armienta, por las opiniones constructivas y la solidaridad constante.

A todo el personal administrativo del CINVESTAV especialmente a: **Dora Elia Anguiano Jaime, Juan Pablo Jaime, Diana Barbosa, Sara Raya, Baltazar** por su labor, apoyo y atención en todos los trámites y solicitudes realizados.

A todo el personal que labora en la Unidad Irapuato, administrativo, del cuarto de lavado, intendencia, mantenimiento, vigilancia y compras por permitirnos estudiar en un ambiente agradable y funcional.

A mis queridos amigos **Majo y Low** por brindarme su amistad sincera, por hacerme sentir parte de la familia que han formado y por todos los momentos que hemos compartido.

A las amistades encontradas durante esta etapa: **Viviana, Aníbal, Mónica, Orlando, Erasmo, Edgar, Paco y Conrado**.

Agradezco con el corazón a mi amada familia: **Sergio, Amador, Rosa Elena, Eréndira, Laura, Paola, Iván y Aylín** porque están siempre presentes respaldando y alentando mi carrera profesional. Por regalarme su cariño en cada momento de mi vida.

“Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad”

Louis Pasteur

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1 <i>Fruticultura tropical en México</i>	4
2.1.1 El aguacate.....	4
2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides y la antracnosis</i>	6
2.2.1 Antracnosis en aguacate	8
2.2.2 Ciclo de infección	9
2.2.3 Manejo de la enfermedad en aguacate.....	11
2.3 <i>Control biológico</i>	12
2.4 <i>Sideróforos</i>	14
2.4.1 Sideróforos microbianos.....	14
2.4.2 Producción de sideróforos bacterianos	16
2.4.3 Sideróforos en la promoción del crecimiento vegetal	17
2.4.4 Sideróforos en la supresión de hongos fitopatógenos	17
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
III MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 <i>Muestreo y análisis de suelo</i>	21
3.2 <i>Origen de cepas microbianas</i>	21
3.2.1 Cepas promotoras del crecimiento vegetal	21
3.2.2 El hongo patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	22
3.3 <i>Selección de bacterias productoras de sideróforos</i>	22

3.4 Antagonismo <i>in vitro</i>	23
3.5 Cuantificación de sideróforos	24
3.6 Clasificación de sideróforos.....	25
3.6.1 Prueba de Arnow.....	25
3.6.2 Prueba de Csaky.....	26
3.7 Efecto de sideróforos difusibles en el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> MYA 456	26
3.7.1 Sobrenadante libre de células (SLC)	26
3.7.2 Ensayo de inhibición SLC-patógeno	27
3.7.3 Ensayo de inhibición SLC (sin sideróforos)-patógeno	27
3.8 Identificación molecular de las cepas	28
3.8.1 Extracción de ADN	28
3.8.2 Amplificación del gen 16S ARN ribosomal.....	29
3.8.3 Análisis de las secuencias	29
3.9 Efecto de la fuente de carbono en la producción de sideróforos	30
3.10 Purificación parcial de sideróforos en SLC.....	30
3.10.1 Extracción con solventes.....	30
3.10.2 Extracción de fase sólida (SPE).....	30
3.10.3 Ensayo de CASAD para detectar presencia de sideróforos en los extractos.....	31
3.10.4. Purificación de sideróforos por HPLC	32
3.11 Ensayo de inhibición de antracnosis en frutos	32
3.11.1 Diseño de cámaras húmedas.....	32
3.11.2 Obtención de sobrenadantes y sideróforos semi-purificados	33
3.11.3 Tratamientos.....	33
3.11.4 Aplicación de tratamientos e inoculación de los frutos	34
IV RESULTADOS	35
4.1 Características fisicoquímicas del suelo.....	35
4.2 Aislamiento y selección de bacterias productoras de sideróforos.....	35
4.3 Antagonismo <i>in vitro</i>	37
4.4 Producción y clasificación de sideróforos.....	39
4.5 Efecto de presentes en el SLC sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> MYA 456.....	40
4.6 Efecto del SLC sin sideróforos sobre el crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> MYA 456	41
4.7 Identificación molecular de los aislados	43

<i>4.8 Efecto de la fuente de carbono en la producción de sideróforos</i>	<i>44</i>
<i>4.9 Purificación parcial de sideróforos presentes en SLC.....</i>	<i>46</i>
4.9.1 Extracción con solventes.....	46
4.9.2 Análisis por HPLC de los sideróforos presentes en los extractos	48
4.9.3 Purificación de sideróforos por SPE.....	50
<i>4.10 Efecto de la aplicación de sideróforos en el desarrollo de antracnosis en frutos de aguacate</i>	<i>51</i>
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÉNDICES	72
<i>Apéndice I</i>	<i>72</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Principales entidades productoras de aguacate en México.	6
Tabla II. Plaguicidas utilizados en México para el control de la antracnosis en el cultivo de aguacate	11
Tabla III. Bacterias antagonistas utilizadas para el control de enfermedades postcosecha en frutos.	13
Tabla IV. Tratamientos utilizados en ensayo de inhibición de antracnosis <i>in vivo</i>	34
Tabla V. Parámetros fisicoquímicos del suelo utilizado para el aislamiento microbiano.	35
Tabla VI. Aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de producir sideróforos.	36
Tabla VII. Porcentaje de inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> por aislados bacterianos capaces de producir sideróforos.	37
Tabla VIII. Producción y tipo de sideróforos generados por rizobacterias antagonistas a <i>C. gloeosporioides</i>	39
Tabla IX. Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> MYA 456 por la actividad de sideróforos presentes en los sobrenadantes libres de células.	41
Tabla X. Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> por sobrenadantes libres de células sin sideróforos.	42
Tabla XI. Actividad de sideróforos en los sobrenadantes libres de células y extractos concentrados.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos morfológicos durante el proceso de infección de <i>C. gloeosporioides</i>	10
Figura 2. Estructuras químicas de sideróforos.....	13
Figura 3. Cremiento colonial de rizobacterias productoras de sideróforos.....	36
Figura 4. Inhibición de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> por sobrenadante libre de células provientes de rizobacterias antagonistas.	40
Figura 5. Aspecto de inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> por los sobrenadantes libres de células sin sideróforos.....	42
Figura 6. Reconstrucción filogenética de los aislados bacterianos antagonistas a <i>C. gloeosporioides</i>	43
Figura 7. Cinética de crecimiento y acumulación de sideróforos por <i>B. cenocepacia</i> MSR2.	45
Figura 8. Cantidad de sideróforos producidos por <i>B. cenocepacia</i> MSR2 en diferentes fuentes de carbono.	46
Figura 10. Cromatogramas del análisis por HPLC de los extractos de las cepas antagonistas.....	49
Figura 11. Actividad cualitativa de sideróforos purificados por SPE.....	50
Figura 13. Incidencia de antracnosis en frutos de aguacate tratados con sideróforos	52

RESUMEN

Colletotrichum gloeosporioides Penz. es el agente causal de la antracnosis, enfermedad que afecta la producción y comercialización de frutos tropicales de gran importancia económica y nutricional como es el aguacate. En México, se cultiva alrededor del 31% del aguacate producido en el mundo. Sin embargo, las pérdidas poscosecha generadas por *C. gloeosporioides* pueden disminuir considerablemente la disponibilidad y elevar el precio del fruto. El impacto negativo de los métodos de control poscosecha ha generado la necesidad de estudiar alternativas, una de las cuales es la utilización de metabolitos producidos por rizobacterias antagonistas. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* la capacidad antagónica de sideróforos producidos por rizobacterias contra la cepa patogénica *C. gloeosporioides* MYA 456 en frutos de aguacate. A partir de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Cinvestav Unidad Irapuato se seleccionaron algunos candidatos mediante la técnica de co-inoculación en placa, y posteriormente se identificaron bacterias productoras de sideróforos con capacidad de inhibir parcialmente el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* MYA 456. La mayor actividad fungicida *in vitro* fue registrada por la cepa *Burkholderia cenociepacia* MSR2 con una concentración de sideróforos de $36.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ equivalentes de deferroxamina (μM DFOM). Los sideróforos producidos por *B. cenociepacia* MSR2 pertenecen al tipo hidroxamato. El análisis de los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de alta resolución (conocida como HPLC por sus siglas en inglés) indicaron la presencia de ornibactinas en extractos obtenidos a partir de los sobrenadantes libres de células de *B. cenociepacia* (SLC-Bc). La aplicación de SLC-Bc ricos en sideróforos ($34 \mu\text{M}$ DFOM) disminuyó 95% la presencia de antracnosis en frutos infectados con *C. gloeosporioides* MYA 456, sin presentar diferencias significativas entre el uso de sideróforos purificados, SLC-Bc y el fungicida químico Captan®. Estos resultados sugieren que la utilización directa de SLC-Bc sobre frutos infectados podría considerarse una estrategia de control de antracnosis bajo las condiciones evaluadas.

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides Penz it is a widely distributed phytopathogenic fungi, considered the most important causal agent of anthracnose diseases in tropical and subtropical fruits. Mexico contributes with 31% of avocado's world production. However, post-harvest losses caused by *C. gloeosporioides* can significantly reduce avocado availability and lead to increased fruit market price. Postharvest decay control generally consists of chemical fungicide application. However, the increasing concern about their negative impact on the environment and human health has prompted the research and development of alternative anti-fungal control methods. One such alternative is the use of secondary metabolites produced by antagonistic rhizobacteria. The aim of this study was to evaluate the antagonistic effect of siderophores produced by rhizobacteria against the highly pathogenic *C. gloeosporioides* MYA 456 strain in avocado fruits. Antagonistic rhizobacteria were selected from the Environmental Microbiology Lab microbial collection at CINVESTAV-Irapuato. Siderophore producing bacteria were identified by CAS-Agar method and subsequent bacterial selection was performed by the co-inoculation plaque technique (bacteria-*C. gloeosporioides*). All bacteria capable of inhibiting 15 to 60% of the mycelial growth of *C. gloeosporioides* were selected for further study. The highest in vitro fungicidal activity was detected in *Burkholderia cenociepacia* MSR2 strain, which accumulated siderophores to a concentration of $36.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ deferoxamine equivalents (μM DFOM). Siderophores produced by *B. cenociepacia* MSR2 belong to the hydroxamate type and the HPLC chromatograms obtained from cell-free supernatants (CFS-Bc) extracts suggested the presence of ornibactines. The spraying of CFS-Bc rich in siderophores ($34 \mu\text{M}$ DFOM) on avocado fruits infected with *C. gloeosporioides* MYA 456 decreased anthracnose incidence in 95%. No differences in fungicidal effect were observed between purified siderophores, CFS-Bc and the chemical fungicide Captan[®]. These results suggest that the direct use of CFS-Bc on (infected) fruits could be a control strategy to prevent anthracnose disease under the conditions here evaluated.

I. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas postcosecha de frutos y vegetales pueden llegar a ser muy severas representando más del 25% del total de la producción en países industrializados y más del 50% en países en vías de desarrollo, particularmente si las condiciones de almacenaje y transporte no son las adecuadas. En frutos muchas de estas pérdidas son ocasionadas por el ataque de varios hongos patógenos debido al alto contenido de agua y nutrientes, pH bajo y la pérdida de la resistencia que poseen mientras están unidos a la planta. Los patógenos que causan las enfermedades postcosecha más importantes incluyen varias especies pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, *Mucor*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Rhizopus* entre otros.

La antracnosis causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, es considerada como la enfermedad postcosecha más importante en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es la principal limitante fitopatológica en el cultivo del aguacate, ocasionando pérdidas de hasta el 36% durante la comercialización de estos frutos. No obstante, la disminución en la incidencia de antracnosis debida a la utilización de buenas prácticas de labranza, técnicas modernas de almacenamiento y el uso de fungicidas sintéticos, las pérdidas postcosecha en frutos de aguacate siguen representando un factor limitante para su comercialización. La importancia de la antracnosis como un problema económico y la búsqueda de métodos alternativos para controlar las infecciones quiescentes causadas por *C. gloeosporioides* han dado lugar al estudio de otras estrategias, como el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Estas se caracterizan por presentar distintos mecanismos involucrados en la supresión de patógenos como competencia por espacio y nutrientes, inducción de resistencia sistémica y producción de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos y compuestos volátiles.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la producción de sideróforos por rizobacterias provenientes de diferentes ambientes sobre el control de hongos fitopatógenos en frutos de aguacate.

II. ANTECEDENTES

2.1 Fruticultura tropical en México

El territorio mexicano se ubica entre los paralelos 14° 30' y 32° 43' de latitud norte y los meridianos 86° 42' y 118° 27' de longitud oeste. México dada su posición geográfica es un importante productor de frutas tropicales y subtropicales. La agricultura tropical comprende varias especies de cultivos perennes y anuales, distribuidos en 22 de los 31 estados del territorio nacional (SIAP-SIACON, 2015). En 2014, la superficie de frutales perennes cultivada en el país fue de 1.5×10^6 ha, obteniéndose una producción de 17.5×10^6 t generando ingresos de hasta MX\$ 84×10^9 (SIAP-SIACON, 2015). México exporta, aproximadamente, el 11% de la producción de frutas tropicales consideradas en los mercados internacionales como frutas exóticas (Rindermann & Ma, 2014).

En México, del total de frutales reportados, 35 corresponden a frutos tropicales y subtropicales. Entre éstos destacan por superficie cultivada el mango (186,939 ha), aguacate (175,939 ha), limón (171,609 ha), plátano (76,726 ha), piña (38,164 ha) y papaya (16,056 ha), los cuales representan el 39% de la superficie total utilizada para la producción de frutos. Aunado a la extensión destinada al cultivo de frutos tropicales es importante señalar que las divisas generadas por la comercialización de estos frutos ascienden a MX\$ 7×10^9 (SIAP-SIACON, 2015).

De los frutos mencionados anteriormente, el aguacate destaca por su importancia económica para el país, debido a que, a nivel mundial, México es el principal productor, consumidor y exportador de este fruto.

2.1.1 El aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol frutal siempre verde perteneciente a la familia de las Laureaceas, es originario de la regiones tropicales y subtropicales de México, Guatemala y la costa del Pacífico en Centro América, siendo México el primer lugar donde fue cultivado hace más de 10,000 años (Dreher & Davenport, 2013; Menzel & Le Lagadec, 2014). Al respecto, restos arqueológicos proporcionan

evidencia de que el consumo del aguacate inició entre 8,000 a 7,000 años a.C. Durante el periodo neolítico los agricultores practicaban la explotación mixta de plantas silvestres donde predominaban las frutas, por lo cual se cree que la domesticación del aguacate probablemente surgió desde que los primeros grupos humanos comenzaron a usarlo y consumirlo. De acuerdo con dicha evidencia, se ha determinado que en Mesoamérica la domesticación de árboles frutales comenzó antes que la de cultivos anuales. Más tarde las primeras culturas Mesoamericanas como los Mokaya continuaron el proceso y heredaron el conocimiento a otras culturas como los Mayas y los Olmecas (Galindo-Tovar & Ogata-Aguilar, 2008).

En la actualidad *P. americana* comprende al menos ocho variedades botánicas o subespecies de las cuales tres, también conocidas como razas, poseen un importante interés agronómico: Éstas son la antillana (*P. americana* var. *americana*), la mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) y la guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*). Desde su centro de origen, el cultivo de aguacate se ha extendido a diferentes regiones con climas tropicales, subtropicales y templados (Alcaraz *et al.*, 2013).

Países como México, República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia generan aproximadamente el 70% de la producción mundial de aguacate (FAOSTAT, 2013). Durante 2014, México produjo cerca de 1.5×10^6 t del fruto, lo cual representó el 28% del volumen total producido en el mundo. De esta producción se destinaron cerca 746,967 t al comercio exterior, principalmente hacia Estados Unidos, Canadá, Japón y El Salvador, lo cual generó una ganancia superior a los USD\$ 3×10^9 anuales. El resto del aguacate se consume en nuestro país aproximadamente a un nivel de 6.5 kg per cápita anuales (SIAP-SIACON, 2015). Por lo anterior este fruto es considerado como el “oro verde del campo mexicano”.

En 2015, la producción nacional de aguacate se generó en 473 municipios de 26 estados, destacando en este rubro 10 entidades federativas (**Tabla I**) Sin embargo, la mayor parte de la cosecha (84.2%) proviene del estado de Michoacán (SIAP-SIACON, 2015).

Tabla I. Principales entidades productoras de aguacate en México.

No.	Estado	Volumen (t)
1	Michoacán	1, 219,554
2	Jalisco	100, 554
3	Estado de México	64, 928
4	Nayarit	36, 691
5	Morelos	27, 656
6	Guerrero	14, 828
7	Puebla	11, 758
8	Yucatán	10, 980
9	Chiapas	7, 548
10	Oaxaca	5, 484
	Resto del país	21, 018
Total nacional		1, 520, 695

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2015.

Comercialmente, el cultivo de aguacate en México es limitado por diferentes factores bióticos y abióticos, razón por la cual los productores deben encontrar las mejores estrategias para mantener la calidad fitosanitaria del fruto, tanto para el mercado nacional como el internacional. Dentro de los factores bióticos adversos se han reportado varios patógenos incluyendo *Sphaceloma perseae* (causante de la roña del aguacate), *Colletotrichum* spp. (de la antracnosis), *Phytophthora cinnamomi* (de la pudrición de raíz), *Botryosphaeria* spp. (de la gangrena y desecación de las ramas), *Alternaria* sp. (de la pudrición de la cicatriz en el pedúnculo), entre otros (Menge & Ploetz, 2003; Pérez-Jiménez, 2008). En la última década, la producción comercial de aguacate en el estado de Michoacán ha estado limitada severamente, incrementándose, con los años, las pérdidas de fruto (Silva-Rojas & Ávila-Quezada, 2011).

2.2 *Colletotrichum gloeosporioides* y la antracnosis

El término antracnosis, del griego *Anthrax* (carbuncho) y *nosos* (enfermedad), es una enfermedad caracterizada por lesiones distintivamente limitadas a los tallos, hojas y/o

frutos, regularmente acompañadas de secamiento del tejido y generalmente causada por diferentes especies del hongo *Colletotrichum* (Horst, 2008).

El género *Colletotrichum* pertenece al orden de los Melanconiales; a la clase de los Coelomicetos y, a la subdivisión Deuteromicota. Es un importante hongo endófito, saprófito y fitopatógeno (Photita *et al.*, 2005). Las especies de este género en su estado asexual se agrupan en un taxón denominado *Glomerella* considerado el estado telomorfo del hongo (Phoulivong, 2011). *Colletotrichum* incluye cerca de 600 especies que atacan a más de 3,200 plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (O'Connell *et al.*, 2012).

Recientemente, el género *Colletotrichum* fue nominado como el octavo grupo fúngico fitopatógeno más significativo en el mundo debido a su importancia científica y económica (Dean *et al.*, 2012). Varias especies de este género fúngico han sido utilizadas durante muchos años para el estudio de la diferenciación celular y las interacciones planta-hongo, considerándose un excelente modelo de estudio para definir las bases moleculares y celulares de la patogenicidad en hongos (Perfect *et al.*, 1999). Por otra parte, *Colletotrichum* es uno de los hongos patógenos de plantas económicamente más importantes, puesto que la mayor parte de los cultivos en el mundo son susceptibles a una o más especies de dicho fitopatógeno (Bautista-Baños 2014).

Las especies de *Colletotrichum* son ubicuas y se ha demostrado que múltiples especies pueden infectar un sólo hospedero, mientras que una sólo especie puede infectar múltiples hospederos. La relación hongo-hospedero es amplia (Phoulivong, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que la patogenicidad de *Colletotrichum* varía dependiendo, fundamentalmente, de las diferencias nutricionales y ecológicas de las múltiples especies del género. Algunas especies se consideran únicamente necrotróficas (*i.e.*, *C. circinans* y *C. capsici*), mientras que pocas especies se consideran endófitas mutualistas o endófitas quiescentes (*i.e.*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*) pasando a un estado necrotrófico después de un período de latencia (Latunde-Dada, 2001).

C. gloeosporioides (Penz.) Penz & Sacc está ampliamente distribuido y se considera un importante patógeno de plantas especialmente en zonas tropicales y subtropicales,

infectando cerca de 470 diferentes hospederos (Sharma & Kulshrestha, 2015). Las enfermedades causadas por *C. gloeosporioides* se presentan en una gran variedad de formas incluyendo antracnosis de tallo y tejido, secamiento, pudrición de raíz, mancha foliar, pudrición de panícula floral, roya y pudrición de frutos (Jeffries *et al.*, 1990).

C. gloeosporioides es considerado como un patógeno quiescente importante, causando pudrición postcosecha de frutos tropicales y subtropicales como guayaba, plátano, papaya, mango y aguacate (Perfect *et al.*, 1999; Latunde-Dada, 2001; Peres *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2007; Zivkovic *et al.*, 2010; Phoulivong, 2011; Bautista-Baños, 2014). Más del 50% de la pérdida de frutas y vegetales frescos es causada por este hongo. El retraso en la aparición de los síntomas característicos de la antracnosis (quiescencia o latencia) es a menudo devastador y da lugar a pérdidas económicas significativas (Bautista-Baños, 2014; Dean *et al.*, 2012).

2.2.1 Antracnosis en aguacate

En frutos de aguacate, la antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides* Penz y Sacc. prevalece durante temporadas lluviosas con humedad relativa alta (> 80%) y temperaturas entre 20 y 28°C (Rodríguez-López *et al.*, 2009). La enfermedad ha sido reportada en la mayoría de las zonas productoras de aguacate del mundo, y en muchas regiones es la enfermedad más importante, capaz de causar pérdidas superiores al 37% de la producción (Menge & Ploetz 2003; Pérez-Jiménez, 2008).

El primer sitio de infección en el aguacate es el fruto. Sin embargo, pueden aparecer síntomas sobre las hojas y los tallos. En la superficie de las hojas y tallos jóvenes se desarrollan lesiones cloróticas y manchas color púrpura y café que posteriormente, al fusionarse ocasionan necrosis del tejido (Sharma *et al.*, 2011).

Los síntomas más significativos de la antracnosis son los que aparecen en el fruto. En el campo, los frutos presentan síntomas denominados “viruela” y “clavo” iniciando con manchas superficiales pequeñas (de un diámetro <5 mm) de color café claro y posteriormente café oscuro y hundidas, que con el tiempo toman un aspecto seco y quebradizo en forma de cráter que eventualmente provocan el desprendimiento de los frutos (Menge & Ploetz, 2003; Pérez-Jiménez, 2008; Rodríguez-López *et al.*, 2009). Los síntomas que se desarrollan después de la cosecha aparecen hasta que el fruto

comienza a madurar manifestándose en forma de manchas circulares café oscuras en el pericarpio y daños por ablandamiento y pudrición del mesocarpio (Prusky *et al.*, 2001).

2.2.2 Ciclo de infección

El proceso típico de infección de *Colletotrichum* consiste en una secuencia de eventos comunes. En general, la humedad relativa alta (cerca del 80%) y temperaturas cálidas (18-26°C) promueven la infección (Pérez-Jiménez, 2008). El ciclo de vida de *C. gloeosporioides* (**Figura 1**) comienza, en la huerta, con la germinación de las esporas sobre la superficie del fruto, el crecimiento del tubo de germinación, la formación de los apresorios y la generación de hifas de infección gruesas en las células infectadas (conocida como fase biotrófica). Las hifas formadas durante esta etapa permanecen quiescentes en la capa superficial de las células infectadas hasta que el fruto madura y se ablanda (Moshe *et al.*, 1994; Yakoby *et al.*, 2001). Los eventos moleculares provocados por el contacto de los conidios con la superficie rígida de los frutos en desarrollo constituyen la primera comunicación entre el hongo y su hospedero. La calmodulina (CaM) y la calmodulina cinasa (CaMK) dependiente de calcio, que se encuentran presentes en el hongo, están involucradas en la transducción de señales tempranas, estas proteínas probablemente desencadenan la expresión de un conjunto de genes que prepara a los conidios para responder a las señales químicas de los frutos infectados. En *C. gloeosporioides* la respuesta a la presencia de cera y producción de etileno en el hospedero requiere del contacto de los conidios con la superficie rígida del fruto (Kim *et al.*, 1998).

Durante el almacenamiento, el hongo cambia a la fase necrotrófica caracterizada por la formación de hifas secundarias delgadas que comienzan a colonizar las células vecinas, conduciendo finalmente al desarrollo de lesiones visibles en el sitio de infección (Jeffries *et al.*, 1990).

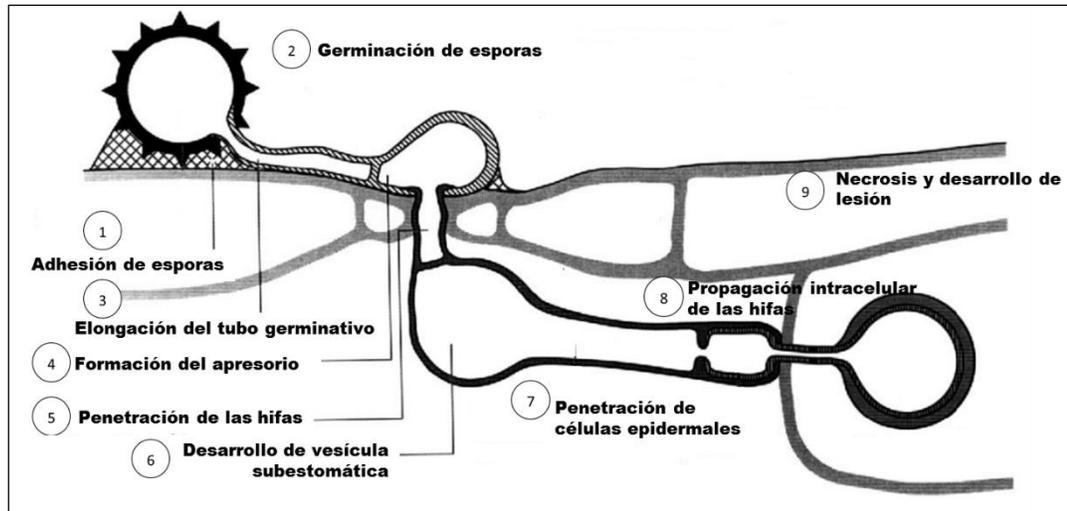


Figura 1. Eventos morfológicos en el proceso de infección de *C. gloeosporioides*. *Modificado de Mengel *et al.*, 1996.

En el fruto hospedero ocurren importantes cambios fisiológicos que permiten la activación de la quiescencia. Se han propuesto cuatro mecanismos para explicar la resistencia al desarrollo de síntomas en los frutos no maduros: 1) falta de requerimientos nutricionales para el patógeno; 2) presencia de compuestos antifúngicos en el fruto; 3) inducción de producción de compuestos antifúngicos, y 4) falta de mecanismos de activación para los factores de patogenicidad del hongo (Ben-Moualem & Prusky, 2000; Prusky & Lichter, 2008). Los cambios bioquímicos y fisiológicos que se inician cuando el fruto es removido del árbol son los que generan la activación de los procesos de infección latente y el desarrollo e invasión de las hifas en el fruto (Hartill, 1991; Menge & Ploetz, 2003). La producción de etileno durante el proceso de maduración de los frutos, induce la germinación de esporas, estimula la formación de micelio ramificado y de múltiples apresorios, amplificando la capacidad del hongo para penetrar los frutos en diferentes puntos. La capacidad de *Colletotrichum* sp. para censar el etileno producido por el huésped le confiere una considerable ventaja como hongo patógeno de frutos climatéricos (Moshe *et al.*, 1994).

2.2.3 Manejo de la enfermedad en aguacate

Un control de enfermedades efectivo rara vez se logra usando un sólo método de control. El control de la antracnosis en aguacate se basa en la combinación de varias prácticas incluyendo la aplicación de fungicidas antes y después de la cosecha, el saneamiento de la huerta, la poda, la generación de cultivares resistentes, la selección de patrones para los injertos, el manejo nutricional, el uso de atmósferas de maduración controlada y la rápida comercialización (Menge & Ploetz, 2003; Willingham *et al.*, 2006).

El tratamiento postcosecha con fungicidas químicos para el control de la antracnosis es común en países donde se permite su uso. Generalmente, en el campo se aplican fungicidas a base de cobre (*i.e.*, hidróxido de cobre, sulfato de cobre y oxiclورو de cobre), captafol y benomilo en intervalos de 14-28 días desde la formación del fruto hasta la cosecha. En postcosecha, los tratamientos químicos más eficaces incluyen la inmersión de los frutos en tiabendazol (1.5-2.0 g/L) y uso de procloraz (0.5 g/L) en ceras (Eckert *et al.*, 1985; Bill *et al.*, 2014). Dada la importancia del aguacate en México, existen en el mercado diferentes fungicidas químicos (**Tabla II**) cuyo uso es regulado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de acuerdo a las normas NOM-032-FITO-1995 y NOM-050-SCFI-2004.

Tabla II. Plaguicidas utilizados en México para el control de la antracnosis en el cultivo de aguacate

Nombre	Presentación	[%]	CT	Dosis	LMR	IS
Azoxistrobin	Suspensión concentrada	23.8	IV	500-600 mL/ ha	2	0
Azufre elemental	Gránulo fino concentrado	80	IV	400 g/ 100 L	Ex	SL
Folpet	Gránulos dispensables	80	IV	150-200 g/ 100 L	25	30
Hidróxido cúprico	Polvo humectable	77	IV	300-400 g/ L	Ex	SL
Oxicloruro de Cobre	Polvo humectable	85	IV	300-400 g/ L	Ex	SL
Óxido cuproso	Polvo humectable	84.4	IV	250 g/ L	Ex	SL
Sulfato de cobre	Polvo humectable	95	IV	2-4 g/ L	Ex	SL
Tiabendazol	Solución acuosa	60	III	750 mL/ L	10	15
Tribásico de cobre	Polvo humectable	92.2	IV	600-750 g/ 100 L	Ex	SL

[%] = Concentración, CT= Clasificación toxicológica; LMR = Límite máximo residual en México y EUA (ppm); IS = Intervalo de seguridad (días de cosecha); Ex = Exento; SL = Sin límite. *Fuente: APEAM A.C.

Actualmente, los consumidores prefieren adquirir frutos que no han sido tratados con químicos, libres de defectos, enfermedades y seguros para el consumo. Por otra parte, los países importadores han aplicado regulaciones estrictas respecto al límite máximo residual (LMR) de productos químicos en las porciones comestibles de la fruta. Asimismo, la disposición de los grandes volúmenes de soluciones fungicidas puede afectar el medio ambiente, especialmente el suelo y las fuentes de agua. otro aspecto preocupante es la evidencia existente sobre el desarrollo de resistencia a los productos utilizados por parte de los organismos patógenos a los productos utilizados (Bill *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, la industria hortícola en México necesita encontrar una alternativa a la aplicación de fungicidas postcosecha.

Un enfoque biológico de control puede ofrecer una alternativa de manejo ambientalmente saludable. Mediante ensayos directos en plantas de diferentes especies se han identificado bacterias que podrían ser empleadas como agentes de biocontrol (González-Sánchez *et al.*, 2013).

2.3 Control biológico

El término “control biológico” ha sido utilizado en diferentes campos de la biología, pero en fitopatología este término es aplicado para el uso de microorganismos antagonistas (i.e., los agentes de control biológico o ACB) para la supresión de enfermedades (Pliego *et al.*, 2011). Más ampliamente, el término biocontrol ha sido aplicado al uso de productos naturales extraídos o fermentados a partir de varias fuentes. Los biofungicidas son, por ejemplo, hongos/ bacterias y/ o sus derivados, los cuales son utilizados como un ingrediente activo para el control de enfermedades fúngicas (Rettinassababady & Jeyalakshmi, 2014).

La supresión de enfermedades por agentes de biocontrol es la manifestación de las interacciones entre la planta, el ACB, la comunidad microbiana dentro y en los alrededores de la planta y las características físico-químicas del ambiente. Dentro del amplio rango de microorganismos benéficos, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) desempeñan un papel importante en el manejo de enfermedades de plantas (Akhtar & Siddiqui, 2010).

Las RPCV pueden disminuir o prevenir los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos mediante varios mecanismos. Éstos incluyen la producción de antibióticos o enzimas capaces de matar al patógeno, la inducción de resistencia sistémica y la producción de sideróforos que limitan el hierro disponible para el patógeno (Compant *et al.*, 2005; Siddiqui, 2006).

Debido a que las frutas y vegetales son considerados esenciales en la dieta humana, la evitación de las pérdidas en postcosecha es un permanente motivo de estudio ya que este problema no solo ocasiona pérdidas económicas, sino que también afecta la disponibilidad de los productos. Durante los últimos 20 años, el control biológico ha emergido como una estrategia efectiva para combatir un amplio rango de enfermedades postcosecha de frutos (Janisiewicz & Korsten, 2002). Diferentes bacterias antagonistas han sido identificadas y artificialmente introducidas en una gran variedad de productos para el control de enfermedades postcosecha (**Tabla III**).

Tabla III. Bacterias antagonistas utilizadas para el control de enfermedades postcosecha en frutas*.

Antagonista	Enfermedad (patógeno)	Frutos	Referencias
<i>Bacillus subtilis</i>	Pudrición café (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>)	Albaricoque	Pusey y Wilson, 1984
	Pudrición del pedúnculo (<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.)	Aguacate	Demoz y Korsten, 2006
	Pudrición por alternaria (<i>Alternaria alternata</i> [Fr.] Keissler)	Lichi	Jiang <i>et al.</i> , 1997; 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Antracnosis (<i>Colletotrichum musae</i>)	Plátano	Costa y Erabadupitiya, 2005
	Pudrición apical (<i>C. musae</i>)	Plátano	Costa y Erabadupitiya, 2005
<i>Bacillus licheniformis</i>	Antracnosis (<i>C. gloeosporioides</i>) y pudrición del pedúnculo (<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.)	Mango	Govender <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Moho azul (<i>Penicillium expansum</i>)	Manzana	Janisiewicz y Roitman, 1988
	Moho verde (<i>P. digitatum</i>)	Naranja	Huang <i>et al.</i> , 1993
<i>Pantoea agglomerans</i>	Moho verde (<i>P. digitatum</i> , <i>P. italicum</i>).	Mandarina	Torres <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas corrugata</i>	Pudrición café (<i>Monilinia frutícola</i>)	Durazno	Smilanik <i>et al.</i> , 1993.

*Modificado de Sharma, (2009).

2.4 Sideróforos

El hierro (Fe) es uno de los nutrientes esenciales para la mayoría de los microorganismos debido a que actúa como catalizador de procesos enzimáticos, formación de biopelículas, fosforilación oxidativa, transporte de electrones, fijación de nitrógeno y síntesis de ácidos nucleicos (Ahmed & Holmström, 2014). No obstante que es muy abundante en la naturaleza, no se encuentra biológicamente disponible. En presencia de oxígeno y pH neutro sufre una rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} para finalmente formar oxihidróxidos férricos cuya asimilación es prácticamente imposible para los microorganismos (Saha *et al.*, 2013). Cuando microorganismos aerobios o anaerobios facultativos crecen en ambientes con baja disponibilidad de Fe, éstos sintetizan quelantes específicos de Fe^{3+} llamados sideróforos (Saraf *et al.*, 2014).

La palabra sideróforo proviene del griego *Sideros phoros* que significa “portadores o acarreadores de hierro”. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (500-1000 Da) que actúan como agentes quelantes con una alta afinidad por el Fe^{3+} (Raymond *et al.*, 1984; Winkelmann, 2002; Saraf *et al.*, 2014). Las rutas de adquisición de Fe, dependientes de sideróforos, se encuentran distribuidas en un amplio espectro de microorganismos procariontes y eucariontes (incluyendo algunas plantas) y presentan una gran diversidad en la estructura y función de sus componentes (Miethke & Marahiel, 2007).

2.4.1 Sideróforos microbianos

Se han descrito alrededor de 500 sideróforos, en su mayoría producidos por bacterias Gram positivas y negativas. No obstante la gran variedad de sideróforos existentes, la mayoría posee un esqueleto con varios análogos de aminoácidos no proteicos incluyendo tanto aminoácidos modificados como D-aminoácidos (Ahemad, 2011).

Debido a factores genéticos y/ o bioquímicos, los sideróforos producidos por microorganismos presentan una alta variabilidad en su estructura química. Éstos se clasifican en tres categorías (**Figura 2**) dependiendo del grupo funcional que dona el ligando que se une al hierro: a) catecolatos o fenolatos; b) hidroxamatos o hidroxicarboxilatos, y c) grupos mixtos (Saha *et al.*, 2013).

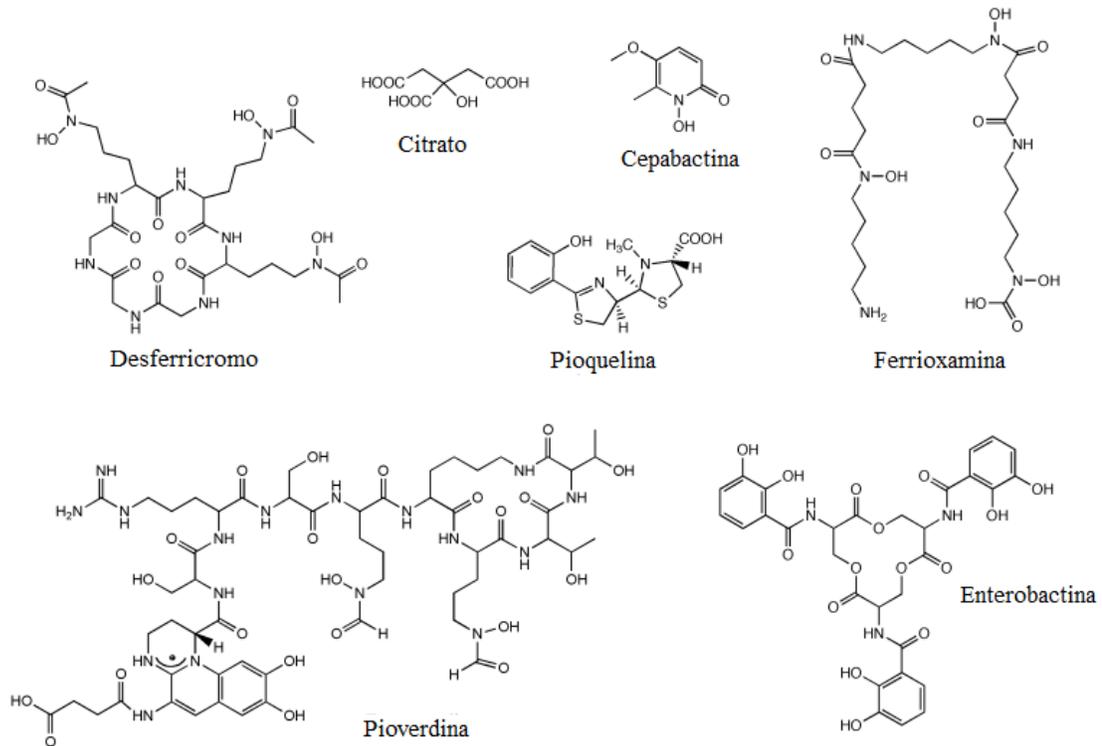


Figura 2. Estructura de algunos sideróforos. Desferricromo, sideróforo del tipo hidroxamato al igual que la ferrioxamina, es producido por *Aspergillus*, *Ustilago* y *Penicillium*.; enterobactina, sideróforo del tipo catecolato producido por *E. coli*; pioverdina sideróforo mixto producido por *P. aeruginosa*; cepabactina, sideróforo bidentado producido por *B. cepacia*; pioquelina, sideróforos con grupo carboxílicos producido por *P. aeruginosa* y *B. cepacia* el cual quela el hierro utilizando oxígeno y nitrógeno como donadores de electrones *Modificado de Schalk *et al* 2011.

Los ligandos son sujetos a diferentes estructuras químicas como péptidos, di- y tri-aminoalcanos y ácido cítrico. Los sideróforos de origen peptídico son producidos por *Pseudomonas fluorescens* (pyoverdinas), así como especies de los géneros *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, además de muchas enterobacterias y hongos. En este grupo, también se incluyen los sideróforos con componentes lipopeptídicos producidos por especies de los géneros *Burkholderia*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. Los sideróforos basados en esqueletos de di- y tri-aminoalcanos son producidos por algunos *Rhizobia*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. Finalmente, los basados en ácido cítrico pueden encontrarse en bacterias de los géneros *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Ochrobactrum*,

Rhizobium, *Synechococcus*, *Vibrio*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* y *Marinobacter* (Fernández-Scavino & Pedraza, 2013). A pesar de las diferencias en la estructura celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, éstas comparten genes comunes tanto para transportadores específicos de sideróforos como para proteínas de unión a Fe. Algunas bacterias son capaces de utilizar sideróforos del mismo género (sideróforos homólogos), mientras que otras pueden utilizar sideróforos producidos por otras bacterias (sideróforos heterólogos) (Neilands, 1981; Bagg & Neilands, 1987; Ahemad, 2011).

2.4.2 Producción de sideróforos bacterianos

La biosíntesis de sideróforos en las bacterias es inducida por una deficiencia intracelular de Fe (Saha *et al.*, 2013) mediante un proceso altamente dependiente de energía (Ali & Vidhale, 2013). A pesar que el sistema de adquisición de Fe está regulado por la limitación de dicho elemento, otros factores como el pH, la presencia de otros elementos traza y la disponibilidad de carbono, nitrógeno y fósforo también influye en la producción de sideróforos. El sistema involucra varios pasos: a) biosíntesis intracelular de sideróforos; b) secreción de los sideróforos en el espacio extracelular; c) movilización de Fe mediante la formación de complejos competitivos o por la disolución de minerales de Fe, y d) reconocimiento y recepción del complejo Fe-sideróforo por un sistema de transporte altamente eficiente, o la liberación del Fe del complejo, seguida por la asimilación del mismo (Fernández-Scavino & Pedraza, 2013). La utilización de un sistema de captación de Fe mediado por sideróforos implica la necesaria existencia de un sistema de regulación capaz de adecuar la expresión de sus genes a los requerimientos fisiológicos. La regulación actúa sobre los procesos de biosíntesis y secreción del sideróforo, captación del complejo Fe-sideróforo y, también, sobre la liberación y almacenamiento de Fe. En las bacterias, la regulación de la homeostasis del Fe se efectúa principalmente a nivel transcripcional por reguladores globales sensibles a la concentración de Fe intracelular. Los reguladores más importantes pertenecen a la familia de proteínas Fur (ferric uptake regulator) en bacterias Gram-negativas y en las Gram-positivas de bajo contenido de GC, o la familia de la toxina de la difteria DtxR las cuales cumplen funciones análogas a Fur en

bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC como *Streptomyces*, *Micobacterias* y *Corinebacterias* (Hantke, 2001; Andrews *et al.*, 2003; Miethke & Marahiel, 2007).

2.4.3 Sideróforos en la promoción del crecimiento vegetal

Los sideróforos microbianos proveen a las plantas de Fe, mejorando así su desarrollo cuando la biodisponibilidad del metal es baja. Sin embargo, el mecanismo exacto no es conocido aún, sugiriéndose dos posibles formas: a) los sideróforos microbianos con alto potencial redox pueden reducirse para donar Fe^{2+} al sistema de transporte de la planta, o b) los sideróforos microbianos pueden quelar el Fe del suelo para después realizar un intercambio de ligando con diferentes fitosideróforos (Ahmed & Holmström, 2014).

Las investigaciones para disminuir la clorosis férrica han estado principalmente dirigidas a la aplicación en el suelo de compuestos con Fe en su forma asimilable, así como la selección de cultivares resistentes a la deficiencia de Fe. Sin embargo, durante los últimos años la posible aplicación de sideróforos producidos por RPCV ha sido considerada como una forma potencial de promover el crecimiento vegetal, la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de baja disponibilidad de Fe. El efecto benéfico de usar cepas productoras de sideróforos como *Bradyrhizobium* sp. y *Rhizobium meliloti* ha sido reportado previamente (revisado por Fernández-Scavino & Pedraza, 2013).

2.4.4 Sideróforos en la supresión de hongos fitopatógenos

Una de las funciones más importantes de los sideróforos es mediar las interacciones competitivas que se llevan a cabo entre los microorganismos en algunos suelos supresores, donde patógenos como *Fusarium* y *Pythium* son inhibidos por bacterias del género *Pseudomonas*. En los primeros estudios sobre el tema, se encontró que la producción de grandes cantidades de sideróforos (no acomplejados) en cultivos puros resultaron capaces de secuestrar todo el Fe disponible y así suprimir el crecimiento de hongos patógenos (cuyos mecanismos de asimilación de Fe son menos eficientes o tienen menor afinidad por el Fe) cuando fueron cultivados en la misma placa (Crowley,

2001; Saraf *et al.*, 2014). Basados en esta observación, inicialmente se propuso que los sideróforos desempeñan un papel clave en la antibiosis hacia los hongos patógenos de plantas. Dos décadas de investigación al respecto han confirmado esta propuesta y provisto una visión detallada del papel de estos metabolitos en la supresión de enfermedades (Crowley, 2001).

Los estudios acerca del papel de los sideróforos en el control biológico de fitopatógenos (Duijff *et al.*, 1994), han demostrado que las pioverdinas (sideróforos producidos por bacterias del género *Pseudomonas*) controlan la tristeza de la papa causada por *Fusarium oxysporum* (Schippers *et al.*, 1987), además de estar involucrados en el biocontrol de *Gaeumannomyces graminis*, que causa disminución de crecimiento en plantas de arroz y cebada (Voisard *et al.*, 1989). También, se ha observado que las pioverdinas reprimen el desarrollo de fitopatógenos en cacahuate y maíz (Pal *et al.*, 2001). Asimismo, se ha reportado el uso de sideróforos producidos por otros géneros bacterianos además de *Pseudomonas*, *i.e.*, sideróforos producidos por *B. subtilis* participan de manera importante en el biocontrol de *F. oxysporum*, causante del I marchitamiento en pimiento (Yu *et al.*, 2011).

El control de enfermedades en plantas se ha caracterizado por el uso intensivo de productos químicos que pueden causar contaminación, generar resistencia en los patógenos, incrementar los costos de producción y además representan un riesgo al ambiente y la salud humana. Se ha sugerido el uso de sideróforos o microorganismos productores de estos compuestos como una alternativa “amigable” para reducir el uso de fungidas. Para ello, se han considerado diferentes factores que pueden afectar la eficacia de los sideróforos como agentes de control contra patógenos de plantas, entre los que destacan el tipo de microorganismo productor, el fitopatógeno y la composición del medio (Glick & Bashan, 1997; Fernández-Scavino & Pedraza, 2013).

JUSTIFICACIÓN

En tiempos recientes, el control de enfermedades fúngicas en plantas (durante pre y postcosecha) se ha caracterizado por el uso intensivo de productos químicos que pueden causar contaminación, generar resistencia en los patógenos, incrementar los costos de producción y, además, representar un riesgo al ambiente y la salud humana. Aunado a esto, la prohibición del uso de fungicidas postcosecha se ha incrementado debido a los riesgos ambientales y toxicológicos, haciendo necesaria la búsqueda de alternativas más amigables. El control biológico de enfermedades utilizando bacterias antagonistas es un área que ha tomado importancia en el mundo durante las dos últimas décadas. En el caso de los frutos y vegetales, el ambiente postcosecha representa una ventaja particular para el desarrollo y aplicación de estrategias de biocontrol, ya sea a través de la aplicación directa de bacterias antagonistas o de los productos de su actividad metabólica., Esta práctica en combinación con otras estrategias utilizadas actualmente, podrían disminuir las pérdidas de producción, el aumento en los costos y el impacto negativo al ambiente y la salud de los consumidores.

HIPÓTESIS

Los sideróforos producidos por rizobacterias contribuyen a disminuir la incidencia de antracnosis en el fruto de aguacate.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de sideróforos producidos por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el control de enfermedades causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en fruto de aguacate (*Persea americana*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Seleccionar y caracterizar rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y productoras de sideróforos con actividad antagónica contra *Colletotrichum gloeosporioides* MYA 456.

Caracterizar los sideróforos producidos por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal que presenten actividad antagónica contra *Colletotrichum gloeosporioides* MYA 456

Estimar la producción de sideróforos por rizobacterias antagonistas de *C. gloeosporioides* cultivadas en diferentes fuentes de carbono.

Cuantificar el efecto antagónico de los sideróforos aplicados en frutos infectados con *C. gloeosporioides* MYA 456

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo y análisis de suelo

Se realizó un muestreo de suelo en la huerta “Gonher” propiedad del señor Oscar Álvarez Gómez ubicada en el municipio de Chilchota, Michoacán. Para el análisis nutrimental de suelo se generó una muestra compuesta a partir de 15 sub-muestras (2 kg/muestra) tomadas a una profundidad de 25-30 cm en diferentes puntos aleatorios de la huerta. El suelo fue secado a temperatura ambiente durante 7 días. A continuación 1 kg de la mezcla seca fue enviado para su análisis al Laboratorio de Fertilidad Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP-Celaya, Gto.

3.2 Origen de cepas microbianas

Se utilizaron rizobacterias productoras de sideróforos aisladas de muestras de suelo tomadas en un cultivo de aguacate o de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Cinvestav, Unidad Irapuato.

3.2.1 Cepas promotoras del crecimiento vegetal

Para el aislamiento de bacterias se colectaron muestras de suelo rizosférico a partir de cinco árboles sanos, que no presentaban síntomas de antracnosis, y cinco árboles enfermos, que presentaban frutos y hojas con síntomas, distribuidos aleatoriamente en la huerta. Se colectaron muestras de raíces a una distancia de 1 m del tronco y 10 cm de la superficie del suelo. Para recuperar el suelo adherido a la raíz estas fueron agitadas cuidadosamente dentro de bolsas de polipapel previamente esterilizadas, se retiraron las raíces y el suelo fue transportado y almacenado a 4°C hasta su uso (Cazorla *et al.*, 2007).

Para obtener aislados bacterianos productores de sideróforos a partir de las muestras de suelo colectadas alrededor de árboles sanos y enfermos, se colocaron 10 g de suelo en un matraz Erlenmeyer (250 mL) que contenía 90 mL de solución salina (NaCl 0.85%), los matraces se agitaron a 100 rpm durante 60 min, y a partir de cada matraz se realizaron diluciones seriadas en la solución de NaCl 0.85% y se sembraron por

dispersión en cajas de Petri con medio Cromo Azurol Sulfonato (CAS). Las cajas de Petri con tres réplicas fueron incubadas durante 5 d a 28°C.

Además, se utilizaron 45 aislados bacterianos seleccionados por presentar diferentes características de promoción de crecimiento vegetal como producción de ácido indolacético (AIA), solubilización de fosfato (SF) y fijación biológica de nitrógeno (FBN). Usando estos parámetros de selección, se obtuvieron 30 aislados bacterianos de la rizósfera de plantas de maíz provenientes de los estados de Michoacán, Estado de México y Guanajuato en el marco del proyecto “Importancia de los Microbios Benéficos de la Rizósfera en la Producción Sustentable de Maíz (SEP-CONACyT-2012-179319)” Se obtuvieron 15 aislados adicionales como parte del proyecto “La Fitorremediación como Alternativa para atenuar la Contaminación por Metales Pesados y Compuestos Organoclorados en Zacatecas (SEP-CONACyT-214108)”.

3.2.2 El hongo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*

La cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC MYA 456 previamente identificada como patógeno de frutos tropicales como limón, mango y papaya, fue donada por la Dra. Doralinda Guzmán Ortiz del Laboratorio de Micotoxinas del Cinvestav, Unidad Irapuato. Previamente, se probó la patogenicidad de *C. gloeosporioides* MYA 456 en frutos de aguacate. Para ello se partió de cultivos del patógeno mantenidos rutinariamente creciendo en medio Papa Dextrosa Agar (PDA). De uno de éstos se obtuvo una suspensión de esporas en Tritón 0.01% a partir de un cultivo incubado durante 10 d a 28°C. La concentración fue ajustada a 1×10^6 esporas/ mL y almacenada a 4°C para su utilización en los ensayos.

3.3 Selección de bacterias productoras de sideróforos

La capacidad productora de sideróforos de los aislados se determinó utilizando el medio Cromo Azurol Sulfonato (CAS) agar. Esta técnica se basa en la formación de un halo naranja alrededor de la colonia bacteriana que presenta dicha actividad (Schwyn & Neilands, 1987). Dicho medio se preparó disolviendo 60.5 mg de CAS en 50 mL de agua y se mezclaron con 10 mL de FeCl₃·6H₂O 1 mM (disuelto en HCl 10 mM); esta solución fue lentamente mezclada con 40 mL de Bromuro de

hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) a una concentración de 1.82 mg/ mL adicionado en agitación constante; la solución azul obtenida fue esterilizada por calor húmedo. Otro componente del medio se preparó disolviendo 30.24 g de PIPES en 750 mL de una solución que contenía 0.3 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de NaCl , y 1.0 g de NH_4Cl . Luego, utilizando KOH 50% se ajustó la solución a pH 6.8 y se agregó agua para obtener un volumen de 800 mL. Después de la adición de 15 g de agar bacteriológico, la solución fue esterilizada. Se preparó una tercera solución la cual contenía: 2.0 g glucosa, 2.0 g 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 , 0.004 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 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 70 mL de agua. De igual manera que las dos soluciones anteriores, ésta fue esterilizada en autoclave a 121°C y 1 atm durante 15 min. Después de enfriar hasta 50°C , las tres soluciones anteriores se mezclaron agitándose lentamente para evitar la formación de burbujas; finalmente, se agregaron 30 mL de casamino ácidos (10% p: v) filtrados previamente a través de una membrana de celulosa de $0.22 \mu\text{m}$ (Alexander & Zuberer, 1991).

Las bacterias fueron inoculadas por punción en el centro de las cajas de Petri que contenían el medio CAS-agar, las cuales fueron incubadas a 28°C durante 7 d. Las bacterias que presentaron el sintomático halo naranja rodeando la colonia fueron seleccionadas como posibles productoras de sideróforos. Como control positivo, se utilizó la cepa productora de sideróforos *Burkholderia cepacia* XXVI (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012). En estos ensayos se realizaron tres réplicas por cada bacteria.

3.4 Antagonismo *in vitro*

La determinación *in vitro* de la actividad antagónica contra *C. gloeosporioides* MYA 456 de las bacterias productoras de sideróforos y *C. gloeosporioides* MYA 456 se realizó en placas con medio PDA utilizando el método de cultivo dual o de co-inoculación (Rahman *et al.*, 2007; Zivkovic *et al.*, 2010). Sobre papel filtro estéril (7 mm de diámetro) se colocaron 10 μL de la suspensión de esporas del patógeno. En la misma caja de Petri, con una separación de 3 cm, se sembró una asada de la bacteria productora de sideróforos. Las cajas se incubaron durante 10 d a 28°C . Después de

este tiempo, se midió el crecimiento radial del micelio, se calculó el área total que éste ocupaba y se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento comparado con el blanco, que consistió en cajas de Petri con PDA donde únicamente se inoculó el hongo, usando la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{área blanco} - \text{área del tratamiento}}{\text{área del blanco}}$$

3.5 Cuantificación de sideróforos

Para la cuantificación de los sideróforos producidos por las bacterias que presentaron mayor capacidad de inhibición de *C. gloeosporioides* MYA 456, se utilizó el método del Cromo Azurol Sulfonato (CAS) en solución.

Para la obtención de sobrenadante libre de células (SLC) de cada bacteria, se incubó una asada de cada aislado bacteriano en 50 mL de medio mínimo M9 libre de Fe (**apéndice I**) a 28°C y 100 rpm. Después de 48 h de crecimiento, las células fueron precipitadas por centrifugación (10,000 rpm durante 15 minutos) y el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0.22 µm (Millex GV; Carrigwohill, Co,Cork, IE), siendo colectado en tubos estériles y almacenado a 4°C para este análisis y otros posteriores.

La solución indicadora se preparó disolviendo 21.9 mg de HDTMA en 25 mL de agua en agitación constante y con ligero calentamiento. En un contenedor diferente se mezclaron 1.5 mL de 1 mM FeCl₃·6H₂O (en 10 mM HCl) con 7.5 mL de CAS 2 mM. Esta solución fue agregada lentamente al HDTMA en agitación y la mezcla resultante fue transferida a un matraz volumétrico de 100 mL. Se preparó una solución amortiguadora disolviendo 9.76 g de MES en 50 mL de agua; el pH fue ajustado a 6.8 con KOH 50% y esta solución fue añadida al matraz volumétrico que contenía la solución colorante. Finalmente, se agregó agua para aforar al volumen correspondiente (Alexander & Zuberer, 1991).

La concentración de sideróforos en el sobrenadante fue medida mezclando 500 μ L de la solución CAS indicadora con 500 μ L del filtrado, realizando diluciones en caso de ser necesarias, y se agregaron a la reacción 10 μ L de ácido 5-sulfosalicílico 0.2 M. Después de estabilizarse la reacción por 60 min, seió la absorbancia a 630 nm en un lector de micro placas (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

La curva de calibración se realizó utilizando deferroxamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como estándar y medio M9 estéril como solución de referencia. La curva fue preparada midiendo la absorbancia (630 nm) de cada solución estándar dividida entre la absorbancia (630 nm) de la solución de referencia (A/A_{ref}) como función de la cantidad de sideróforos en la solución (Alexander & Zuberer, 1991; Payne, 1994). La concentración de sideróforos en las muestras fue expresada en μ M DFOM.

3.6 Clasificación de sideróforos

Estas pruebas se realizaron de manera cualitativa utilizando el sobrenadante de cada bacteria obtenido a partir del cultivo de éstas en medio mínimo M9 (ver sección anterior). Las pruebas se realizaron por triplicado utilizando como control negativo la cepa **69** no productora de sideróforos proveniente del estado de Zacatecas (ver Proyecto SEP-CONACyT-214108) y como control positivo para hidroxamatos deferroxamina B (6 mM), y para catecolatos, ácido 2, 4-dihidroxibenzoico (6 mM, en metanol al 50%).

3.6.1 Prueba de Arnow

Para la detección de sideróforos del tipo catecolato en sobrenadantes de cultivos biológicos se considera apropiado el uso del ensayo colorimétrico de Arnow (Arnow, 1937). En tubos de ensayo de 10 mL se colocó 1 mL del sobrenadante seguido de 1 mL de HCl 0.5 N, 1 mL del reactivo nitrito-molibdato (10 g de NaNO_2 , 10 g de Na_2MoO_4 disueltos en 100 mL de agua) mezclando cada vez que se agregó una nueva solución. En presencia de grupos catecol debe observarse que la solución se torna amarilla. Por último, la adición de 1 mL de NaOH 1 N debe causar el viraje de la reacción de amarillo a rojo (Payne, 1994).

3.6.2 Prueba de Csaky

A través de esta prueba se detectó la presencia de hidroxamatos dependiente de la oxidación de éstos a nitrito, la cual se caracteriza por la formación de coloración roja resultante de una reacción de acoplamiento diazoico.

Para llevar a cabo el ensayo de manera cualitativa se siguió el procedimiento descrito por Payne (1994) y Csaky (1948), modificado como se describe brevemente. Una alícuota de 1 mL del sobrenadante filtrado fue hidrolizado con 1 mL de H₂SO₄ 6 N en agua 100°C durante 6 h. Posteriormente, la solución fue amortiguada con 3 mL de acetato de sodio (preparado disolviendo 35 g de acetato de sodio en 100 mL agua). La reacción se inició agregando 1 mL de la solución de ácido sulfanílico (preparada a partir de 1 g de ácido sulfanílico disuelto en 100 mL de ácido acético al 30%) seguido de 0.5 mL de una solución de yodo (preparada a partir de 1.3 g yodo disueltos en 100 mL de ácido acético glacial). Después de 5 minutos, el exceso de yodo fue removido agregando 1 mL de tiosulfato de sodio 1.7% (Kobashi *et al.*, 1985). Finalmente, se añadió 1 mL de una solución de α -naftilamina (preparada a partir de 3 g α -naftilamina disueltos en 1000 mL de ácido acético 30%). Después de 30 min, los tubos fueron observados para detectar el viraje a rojo mencionado

3.7 Efecto de sideróforos difusibles en el crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456

Para detectar el efecto de los metabolitos difusibles producidos por las cepas seleccionadas se inocularon 10 μ L de la suspensión de esporas en el centro de cajas de Petri que contenían medio PDA y el sobrenadante de cada cepa bacteriana. A continuación, se describe el procedimiento a detalle utilizado para cada tratamiento.

3.7.1 Sobrenadante libre de células (SLC)

Una azada de las bacterias fue inoculada en matraces Erlenmeyer que contenían 100 mL de medio M9 en agitación constante a 100 rpm a 28°C. Después de 48 h de incubación se centrifugó todo el volumen de los cultivos a 10,000 rpm durante 15 min, para retirar los restos celulares. El sobrenadante obtenido fue filtrado dos veces, la

primera a través de una membrana de Nylon desechable de 0.45 μm (Nalgene, Thermo Scientific; Dallas, Tx, EUA) y la segunda usando una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) estéril de 0.22 μm (Millex GV). Los sideróforos contenidos en los SLC fueron cuantificados por la técnica CAS líquido.

3.7.2 Ensayo de inhibición SLC-patógeno

En matraces Erlenmeyer independientes (uno por bacteria) se prepararon 40 mL PDA 2X esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min, una vez esterilizados se colocaron en un horno a 50 °C para bajar la temperatura y evitar que el medio se solidificara. En condiciones estériles se agregaron 40 mL de cada SLC para tener una relación 1: 1 (PDA: SLC). La mezcla fue homogenizada y vaciada en cajas de Petri (90 x 15 mm). Una vez solidificado el medio, el centro de cada caja fue inoculado con 10 μL de la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/ mL) de *C. gloeosporioides* MYA 456. Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 28°C durante 10 d. Después de este periodo, se fotografiaron los cultivos y se determinó el porcentaje de inhibición midiendo las áreas de cada tratamiento con el software **ImageJ 1.50e** (Abràmoff *et al.*, 2004).

3.7.3 Ensayo de inhibición SLC (sin sideróforos)-patógeno

Para comprobar si el efecto de inhibición de crecimiento en los sobrenadantes estaba asociado a la producción de sideróforos, se inhibió la síntesis de estos adicionando Fe al medio de cultivo. Para obtener un SLC sin sideróforos (SLC/ nS), se inoculó una asada de cada bacteria en matraces que contenían 100 mL de medio M9 adicionado con 100 μM de FeCl_3 . Los cultivos se incubaron en agitación constante a 100 rpm y 28°C durante 48 h. Después de este tiempo, se tomó una alícuota de 1 mL y se verificó que la actividad de sideróforos fuera negativa en todos los cultivos. A partir de esos cultivos se obtuvo el SLC/ nS de la misma manera que en la sección **3.7.1**. Con éstos, se realizó un ensayo de inhibición como se describió en la sección **3.7.2**.

3.8 Identificación molecular de las cepas

3.8.1 Extracción de ADN

La identificación de las cepas seleccionadas se realizó a partir de la extracción del ADN total de los aislados por el método de fenol-cloroformo (Green & Sambrook, 2012). Cada una de las cepas fue incubada durante 24 h a 100 rpm y 28°C en tubos de ensayo que contenían 10 mL de caldo nutritivo. Un alícuota de 1 mL de cada cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm por 5 min para separar la biomasa bacteriana del medio de cultivo. Al pellet obtenido se añadieron 100 µL de buffer TE 1X. El contenido de cada tubo fue transferido a tubos eppendorff de 2 mL que contenían perlas de vidrio. Después de agregar 200 µL de fenol: cloroformo (1: 1 v/ v) y 200 µL de solución Winston (**apéndice I**), fueron agitados vigorosamente durante 15 min. Se añadieron 200 µL de buffer TE 1X, se homogenizó la muestra durante 1 min en un agitador tipo vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue recuperado cuidadosamente y colocado en un nuevo tubo. A éste se añadieron 200 µL de la mezcla fenol: cloroformo (1: 1), se agitó durante 3 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, este proceso se repitió tres veces. Una alícuota de 300 µL de cloroformo se añadió a cada tubo y se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se agregaron 25 µL de NaCl 5 M y 2 mL de etanol absoluto. Después de mezclar por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se secaron los tubos invertidos a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue disuelto en 100 µL de buffer TE (pH 8.0) y 1.23 µL de ribonucleasa (20 µM/ mL en buffer TE pH 8.0). Después de incubar durante 30 min a 37°C se agregaron a la mezcla 40 µL de acetato de amonio 5 M y 250 µL de isopropanol. Los tubos se incubaron nuevamente durante 10 min a temperatura ambiente para después ser centrifugados a 13,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado dos veces con 500 µL de etanol (70%) centrifugando durante 5 min a 12,000 rpm y descartando siempre el sobrenadante. Después de secar los tubos a temperatura ambiente, el ADN obtenido fue resuspendido en 50 µL de buffer TE 1X. La concentración fue determinada

espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop (Thermo Scientific). Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su posterior utilización.

3.8.2 Amplificación del gen 16S ARN ribosomal

El gen 16S ARNr fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templado el ADN total obtenido con la técnica anteriormente descrita. Se usaron los oligos universales para bacterias 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), como cebador "forward" y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') como cebador reverso (Lane, 1991). Para la amplificación, se utilizó el siguiente programa: ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 48°C por 30 s y 72°C por 1.5 min y un paso de elongación final de 72°C por 2 min. Los productos de PCR que contenían los fragmentos de gen 16S ARNr fueron purificados usando el kit PureLink™ Quick PCR (Invitrogen Life Technologies Baltics; Vilna, Vilna, LT) y enviado a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, en el CINVESTAV-Unidad Irapuato.

3.8.3 Análisis de las secuencias

Las secuencias generadas fueron editadas manualmente y analizadas utilizando el programa CLC Sequence Viewer 7 (CLC Bio). Para identificar las bacterias cada secuencia fue alineada utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Los análisis filogenéticos se realizaron con el método de máxima verisimilitud con el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2007). Se utilizó la herramienta "Find best model" para evaluar los modelos de sustitución. El análisis de aproximación (o "bootstrap") se realizó con 1000 réplicas.

3.9 Efecto de la fuente de carbono en la producción de sideróforos

Se midió el efecto de cuatro diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, manitol y glicerol) en la síntesis de sideróforos por las cepas seleccionadas e identificadas en las secciones **3.7** y **3.8** de este estudio.

Se inocularon 1×10^6 UFC/ mL en 50 mL de medio MSM modificado (**apéndice I**) utilizando las diferentes fuentes de carbono (1% p/ v). Durante 5 d se tomaron alícuotas de 2 mL cada 12 h. Se determinó el crecimiento celular midiendo inmediatamente la densidad óptica (D.O.) del cultivo a 595 nm, utilizando un lector de micro placas (TECAN GENios; Unterschbergstrabe, Groedig, Austria). Los tubos con el resto de la alícuota fueron centrifugados 10,000 rpm por 15 min, decantados y almacenados a 4 °C para la posterior cuantificación de sideróforos en los SLC utilizando el método de CAS líquido (Sección **3.4**). Como control se utilizó un matraz sin fuente de carbono. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento.

3.10 Purificación parcial de sideróforos en SLC

3.10.1 Extracción con solventes

Alícuotas de 50 mL de sobrenadante obtenido de la misma forma que en el apartado **3.4** fueron acidificadas hasta pH 2.0 utilizando HCl concentrado. Posteriormente se realizó una extracción utilizando 0.4 volúmenes de acetato de etilo por cada volumen de sobrenadante. Utilizando un embudo de separación se recuperó la fase acuosa y se evaporó hasta sequedad en un rotavapor al vacío. La fracción seca fue resuspendida en 2 mL de agua desionizada o en 2 mL de metanol absoluto (Patel *et al.*, 2009).

3.10.2 Extracción de fase sólida (SPE)

Los sideróforos del SLC se purificaron a partir de 100 mL del cultivo de las cepas en medio M9 (28°C a 100 rpm) durante 96 h. El SLC se obtuvo centrifugando y filtrado el

cultivo (10000 rpm; 15 min; 0.22 μ m). Para la separación se utilizaron cartuchos de separación en fase sólida desechables (GRACE; MaxiClean C18 de 300 mg; Columbia, MD, EUA), a través del procedimiento siguiente: 1) activación de los cartuchos con 5 mL de metanol absoluto; 2) lavado con 5 mL de agua desionizada; 3) inmediatamente después del lavado se cargaron 50 mL de sobrenadante (~5 mL/minuto) utilizando una jeringa de 10 mL; 4) los componentes se eluyeron utilizando 25 mL de metanol al 50%, y 5) finalmente se lavó la columna con metanol absoluto (Ito & Butler, 2005).

3.10.3 Ensayo de CASAD para detectar presencia de sideróforos en los extractos

Para determinar la presencia de sideróforos en los extractos obtenidos se utilizó la técnica CASAD (CAS Agar Diffusion por sus siglas en inglés), que consistió en una modificación de CAS agar descrita por Shin *et al.*, (2001). Una alícuota de 100 mL de la solución colorante azul fue preparada como se describió en la sección 3.3. Por separado, se prepararon 90 mL de una solución que contenía 3.024 g de PIPES y 0.8 g de agarosa. El pH de la solución fue ajustado a 6.8 utilizando KOH, se calentó la solución sobre una placa de calentamiento hasta que la agarosa estuvo completamente disuelta y se añadieron 10 mL de la solución CAS mientras se agitaba constante y lentamente. Después de vaciar en cajas de Petri (80 x 90 mm) y una vez solidificado el gel, se utilizó un sacabocado estéril para realizar cuatro orificios de 10 mm de diámetro en cada caja.

Se colocaron 35 μ L del extracto a analizar en tres orificios de la caja CASAD. Una h después de la aplicación se repitió el procedimiento para un volumen total de 70 μ L por orificio. Se utilizó como blanco metanol absoluto, colocado en el cuarto orificio de la caja haciendo dos aplicaciones de la misma manera que se hizo para los extractos. La concentración de los sideróforos presentes en los extractos también fue cuantificada utilizando el ensayo CAS líquido descrito anteriormente.

3.10.4. Purificación de sideróforos por HPLC

Finalmente, los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo Agilent 1200 Infinity (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, EUA) utilizando una columna de fase reversa C18 (20K BAX) y un gradiente de elución de 0 a 100% de acetonitrilo en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético a un flujo de 1 mL/ min durante 45 minutos (Adler *et al.*, 2012). Las fracciones se recuperaron en intervalos de tiempo de 1 min.

3.11 Ensayo de inhibición de antracnosis en frutos

Se realizaron bioensayos de inhibición en frutos de aguacate infectados con *C. gloeosporioides* MYA 456 aplicando tanto el SLC como los sideróforos semi-purificados provenientes del cultivo de las cepas seleccionada en los ensayos anteriores.

3.11.1 Diseño de cámaras húmedas

Con la finalidad de crear el ambiente húmedo favorable para el desarrollo de la antracnosis y mantener cada tratamiento, así como las unidades experimentales independientes, se diseñaron cámaras húmedas utilizando frascos de vidrio de tapa con rosca.

Previamente, los frascos y sus respectivas tapas fueron lavados sumergiéndolos en una solución de HCl 0.1 N durante 24 h. Posteriormente, estos fueron enjuagados con agua destilada y secados a temperatura ambiente. En el fondo de cada frasco se colocó un segmento de gasa de 25 cm² y un grosor aproximado de 0.5 mm, sobre la tela se colocó una base de plástico (para evitar el contacto del fruto y la gasa) y se agregaron 20 mL de agua destilada sobre la gasa. Los frascos fueron sellados con sus respectivas tapas y esterilizados en autoclave a 1 atm y 121 °C durante 20 min.

3.11.2 Obtención de sobrenadantes y sideróforos semi-purificados

Sobrenadante libre de células con sideróforos (SLC): Una alícuota de 1 mL de cultivo celular que contenía 1×10^9 UFC/ mL de las cepas seleccionadas fue inoculado en matraces Erlenmeyer que contenían 250 mL de medio M9 sin Fe añadido. Los cultivos se incubaron a temperatura y agitación constante (28°C y 100 rpm) durante 96 h. Se centrifugó todo el volumen de los cultivos 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue esterilizado dos veces por filtración, la primera a través de una membrana de Nylon desechable de 0.45 μm (Nalgene, Thermo Scientific) y, la segunda usando una membrana PVDF de 0.22 μm (Millex GV). Los sideróforos contenidos en los SLC fueron cuantificados por la técnica CAS líquido.

Sobrenadante libre de células sin sideróforos (SLC/ nS): Una alícuota de 1 mL de cultivo celular que contenía 1×10^9 UFC/ mL de las cepas seleccionadas fue inoculado en matraces Erlenmeyer que contenían 250 mL de medio M9 adicionado con 100 μM de FeCl_3 para inhibir la síntesis de sideróforos. Los cultivos se incubaron a temperatura y agitación constante (28°C y 100 rpm) durante 96 h. Se centrifugó todo el volumen de los cultivos 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue esterilizado dos veces por filtración, al igual que en el proceso anterior. Se comprobó que no existiera actividad de sideróforos en los sobrenadantes utilizando la técnica CAS líquido.

Semipurificación de sideróforos en sobrenadantes: tanto el SLC como el SLC/ sN fueron tratados para su purificación pasándolos a través de una columna de separación en fase sólida (Maxi-Clean C18) como fue descrito en la sección **3.10.2**.

3.11.3 Tratamientos

El experimento consistió de ocho tratamientos con tres réplicas independientes de cada uno. Los tratamientos y la nomenclatura utilizada se enlistan en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Tratamientos utilizados en ensayo de inhibición de antracnosis *in vivo*.

Código	Descripción	Sideróforos μM DFOM
Sideróforos antifúngicos producidos por cepa seleccionada		
SLC	Sobrenadante libre de células con sideróforos	34
SP	Sideróforo columna C18	34
SLC/ nS	Sobrenadante libre de células sin sideróforos	-
SP/ nS	Sobrenadante sin sideróforos columna C18	-
Controles Negativos		
M9	Medio M9 sin hierro	-
M9H	Medio M9 con hierro	-
MeOH	Metanol 50%	-
H₂O	Control absoluto agua destilada estéril	-
Control Positivo		
Cap	“Captan” 2 g/L	-

3.11.4 Aplicación de tratamientos e inoculación de los frutos

Se seleccionaron treinta frutos de aguacate cultivar “Hass” de talla y grado de maduración uniformes, así como ausencia aparente de lesiones o infecciones. Los frutos fueron lavados y desinfectados superficialmente sumergiéndolos durante 5 min en etanol 70%, enjuagados con agua destilada estéril, colocados durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio 2%, nuevamente enjuagados con agua destilada estéril. A continuación, fueron secados a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar.

Se realizaron tres heridas uniformes de 10 mm de longitud y ~3 mm de profundidad en diferentes puntos de la superficie de cada fruto utilizando un escalpelo estéril. Cada fruto fue asperjado con los tratamientos descritos anteriormente y se dejó secar durante 30 min. Dentro de las heridas se colocaron pequeños círculos de papel filtro estéril sobre los cuales se colocaron 15 μL de la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/ mL) del patógeno *C. gloeosporioides* MYA 456. Los frutos se colocaron dentro de las cámaras húmedas y se incubaron a 28°C. Después de 10 d se cortaron cuidadosamente ~25 cm² (alrededor de la zona inoculada con el patógeno) del pericarpio de los frutos para poder observar la existencia de lesiones presentes en el mesocarpio. Los frutos se fotografiaron y se midió el área de las lesiones utilizando el programa ImageJ 1.50e (Abràmoff *et al.*, 2004).

IV RESULTADOS

4.1 Características fisicoquímicas del suelo

En la **Tabla V** se presentan los resultados correspondientes al análisis fisicoquímico del suelo utilizado para el aislamiento bacteriano. En general, el suelo es de textura franco arenosa y pH neutro.

Tabla V. Parámetros fisicoquímicos del suelo utilizado para el aislamiento bacteriano.

Parámetro	Contenido
Textura	Franco arenoso
Punto de saturación (%)	69.90
Capacidad de campo (%)	52.20
Densidad aparente (g/ cm ³)	0.95
pH	6.61
Materia orgánica (%)	2.58
Fertilidad (ppm):	
Nitrógeno (N-Inorgánico)	10.10
Fósforo (P-Bray)	1.20
Potasio (K)	676
Calcio (Ca)	2105
Magnesio (Mg)	445
Sodio (Na)	32.2
Hierro (Fe)	62.5
Manganeso (Mn)	8.8
Cobre (Cu)	2.1

En cuanto a los elementos que determinan la fertilidad, el suelo presentó alto contenido de materia orgánica (2.58%), K (676 ppm), Mg (445 ppm), Fe (62.5 ppm) y Cu (2.10 ppm), mientras que en un rango medio se encontraron los elementos Ca (2105 ppm), N (10.1 ppm) y Mn (8.78). Finalmente se reportaron muy bajas concentraciones de P (1.17 ppm) y Na (32.2 ppm).

4.2 Aislamiento y selección de bacterias productoras de sideróforos

Los datos sobre la capacidad de producción de sideróforos de los aislados bacterianos de interés se presentan en la **Tabla VI**. A partir de 78 aislados bacterianos sembrados

por punción en medio CAS-agar se seleccionaron un total de 36 bacterias productoras de sideróforos.

Tabla VI. Aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de producir sideróforos.

Procedencia	Analizadas	Sideróforos
Rizósfera de plantas de aguacate (Zamora, Mich.)	33	14
Rizósfera de plantas de una zona contaminada con Pb (Guadalupe, Zac.)	15	5
Rizósfera de plantas de maíz del Estado. de México, Michoacán y Guanajuato.	30	17

El color del medio CAS-agar cambió de azul a naranja debido a la secreción de sideróforos por las bacterias (**Figura 3 a-g**). La porción de medio ocupada por el área del halo indicador resultó diferente en cada aislado. En los casos donde no se observó el cambio de coloración (**Figura 3 h**) se consideró como un resultado negativo para la prueba.

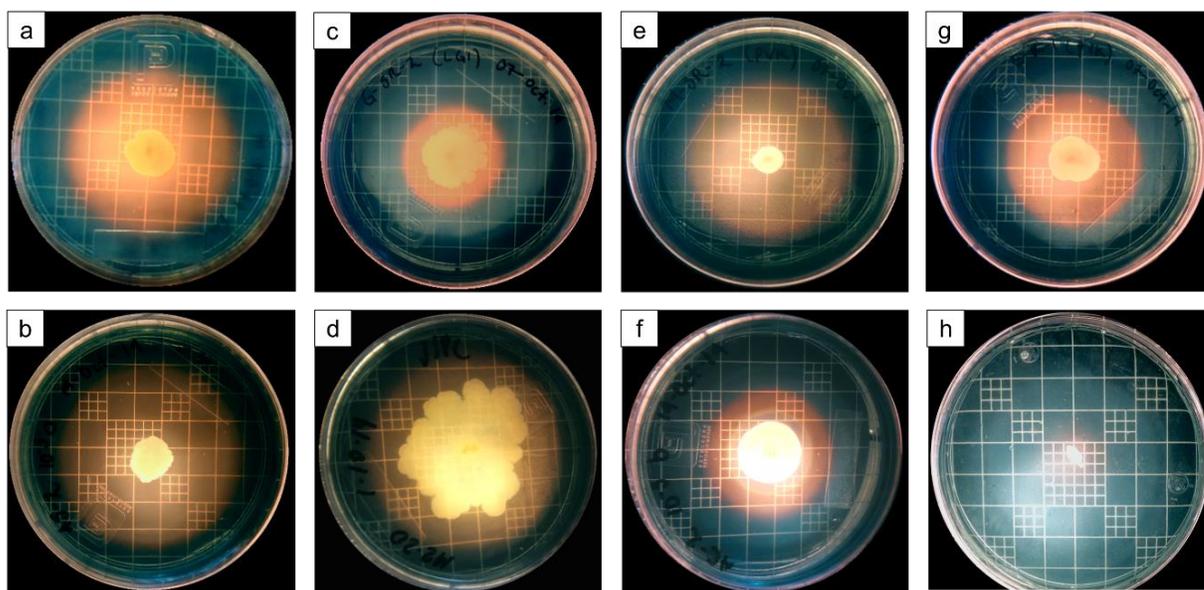


Figura 3. Crecimiento colonial de rizobacterias productoras de sideróforos en medio de cultivo sólido CAS-agar a los 7 d de incubación a 28°C. a) *Burkholderia cepacia* XXVI (control positivo), y aislados b) AS25a, c) GSR2, d) M2.20, e) MSR2, f) AE25b, g) ER1 y h) 69 (negativo para esta prueba).

4.3 Antagonismo *in vitro*

Los resultados de inhibición del crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides* MYA 456 co-inoculado en cajas de Petri con los aislados productores de sideróforos seleccionados se presentan en la **Tabla VII**. Con base a la prueba cualitativa de formación de halo, se seleccionaron 36 rizobacterias productoras de sideróforos para determinar su actividad antagónica contra *C. gloeosporioides* MYA 456. Después de 10 d de incubación, los aislados productores de sideróforos presentaron actividad antagónica variable. Once de los aislados probados no inhibieron el crecimiento del patógeno *C. gloeosporioides*, incluidos en este grupo cuatro aislados provenientes de Zacatecas, al igual que el aislado M2.20

Tabla VII. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456 por aislados bacterianos capaces de producir sideróforos.

Aislado	Cultivo	Procedencia	Inhibición (%) [*]
Blanco	-	-	0.0 ± 0.0 ^a
AE21d ₁	Aguacate	Chilchota, Mich.	9.8 ± 1.4 ^{abcd}
AE11f	Aguacate	Chilchota, Mich.	19.4 ± 4.0 ^{defgh}
AS11i	Aguacate	Chilchota, Mich.	24.5 ± 5.0 ^h
AE11j	Aguacate	Chilchota, Mich.	23.3 ± 3.9 ^h
AE21c	Aguacate	Chilchota, Mich.	11.1 ± 0.4 ^{bcdef}
AS25a	Aguacate	Chilchota, Mich.	22.5 ± 2.5 ^{gh}
AE25a	Aguacate	Chilchota, Mich.	20.7 ± 4.0 ^{efgh}
AE21d	Aguacate	Chilchota, Mich.	11.4 ± 1.4 ^{bcdef}
AE21h	Aguacate	Chilchota, Mich.	21.1 ± 1.8 ^{fgh}
AS11e	Aguacate	Chilchota, Mich.	11.8 ± 2.1 ^{bcdef}
AE11i	Aguacate	Chilchota, Mich.	6.0 ± 0.4 ^{ab}
AE11d	Aguacate	Chilchota, Mich.	6.3 ± 1.4 ^{ab}
AE21i	Aguacate	Chilchota, Mich.	44.0 ± 2.5 ^{jk}
AE25b	Aguacate	Chilchota, Mich.	35.8 ± 10.8 ^{ij}
MSR1	Maíz	Michoacán	23.1 ± 1.3 ^h
MSR2	Maíz	Michoacán	24.5 ± 2.1 ^h
ESR2	Maíz	Estado de México	18.3 ± 0.2 ^{cdefgh}
ER1	Maíz	Estado de México	12.4 ± 2.8 ^{bcdefg}
GSR2	Maíz	Guanajuato	8.9 ± 0.1 ^{abc}
ESA2	Maíz	Estado de México	0.0 ± 0.0 ^a
GSA2	Maíz	Guanajuato	4.4 ± 0.6 ^{ab}
GSR2	Maíz	Guanajuato	4.7 ± 0.6 ^{ab}
ER3	Maíz	Estado de México	0.0 ± 0.0 ^a
MR2	Maíz	Michoacán	8.4 ± 0.9 ^{abc}
MSA1	Maíz	Michoacán	9.0 ± 0.8 ^{abc}
MR2	Maíz	Michoacán	0.0 ± 0.0 ^a
MR1	Maíz	Michoacán	27.5 ± 0.8 ^{hi}
ESR3	Maíz	Estado de México	10.7 ± 0.9 ^{bcde}
ER4	Maíz	Estado de México	0.0 ± 0.0 ^a
MSA1	Maíz	Michoacán	0.0 ± 0.0 ^a
ER2	Maíz	Estado de México	0.0 ± 0.0 ^a
1	Suelo	Guadalupe, Zac.	0.0 ± 0.0 ^a
M3A.6	Maíz	Guadalupe, Zac.	0.0 ± 0.0 ^a
M3A.4	Maíz	Guadalupe, Zac.	0.0 ± 0.0 ^a
M2.20	Maíz	Guadalupe, Zac.	6.3 ± 1.4 ^{ab}

52	Suelo	Guadalupe, Zac.	0.0 ± 0.0 ^a
<i>B. cepacia</i> XXVI	Mango (control +)	Chauhites, Oax.	46.9 ± 0.8 ^k
69	Sedimento (control -)	Guadalupe, Zac.	0.0 ± 0.0 ^a

*Valores con letras diferentes indican diferencia estadística significativa por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

El aislado 69 no presentó actividad antagónica contra el patógeno. Se observaron diferentes porcentajes de inhibición micelial de *C. gloeosporioides* por las rizobacterias aisladas de árboles de aguacate, siendo los más altos AE21i ($44 \pm 2.5\%$) y AE25b ($35.8 \pm 10.8\%$), los cuales, sin embargo, no presentaron diferencias significativas respecto al control positivo (*B. cepacia* XXVI). Los aislados AS25a, AE25a, AS11i y AE21h mostraron inhibición de crecimiento del patógeno entre 20-25%. Las bacterias provenientes de la rizósfera de plantas de maíz que presentaron mayor inhibición del crecimiento del *C. gloeosporioides* fueron MSR2 ($24.5 \pm 2.1\%$), MRI ($27.5 \pm 0.8\%$), ESR2 ($18.3 \pm 0.2\%$) y ER1 ($12.4 \pm 2.8\%$).

4.4 Producción y clasificación de sideróforos

Los valores de producción de sideróforos por las rizobacterias antagonistas a *C. gloeosporioides* seleccionadas se presentan en la **Tabla VIII**. La producción máxima de sideróforos después de 24 h de cultivo fue detectada en el aislado MSR2 ($22.8 \pm 2.5 \mu\text{M DFOM}$), seguido de los aislados ER1, ESR2, MR1 y AES25a con una producción de sideróforos de 8.5-15.6 $\mu\text{M DFOM}$.

Tabla VIII. Producción y tipo de sideróforos generados por rizobacterias antagonistas a *C. gloeosporioides* MYA 456.

Aislado	Sideróforos $\mu\text{M DFOM}^*$	Tipo de Sideróforo	
		Catecolato	Hidroxamato
MSR2	22.8 ± 2.5^b	-	+
ER1	8.5 ± 2.4^{de}	+	+
ESR2	13.8 ± 4.2^{cd}	+	+
MR1	15.6 ± 2.6^c	-	+
AE21i	5.0 ± 0.5^{ae}	-	+
AE25b	1.0 ± 0.04^a	-	+
AS25a	12.0 ± 0.9^{cd}	-	+
69 (control negativo)	0.0 ± 0.0^a	-	-
<i>B. cepacia</i> XXVI (control positivo)	64.8 ± 0.4^f	-	+

*Valores con letras diferentes indican diferencia estadística significativa por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

Asimismo, la menor producción de sideróforos fue cuantificada en los aislados AE21i ($5.0 \pm 0.51 \mu\text{M DFOM}$) y AE25b ($1.0 \pm 0.04 \mu\text{M DFOM}$), en los cuales no se observó diferencia significativa con el control negativo.

Los resultados cualitativos del tipo de sideróforos en el sobrenadante de los aislados bacterianos antagonistas seleccionados, así como a los controles negativo y positivo se presentan, también en la **Tabla VIII**. Se determinó mediante la prueba de Csaky la presencia de sideróforos del tipo hidroxamato en todos los sobrenadantes de las bacterias analizadas. La presencia de sideróforos del tipo catecolato (prueba de Arnow) fue detectada únicamente en el sobrenadante de los aislados ER1 y ESR2 resaltando que estos aislados fueron los únicos donde se detectó la presencia de dos tipos de sideróforos.

4.5 Efecto de presentes en el SLC sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456

Los resultados del efecto de los sideróforos presentes en el SLC de los aislados rizobacterianos antagonistas seleccionados se presentan en la **Figura 4**. Después de 10 d, los metabolitos con actividad de sideróforos secretados por las rizobacterias antagonistas, inhibieron parcialmente el crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456, mientras que dicho fitopatógeno mostró un crecimiento normal en los controles que solamente contenían medio PDA y medio M9+PDA (**Figura 4**).

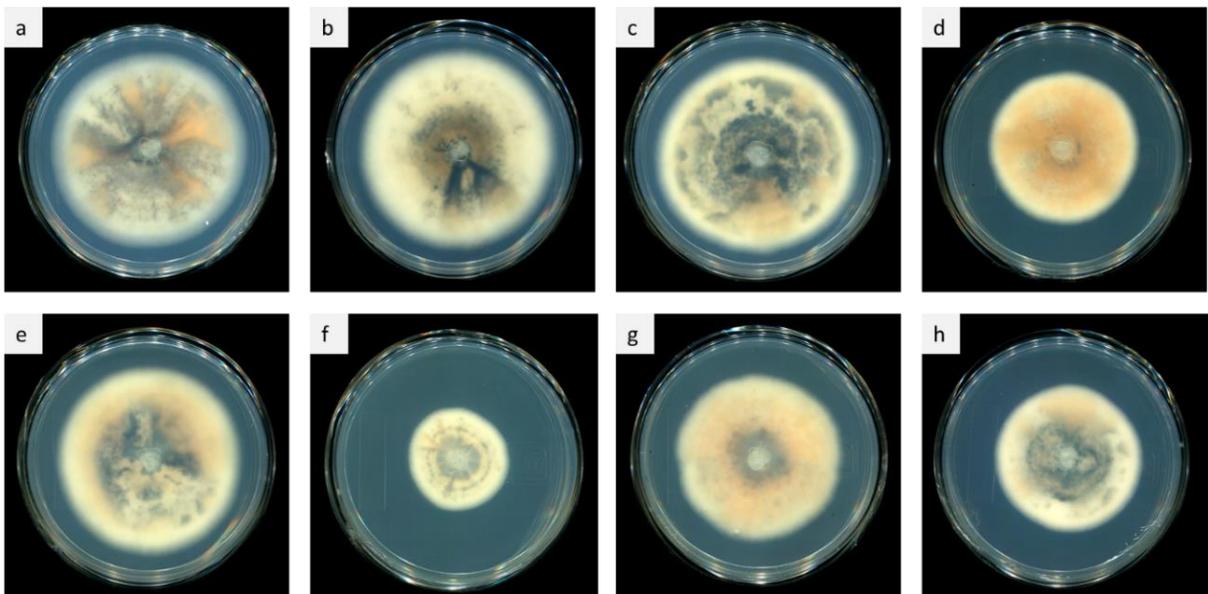


Figura 4. Aspecto de la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* MYA 456 por los sobrenadantes libres de células con sideróforos de varios aislados bacterianos. Los tratamientos mostrados son: a) PDA (blanco); b) PDA+M9 (control negativo); c) 69 (control negativo); d) *B. cepacia* XXVI (control positivo); e) AE21i; f) MSR2; g) AE25b, y h) ER1.

Los datos de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456 se presentan en la **Tabla IX**. Se cuantificaron diferencias significativas entre los extractos evaluados, destacando los extractos de los aislados MSR2 ($69.7 \pm 1.4\%$), ERI ($43.5 \pm 5.0\%$) y AE25b ($27.8 \pm 1.2\%$). Respecto al control positivo, únicamente MSR2 y AE25b presentaron diferencia significativa. La inhibición de *C. gloeosporioides* por el SLC del aislado AE21i ($6.3 \pm 1.2\%$) fue el menor valor cuantificado, siendo estadísticamente igual al control (M9 + PDA). Estos resultados indican que algunos metabolitos

producidos por las rizobacterias analizadas inhiben de manera significativa el crecimiento del fitopatógeno.

Tabla IX. Inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456 por la actividad de sideróforos presentes en los sobrenadantes libres de células de rizobacterias.

Aislado	Sideróforos ($\mu\text{M DFOM}^*$)	Inhibición (%) [*]
AE21i	16.5 ± 0.5^b	6.3 ± 1.2^b
AE25b	1.5 ± 0.2^a	27.8 ± 1.2^c
ER1	21.6 ± 4.4^b	43.5 ± 5.1^d
MSR2	36.5 ± 0.8^c	69.7 ± 1.4^e
<i>B. cepacia</i> XXVI control (+)	45.2 ± 1.4^d	45.2 ± 4.1^d
PDA Blanco	0.0 ± 0.0^a	0.0 ± 0.0^a
M9+PDA control (-)	0.0 ± 0.0^a	0.0 ± 0.9^{ab}
69 control (-)	0.0 ± 0.0^b	0.0 ± 0.0^a

*Valores con letras minúsculas (Sideróforos/Inhibición) diferentes indican diferencia estadística significativa por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

4.6 Efecto del SLC sin sideróforos sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456

En la **Figura 5** se presentan los resultados cualitativos del efecto antagónico contra *C. gloeosporioides* MYA 456 del SLC sin sideróforos de los aislados rizobacterianos antagonistas seleccionados. Como se indicó en la metodología, la adición de 100 $\mu\text{M/L}$ de FeCl_3 al medio de cultivo inhibió la síntesis de sideróforos de los aislados AE25b, AE21i, MSR2, ER1 y el control positivo *B. cepacia* XXVI. Se observó que el aislado MSR2 perdió la capacidad de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides*, mientras que los aislados AE21i, AE25b y ER1 mantuvieron dicha capacidad.

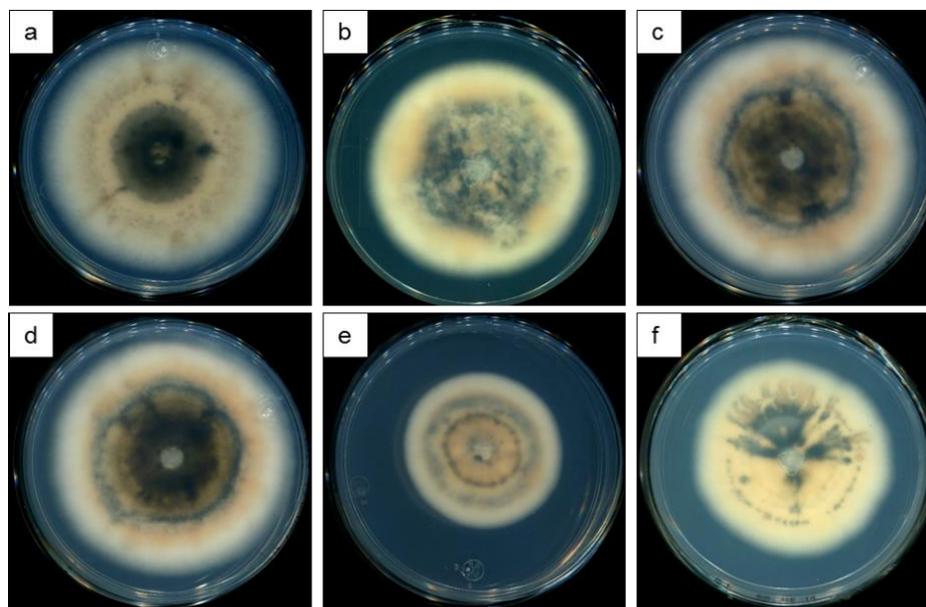


Figura 5. Aspecto de la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* MYA 456 por los sobrenadantes libres de células (SLC) sin sideróforos de varios aislados bacterianos. Los tratamientos mostrados son: a) Blanco; SLC de aislado b) AE21i; c) MSR2; d) 69 (Control negativo); e), y f) AE25b. En todas las imágenes se muestran diferencias en el área de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* después de 10 d de incubación a 28°C.

Los resultados del efecto de los SLC carentes de sideróforos obtenidos de los aislados bacterianos seleccionados se presentan en la **Tabla X**. Únicamente el aislado MSR2 perdió la capacidad de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. Por otra parte, los aislados AE21i y ER1 no perdieron dicha capacidad de inhibición, siendo $5.4 \pm 1.1\%$ y $57 \pm 0.8\%$, respectivamente. Estos valores fueron similares a los estimados cuando se emplearon SLC con sideróforos (comparar **Tablas IX y X**).

Tabla X. Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* MYA 456 por sobrenadantes libres de células sin sideróforos.

Aislado	Inhibición (%)*
AE21i	5.4 ± 1.1^b
AE25b	27.8 ± 3.8^b
MSR2	0.0 ± 0.2^a
ER1	57.4 ± 0.8^d
<i>B. cepacia</i> XXVI control (+)	0.0 ± 0.1^a
PDA (Blanco)	0.0 ± 0.8^a
M9+PDA control (-)	0.0 ± 0.5^a
69 Control (-)	0.1 ± 0.6^a

*Valores con letras diferentes indican diferencia estadística significativa por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

4.7 Identificación molecular de los aislados

Los resultados de la identificación molecular de los aislados bacterianos seleccionados se presentan en la **Figura 6**. Los alineamientos múltiples de las secuencias mostraron similitud entre 100 y 99% con las secuencias de bacterias de los géneros *Burkholderia*, *Serratia* y *Pseudomonas*.

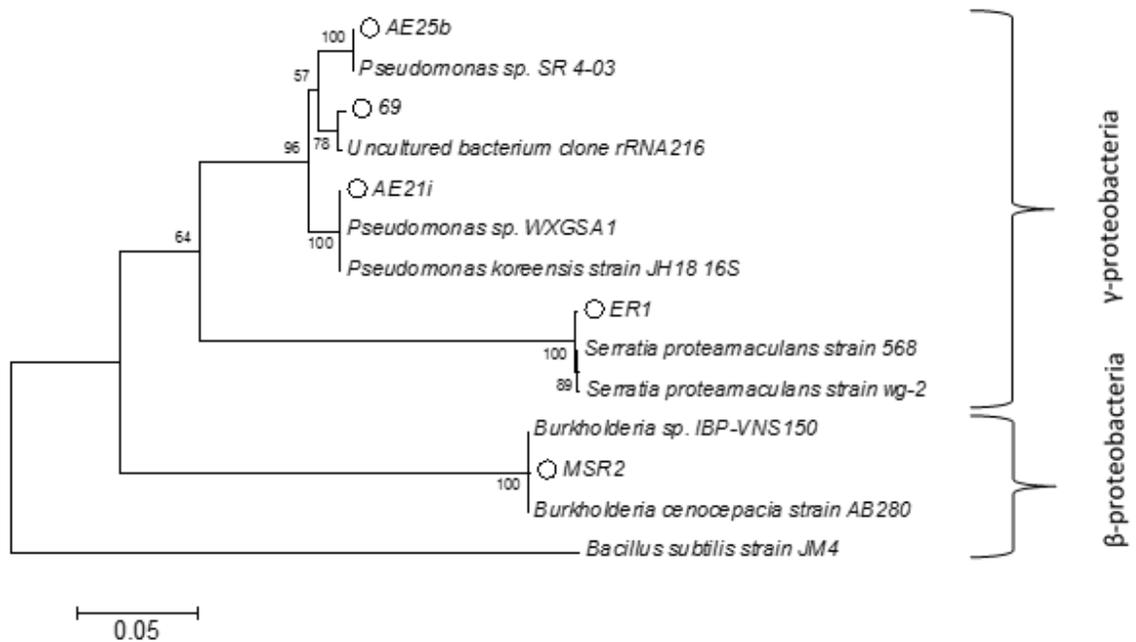


Figura 6. Reconstrucción filogenética mediante el método de máxima verosimilitud de las secuencias parciales del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos antagonistas a *C. gloeosporioides* MYA 456 (los círculos blancos representan las bacterias analizadas en este estudio).

Los aislados AE21i, AE25b (productores de sideróforos) y 69 (no productor de sideróforos) se agruparon dentro del género *Pseudomonas*, el aislado MSR2 mostró similitud con cepas identificadas como *Burkholderia cenocepacia*, mientras que ER1 fue identificado como una bacteria del género *Serratia*. La bacteria identificada como *Burkholderia cenocepacia* MSR2 fue seleccionada por producir sideróforos con capacidad de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456 y fue utilizada para los ensayos posteriores.

4.8 Efecto de la fuente de carbono en la producción de sideróforos

Las cinéticas de crecimiento-producción de sideróforos de la cepa *B. cenocepacia* MSR2 en diferentes fuentes de carbono (C) se presentan en la **Figura 7**. Los resultados de las cinéticas muestran una relación directa entre la producción de sideróforos y el crecimiento celular (medido como aumento en la D.O._{595 nm}) en todas las fuentes de C (**Figura 7 a, b, c, d**). En contraste, el tratamiento sin C mostró inhibición de crecimiento celular y de producción de sideróforos.

En la **Figura 7** se muestra que la cepa *B. cenocepacia* MSR2 no presentó producción de sideróforos durante las primeras horas de incubación en ninguna de las fuentes de C empleadas. La producción de sideróforos se registró a partir de las 12 h en los medios de cultivo que contenían glucosa y sacarosa como fuente de C, mientras que en los medios con manitol y glicerol se registró crecimiento hasta las 24 h de cultivo. Tanto en el medio de cultivo que contenía glucosa como en el que contenía sacarosa, la máxima producción de sideróforos fue cuantificada a partir de las 72 h de cultivo, permaneciendo constante hasta el final del experimento. Por otra parte, en los medios con manitol y glicerol la concentración máxima de sideróforos fue registrada hasta las 96 h de cultivo. La máxima producción de sideróforos se registró durante un periodo de 12-36 h coincidiendo con la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria.

Después de 120 h de cultivo, se cuantificó la cantidad de sideróforos acumulados en los medios inoculados con *B. cenocepacia* MSR2 (**Figura 8**), encontrando que la bacteria produjo una mayor cantidad de sideróforos ($208.4 \pm 1.7 \mu\text{M DFOM}$) cuando utilizó manitol como única fuente de C, mientras que concentraciones de $85.5 \pm 1.1 \mu\text{M DFOM}$, $47.6 \pm 9.5 \mu\text{M DFOM}$ y $9.0 \pm 0.65 \mu\text{M DFOM}$ fueron registradas al emplear glicerol, sacarosa y glucosa, respectivamente.

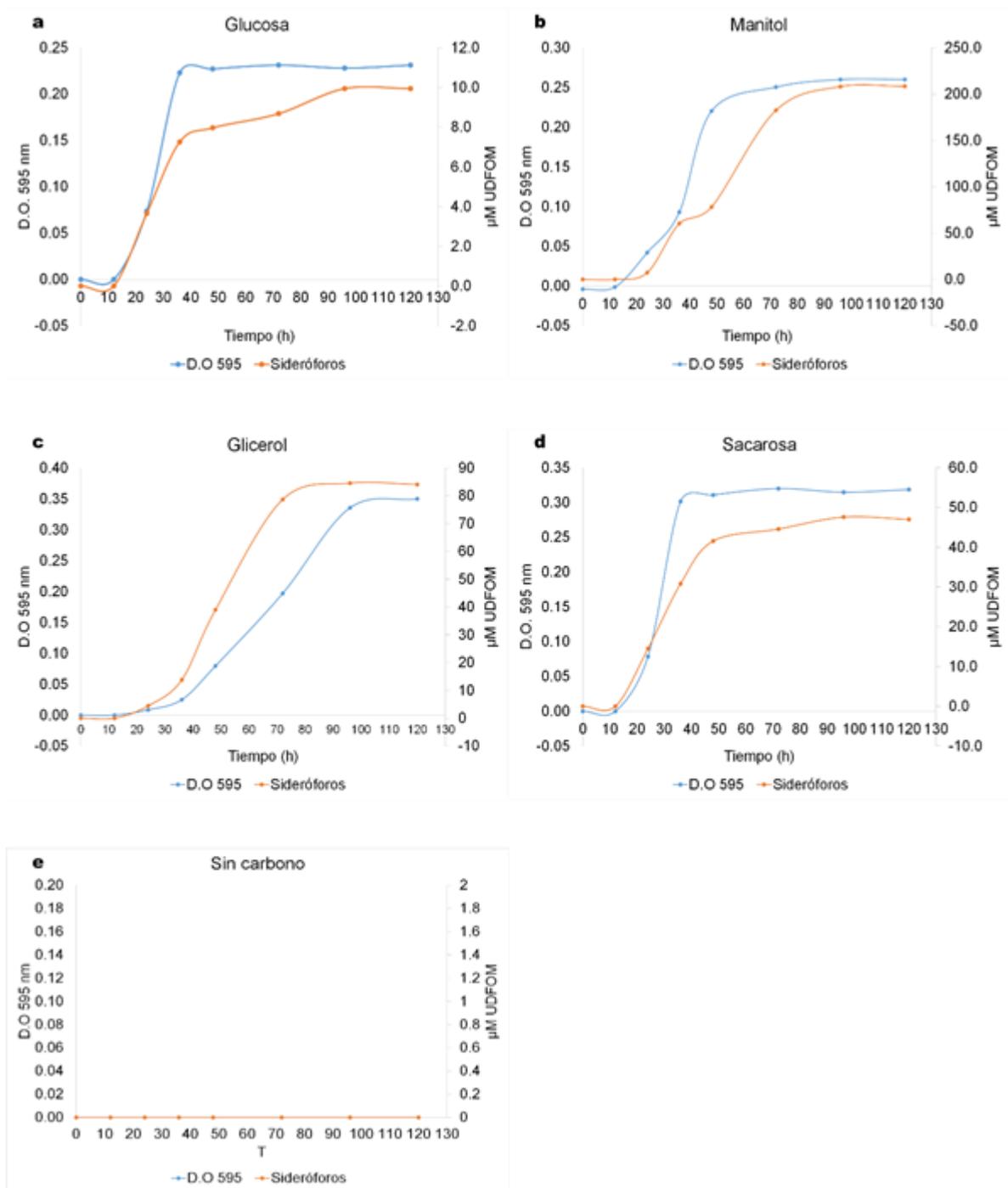


Figura 7. Cinética de crecimiento y acumulación de sideróforos en *B. cenocepacia* MSR2 cultivada en medios preparados con diferentes fuentes de carbono: a) glucosa; b) manitol; c) glicerol; d) sacarosa, y e) sin C (control).

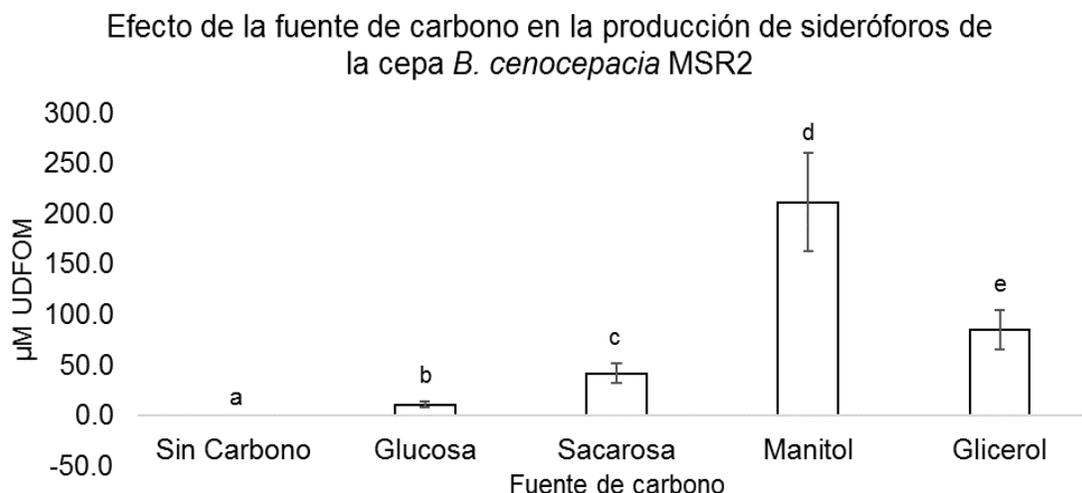


Figura 8. Cantidad de sideróforos producidos por *B. cenocepacia* MSR2 después de 120 h de incubación en medios de cultivo M9 complementado con diferentes fuentes de carbono. Barras con letras diferentes indican diferencia estadística significativa por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

4.9 Purificación parcial de sideróforos presentes en SLC

4.9.1 Extracción con solventes

Los resultados de la purificación parcial de sideróforos extracelulares producidos por *B. cenocepacia* MSR2, *S. proteamaculans* ER1, *Pseudomonas* 69 (control negativo) y *B. cepacia* XXVI (control positivo) purificados a partir del SLC se presentan en la **Figura 9** y la **Tabla XI**. En la **Figura 9a**, se muestran los resultados obtenidos al utilizar la técnica CASAD para determinar la actividad de sideróforos en los SLC, donde se observa la formación del halo amarillo en los pozos que corresponden a *B. cenocepacia* MSR2, *B. cepacia* XXVI (control positivo) y *S. proteamaculans* ER1, éste último apenas perceptible. La cantidad de sideróforos ($\mu\text{M DFOM}$) registrada en cada muestra de SLC fue de 72.6 ± 3.9 para *B. cenocepacia* MSR2, 81.5 ± 1.1 para *B. cepacia* XXVI y 25.2 ± 1.5 para la cepa *S. proteamaculans* ER1 (**Tabla XI**).

Respecto a los extractos concentrados en 2 mL de agua desionizada (**Figura 9b**) se observó que tanto la actividad ($82.8 \pm 9.9 \mu\text{M DFOM}$) como el tamaño y la intensidad del halo indicador en el extracto de la cepa *S. proteamaculans* ER1 se incrementó considerablemente respecto a los resultados mostrados en la **Figura 9a**. Se observó

lo mismo en cuanto al tamaño del área del halo indicador y de la actividad (234.9 ± 8.0 μM DFOM) del extracto concentrado perteneciente a *B. cenocepacia* MSR2. Sin embargo, la intensidad del color fue menor a la del sobrenadante. No se observó ningún halo en el concentrado correspondiente al extracto de *B. cepacia* XXVI, ni se registró actividad.

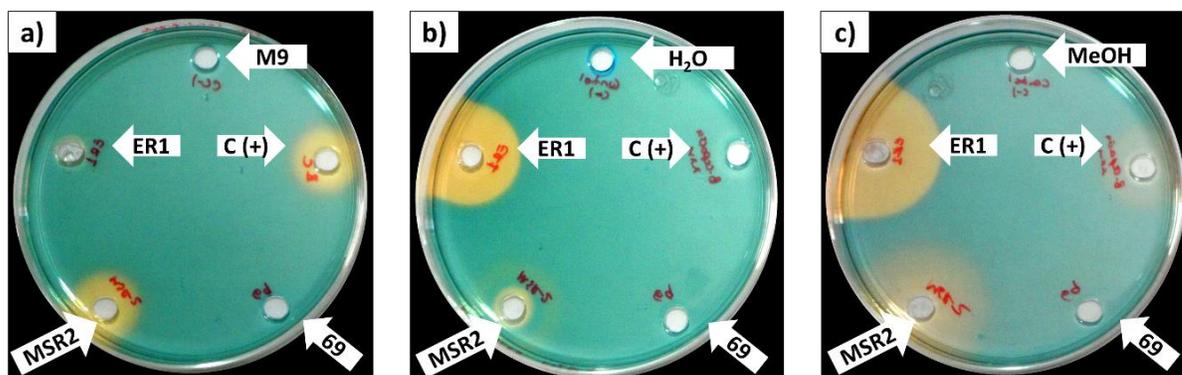


Figura 9. Resultados cualitativos de la actividad de sideróforos en suspensión por la técnica de CASAD. a) SLC sin concentrar; b) SLC concentrado en agua; c) SLC concentrado en metanol. Dentro de las flechas blancas se colocó el código correspondiente al SLC colocado en cada pozo siendo estos: *B. cenocepacia* MSR2, *Serratia* sp. ER1, *B. cepacia* XXVI C (+) y *Pseudomonas* sp. 69 C (-); así como los blancos respectivos de cada tratamiento (M9, H₂O y MeOH).

Para los extractos concentrados en 2 mL de metanol absoluto se registraron concentraciones de sideróforos de 110.4 ± 6.2 para *B. cenocepacia* MSR2, 38.3 ± 2.8 para *B. cepacia* XXVI y 95.01 ± 2.2 μM DFOM para *S. proteamaculans* ER1 (**Figura 9c**). La prueba de actividad en CASAD de los extractos concentrados en metanol mostró la formación de halos de menor intensidad y tamaño en *B. cenocepacia* MSR2 y *B. cepacia* XXVI, mientras que para *S. proteamaculans* ER1 se observó un aumento del halo indicador en el extracto concentrado respecto a las pruebas anteriores.

Tabla XI. Actividad de sideróforos presentes en los sobrenadantes libres de células, originales o concentrados en agua y metanol, provenientes de cepas bacterianas antagonistas a *C. gloeosporioides* MYA 456.

Cepa	Sideróforos μM DFOM		
	Sobrenadante	Extracto H ₂ O	Extracto (MeOH)
<i>B. cepacia</i> XXVI (control +)	81.5 ± 1.1	-	38.3 ± 2.8
<i>B. cenocepacia</i> MSR2	72.6 ± 3.9	234.9 ± 8.0	110.4 ± 6.2
<i>S. proteamaculans</i> ER1	25.2 ± 1.5	82.8 ± 9.9	95.01 ± 2.2
<i>Pseudomonas</i> sp. 69 (control -)	-	-	-

4.9.2 Análisis por HPLC de los sideróforos presentes en los extractos

El análisis por HPLC de los extractos con sideróforos de cada una de las cepas se muestra en la **Figura 10**. En los cromatogramas cada pico representa un metabolito en el extracto. No se registraron picos de tamaño considerable para la cepa *Pseudomonas* sp. 69 seleccionada como control negativo (**Figura 10a**). En el cromatograma del extracto con sideróforos de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2 disuelto en agua (**Figura 10b**) se observó la presencia de tres picos sobresalientes en los tiempos de retención 12.7, 18.5 y 20.2 min, respectivamente, siendo el segundo el de mayor tamaño. Para el extracto con sideróforos de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2 disuelto en metanol (**Figura 10c**) se detectó la presencia de los picos en los tiempos de retención 12.7 y 20.2 min, respectivamente, no encontrándose el pico del tiempo 18.5 min que se observó en MSR2_{agua} y registrándose la presencia de otro pico en el tiempo 11.9 min, el cual no fue observado en el cromatograma del extracto de sideróforos concentrado en agua. Asimismo, en el cromatograma del extracto con sideróforos del tipo hidroxamato de la cepa *B. cepacia* XXVI disuelto en metanol (**Figura 10d**) se encontraron tres picos sobresalientes a los 12.7, 18.5 y 20.2 min, respectivamente, registrándose el mismo patrón de metabolitos observado en *B. cenocepacia* MSR2_{agua}. En el cromatograma correspondiente al extracto con sideróforos del tipo catecolato e hidroxamato se registró un pico de gran tamaño en el tiempo de retención 12.4 min y uno menor en el tiempo de retención 10.7 min, este último apenas perceptible (**Figura 10e**).

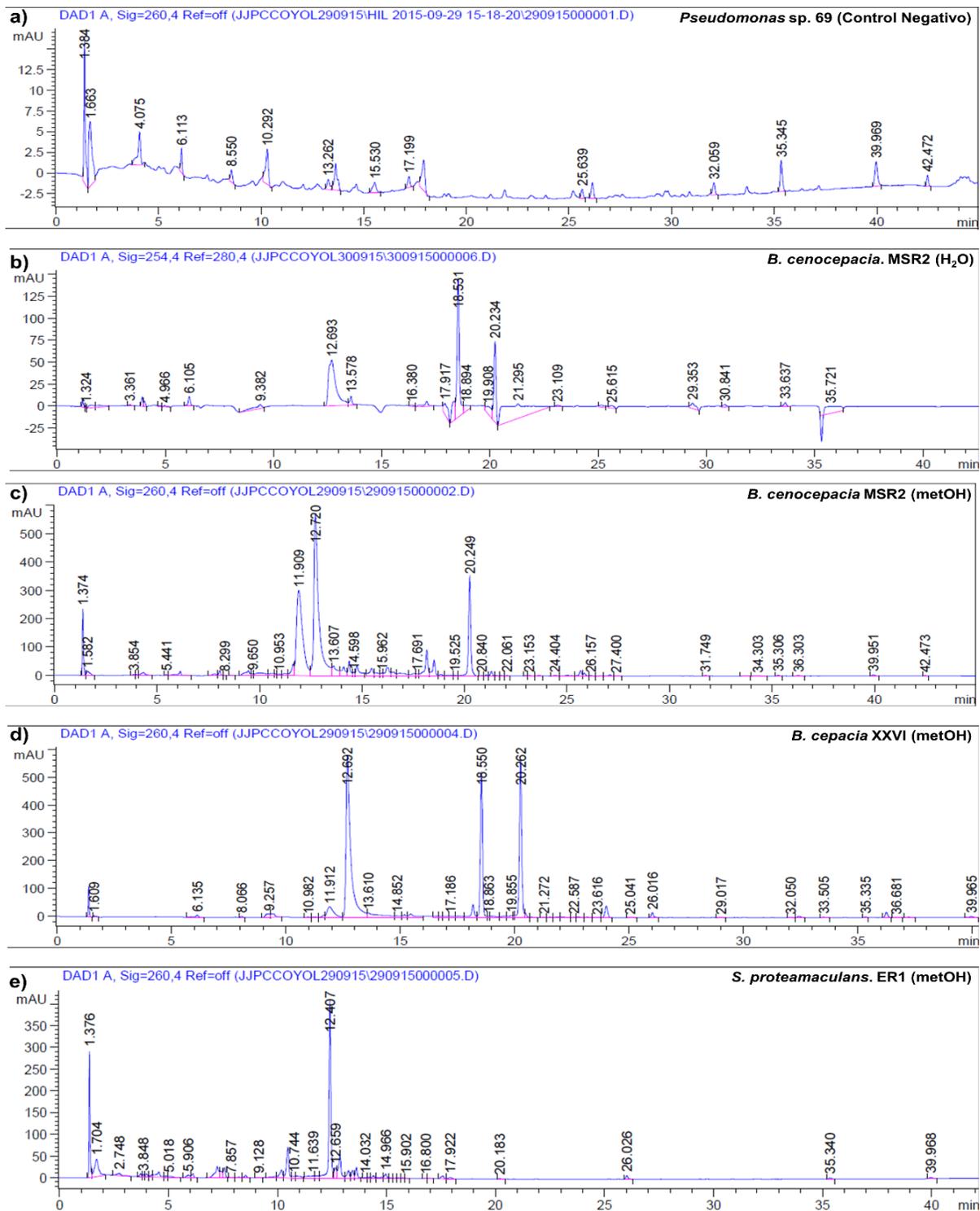


Figura 10. Cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC de los sobrenadantes libres de células concentrados en diferentes solventes de las siguientes cepas: a) *Pseudomonas sp. 69*; b) *B. cenocepacia MSR2*; c) *B. cenocepacia MSR2*; d) *B. cepacia XXVI*, y e) *S. proteamaculans ER1*. Purificación en fase reversa con una columna C18 y un gradiente de elución de 0 a 100% de acetonitrilo en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético a un flujo de 1 mL/ min.

4.9.3 Purificación de sideróforos por SPE

Los resultados cualitativos analizados por la técnica CASAD de las fracciones recuperadas de la extracción de sideróforos a partir de los SLC mediante el método de separación en fase sólida (SPE) se muestran en la **Figura 11**.

La presencia del halo indicador de sideróforos en los pozos **a1** y **a3** indica la existencia de estos compuestos en las muestras correspondientes al SLC de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2. En los pozos de la columna **b**, se colocó la primera fracción recuperada tras pasar el SLC por el cartucho de fase reversa C18, registrándose la presencia de un halo amarillo muy pequeño (pozos **b1** y **b3**), lo cual indica que la mayor parte de los sideróforos contenidos en el SLC de *B. cenocepacia* MSR2 quedaron retenidos en la resina (**Figura XI**).

En el paso de elución (segunda fracción recuperada), se observó el halo indicador de sideróforos (pozos **c1** y **c3**) en la muestra de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2, siendo el tamaño de dicho halo similar al del sobrenadante de la misma cepa. Finalmente, tras un lavado con metanol absoluto (columna **d**) no se registró actividad de sideróforos en las fracciones recuperadas de la bacteria *B. cenocepacia* MSR2 (pozos **d1** y **d3**). La bacteria *Pseudomonas* sp. 69 utilizada como control negativo, no mostró actividad de sideróforos en el SLC (**pozo a2**), ni en las fracciones obtenidas (pozos **b2**, **c2** y **d2**).

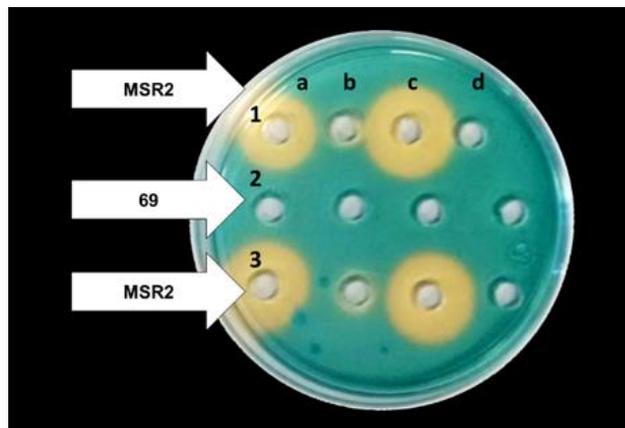


Figura 11. Técnica CASAD para la detección de sideróforos purificados por extracción en fase sólida (SPE). Las columnas a (muestra pre-columna), b (compuestos no retenidos por la columna), c y d (primera y segunda elución de compuestos retenidos por la columna con MeOH) corresponden a las fracciones obtenidas de cada una de las etapas de purificación de la SPE de las muestras analizadas. Las filas 1 y 3 corresponden a réplicas de la misma muestra. Se analizaron extractos de *B. cenocepacia* MSR2, y del control negativo, *Pseudomonas* 69.

A partir de este protocolo de purificación se obtuvieron los sideróforos utilizados en los ensayos de inhibición de *C. gloeosporioides* MYA 456 en frutos de aguacate.

4.10 Efecto de la aplicación de sideróforos en el desarrollo de antracnosis en frutos de aguacate

Los resultados de la efectividad de los sideróforos producidos por *B. cenocepacia* MSR2 para reducir la incidencia de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* MYA 456 en frutos de aguacate se muestran en la **Figura 12**. Diez días después de la aplicación de los tratamientos, no se observaron síntomas de antracnosis en las áreas infectadas con *C. gloeosporioides* MYA 456 y previamente tratadas con sideróforos en SLC y sideróforos purificados (SP) al igual que en el control positivo (Cap) (**Figura 12 d, f y h**). En contraste, en las zonas inoculadas con el hongo previamente tratadas con los blancos, así como los SLC sin sideróforos, se presentaron ablandamiento y necrosis del tejido (**Figura 12 a, b, c, e y g**), los cuales son síntomas característicos de la antracnosis.

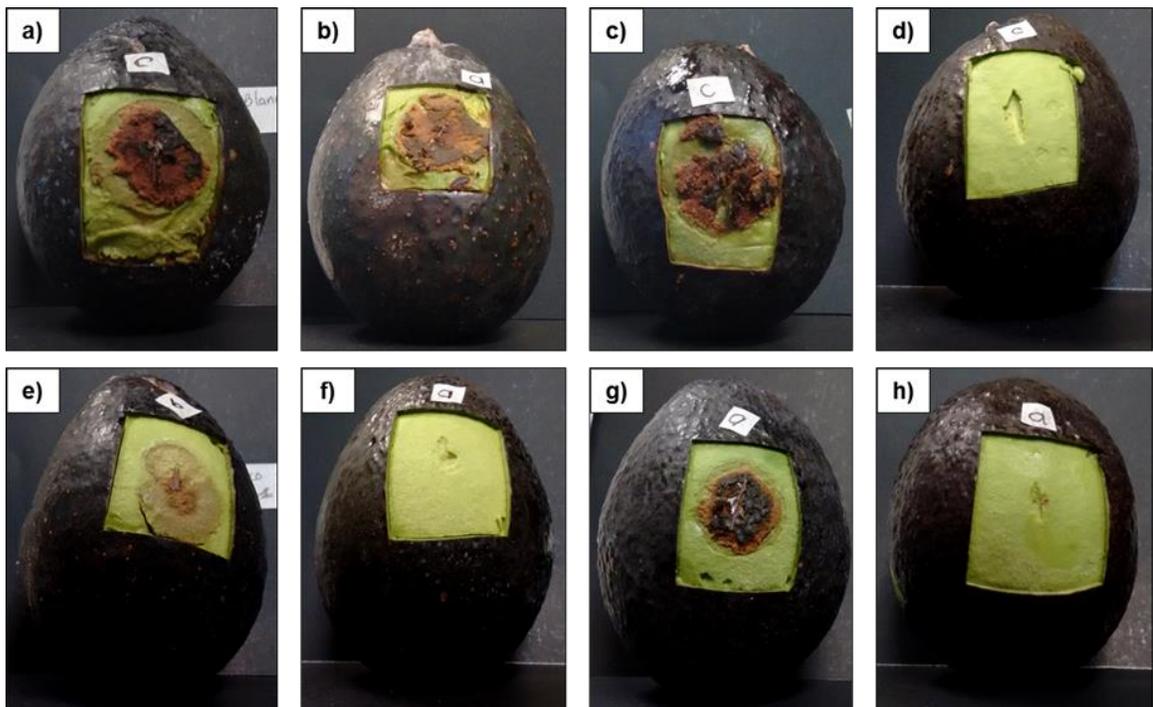


Figura 12. Aspecto de la incidencia de antracnosis en frutos de aguacate tratados con sideróforos provenientes de cepas bacterianas antagonistas a *C. gloeosporioides* MYA 456. Los tratamientos analizados fueron: a) blanco agua; b) blanco, medio M9; c) blanco MeOH; d) Captan (2 g/L); e) SLC sin sideróforos; f) SLC con sideróforos (34 μ M DFOM); g) sobrenadante purificado sin sideróforos, y h) sideróforos purificados (34 μ M DFOM).

Cuantitativamente, los resultados de la incidencia de antracnosis se presentan en la **Figura 13**. En los tratamientos que contenían sideróforos se registró una superficie necrosada promedio de $0.5 \pm 0.2 \text{ cm}^2$ para el SLC y de $0.4 \pm 0.2 \text{ cm}^2$ para SP. Estos datos no resultaron ser significativamente diferentes entre sí ni con respecto al control positivo, Captan 2 g/L (Cap) que presentó un área necrosada promedio de $0.2 \pm 0.1 \text{ cm}^2$. Por otra parte, en los tratamientos que no contenían sideróforos se registraron áreas promedio de antracnosis en los frutos de $7.0 \pm 0.6 \text{ cm}^2$ y $7.5 \pm 0.6 \text{ cm}^2$. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos sin sideróforos y el promedio de los blancos ($10.5 \pm 0.9 \text{ cm}^2$).

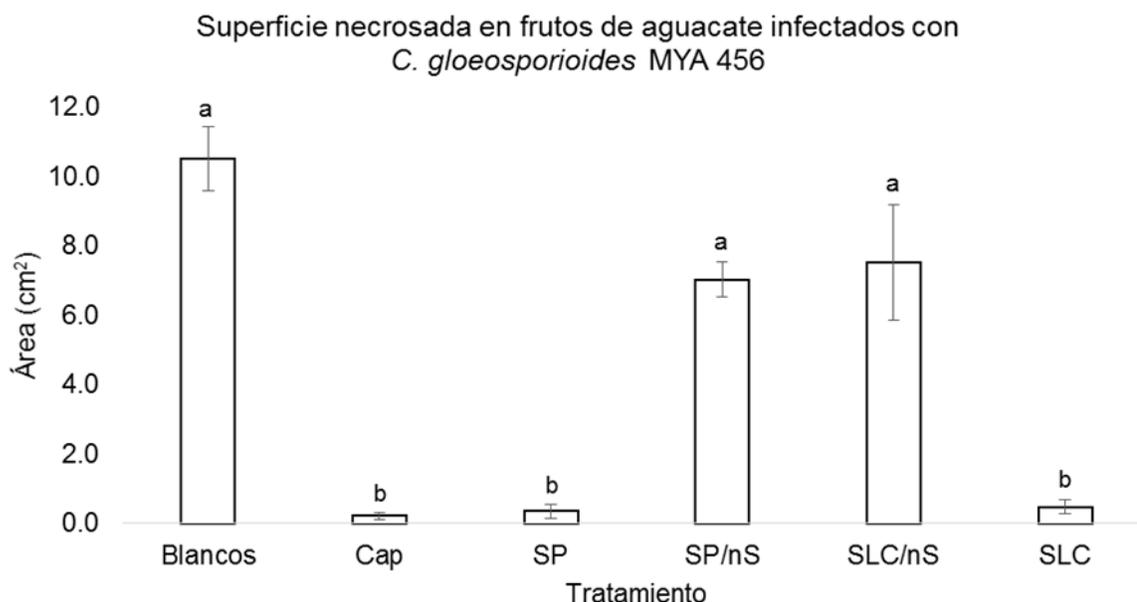


Figura 13. Incidencia de antracnosis en frutos de aguacate tratados con sideróforos provenientes de cepas bacterianas antagonistas a *C. gloeosporioides*. Los tratamientos empleados fueron los siguientes: sobrenadante libre de células con sideróforos_{34 μM DFOM} (SLC); sideróforos purificados_{34 μM DFOM} SPE (SP). Ambos fueron obtenidos de *B. cenocepacia* MSR2 cultivada en medio M9. Se analizó también el efecto del sobrenadante libre de células sin sideróforos (SLC/nS). sobrenadante purificado SPE (SP/nS). Ambos fueron obtenidos a partir de *B. cenocepacia* MSR2 en medio M9 + 100 μM FeCl₃. Como control positivo se incluyó el tratamiento con el fungicida Captan 2 g/L (Cap). Se muestra el promedio del área afectada en los tratamientos negativos con medio M9, agua y metanol 50%, respectivamente (Blancos). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas por la prueba de ANDEVA/Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Diversos microorganismos son conocidos por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, ya sea de manera directa a través de la movilización de nutrientes y producción de hormonas, o indirecta a través de la supresión de enfermedades y/o la inducción de resistencia sistémica. De los aislados bacterianos analizados en el presente trabajo, cuatro rizobacterias mostraron la capacidad de producir sideróforos al igual que una actividad antagónica *in vitro* contra *C. gloeosporioides* MYA 456. Dos de estos aislados fueron identificados como *Pseudomonas* sp. AE21i y *Pseudomonas* sp. AE25b, los cuales fueron aislados de la rizósfera de árboles de aguacate enfermos. Las dos cepas restantes se obtuvieron de la colección de aislados rizosférico de plantas de maíz, los cuales fueron identificados como *Serratia* sp. ER1 y *Burkholderia cenocepacia* MSR2. Dichos géneros han sido ampliamente reportados como rizobacterias antagonistas seleccionadas por la técnica de co-inoculación en placa (Narayanasamy & Agents, 2013), así como bacterias productoras de sideróforos (Alexander & Zuberer 1991; Liu *et al.*, 2010; Vidhale, 2013).

La presencia de zonas de inhibición definidas por las cepas *B. cenocepacia* MSR2, *Pseudomonas* sp. AE25b y *Serratia* sp. ER1 sugiere la producción y secreción de metabolitos capaces de actuar como sideróforos en las cepas estudiadas. Los ensayos de antagonismo *in vitro* de los aislados con capacidad de producción de sideróforos mostraron inhibición variable del crecimiento de *C. gloeosporioides* dependiendo de la cepa. No se observó una relación entre la cantidad de sideróforos e inhibición del patógeno, principalmente en *Pseudomonas* sp. AE21i. La cual presentó mayor velocidad y área de crecimiento al ser co-inoculada con el hongo *C. gloeosporioides*. El resultado sugiere la participación de otros posibles mecanismos de biocontrol, *e.g.*, competencia por espacio o nutrientes diferentes al Fe (como azúcares, aminoácidos o ácidos orgánicos). Este comportamiento fue descrito anteriormente por Compant *et al.* (2005), Dekkers *et al.* (1998) y Lugtenberg y Dekkers (1999) quienes reportaron que la producción de lipopolisacáridos y la eficiencia en la asimilación de aminoácidos y exudados radiculares se utiliza como estrategia de competencia en los nichos ecológicos colonizados por bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Sin embargo, estos mecanismos no pueden ser determinados mediante la técnica de co-

inoculación utilizada para la selección de microorganismos antagonistas (Pliego *et al.*, 2011). Aunado a esto, la exploración de los mismos no fue contemplada en este estudio para ninguna de las cepas antagonistas.

La supresión directa del desarrollo de patógenos asociada a la competencia por Fe mediada por sideróforos fue demostrada inicialmente por Kloepper *et al.* (1980) con la cepa productora de sideróforos, *Pseudomonas* sp. B10. Ésta suprimió la incidencia de la marchitez por *Fusarium* en un suelo deficiente de Fe, la cual se perdió al enriquecer el suelo con el mineral. Los datos obtenidos en este trabajo sobre la actividad antifúngica del SLC con sideróforos y sin sideróforos obtenidos a partir del cultivo de las cepas seleccionadas permiten afirmar que la inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* MYA 456 ($69.7 \pm 1.4\%$) por la cepa *B. cenocepacia* MSR2 puede asociarse a la presencia de sideróforos en el sobrenadante ya que la actividad antagonica contra el fitopatógeno se inhibió completamente al suprimir la síntesis de sideróforos. La inhibición de hongos fitopatógenos mediante el uso de SLC con sideróforos fue reportada por primera vez por O'Sullivan & O'Gara (1992) quienes demostraron que la actividad antagonica de sobrenadantes con alto contenido de sideróforos libres (pioverdinas) fue mayor contra los fitopatógenos *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *F. oxysporum* y *Colletotrichum capsicum*. En concordancia con este comportamiento, observaron una menor actividad antifúngica en sobrenadantes que contenían sideróforos acomplejados con Fe (pioverdina + Fe).

Asimismo, se observó que la actividad antifúngica del SLC sin sideróforos de *Serratia* sp. ER1 fue mayor a la del sobrenadante con sideróforos ($57.4 \pm 0.8\%$ y $43.5 \pm 5.1\%$ respectivamente), lo cual sugiere un mecanismo de biocontrol diferente a la presencia de sideróforos en el SLC. Se ha reportado que especies del género *Serratia* pueden inhibir *in vitro* el crecimiento micelial, la formación de apotecios y la germinación de ascosporas de varios hongos filamentosos y oomicetos fitopatógenos como *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia minor*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Botrytis cinerea*, entre otros. Se ha propuesto que este efecto ocurre como resultado de la producción y secreción de antibióticos (e. g., pirrolnitrina y macrólidos), prodigiosina y enzimas líticas (e. g., quitinasa y β -1,3-glucanasa) y proteasas (Narayanasamy & Agents 2013).

En la actualidad, se conoce que el género *Burkholderia* comprende alrededor de 30 especies que ocupan diversos nichos ecológicos. El complejo *Burkholderia cepacia* (conocido como Bcc por sus siglas en inglés) está integrado por nueve especies bacterianas estrechamente relacionadas y extremadamente versátiles. Éstas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser encontradas en suelo, agua (incluyendo agua de mar), la rizósfera de plantas, en humanos y en varias especies de animales (Coenye & Vandamme, 2003). Se ha reportado, también, la presencia de *Burkholderia* sp. en caña de azúcar, arroz, mango, parras de uvas, cebolla, maíz y café (Mendes *et al.*, 2007; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2012). No obstante, la relación entre las especies del Bcc con enfermedades pulmonares en pacientes inmunocomprometidos, su amplia distribución y su diversidad metabólica y genética han convertido a las bacterias de este complejo en objeto de estudio para diversas aplicaciones biotecnológicas.

Como un habitante común del suelo, las especies como *B. cepacia*, *B. multivorans* y *B. cenocepacia*, todas pertenecientes al Bcc, se encuentran especialmente presentes en la rizósfera de maíz (Cello *et al.*, 1997; Bevivino *et al.*, 1998; Arruda *et al.*, 2013), coincidiendo con el género y origen de la cepa MSR2 descrita en este estudio. Aunado a esto Bevivino *et al.* (1998) reportaron que 14 rizobacterias de maíz, todas las cuales fueron identificadas como *B. cepacia*, tuvieron un efecto fungicida *in vitro* contra *F. graminearum* spp. hongo patógeno del cultivo de maíz. Éstos autores concluyeron que dicha actividad fungicida se relacionó con la producción de sideróforos del tipo hidroxamato (la cual fue determinada por las técnicas colorimétricas de Csaky y Arnow) en todas las cepas estudiadas. Estos datos coinciden con lo obtenido en el presente estudio, en el cual se observó que *B. cenocepacia* MSR2 acumuló sideróforos del mismo tipo en condiciones limitantes de Fe. Se encontró, además, una similar y fuerte represión de la síntesis de sideróforos al adicionar 100 μM de FeCl_3 al medio de cultivo. Por otra parte, de los Santos *et al.* (2012) determinaron, mediante la técnica de co-inoculación en medio CAS-agar, que los sideróforos del tipo hidroxamato producidos por *B. cepacia* XXVI participan directamente en la inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* MYA 456. Estos investigadores encontraron que el crecimiento micelial del hongo finalizó justo en el área circundante al halo indicador de sideróforos.

Encontrando además una relación directa entre el crecimiento celular, la producción de sideróforos y la inhibición de desarrollo micelial del hongo.

Cabe destacar la comparación entre los resultados obtenidos por de los Santos *et al.* (2012) y los encontrados en el presente estudio donde es notable el papel de los sideróforos del tipo hidroxamato producidos *B. cepacia* XXVI y *B. cenocepacia* MSR2 en la inhibición de *C. gloeosporioides* MYA 456. Ambas especies bacterianas se encuentran agrupadas dentro del Bcc. Además, el potente efecto fungicida de las cepas es similar, independientemente de su sitio de aislamiento. Estos datos sugieren que la competencia por Fe afecta negativamente y de manera significativa al patógeno estudiado.

Se ha estudiado la producción de metabolitos con actividad antagónica contra fitopatógenos por miembros del Bcc incluyendo pirrolnitrina, fenazina, cepaciamida, quinolonas, lipopéptidos y sideróforos (Bach *et al.*, 2016). Cepas del Bcc producen hasta cuatro diferentes tipos de sideróforos, como, cepaciaquelina, ornibactina, cepabactina y pioquelina. Éstos incluyen a la mayoría de los grupos bidentados presentes en los sideróforos bacterianos del tipo de los catecolatos, hidroxamatos lineales y cíclicos, así como grupos combinados (Thomas, 2007). El sideróforo ornibactina (compuesto por cuatro especies moleculares C4-, C6- y C8-, fue purificado por primera vez a partir del sobrenadante de un cultivo de *B. vietnamiensis*. Posteriormente fue encontrado en diferentes aislados ambientales que incluían a *B. cepacia* (ATCC 17759 y ATCC 25416), *B. ambifaria* (PHP7), además de otros 60 aislados mayormente clínicos identificados como *B. cenocepacia* (Stephan *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995).

El perfil cromatográfico de los extractos ricos en hidroxamatos producidos por *B. cenocepacia* MSR2, fue similar a los reportados por Meyer *et al.* (1995) y Stephan *et al.* (1993). En este trabajo se reportaron tres metabolitos predominantes que podrían corresponder a ornibactina C4-, C6- y C8-. El patrón observado coincide con los encontrados por estos autores para las cepas cuyas especies están estrechamente relacionados con *B. cenocepacia* MSR2. Desde el punto de vista de instrumentación, la falta de coincidencia en los tiempos de retención obtenidos en este estudio podría deberse a las variaciones en la extracción, el solvente utilizado en el proceso de

concentración, así como a las condiciones de separación y detección utilizadas. Por este motivo resulta necesario analizar cada una de las fracciones purificadas por HPLC para identificar si la actividad fungicida contra *C. gloeosporioides* MYA 456 se debe a la presencia de este tipo de sideróforos presentes en los sobrenadantes utilizados en los ensayos de inhibición. Como una primera aproximación, se podría emplear un espectro en el rango de luz UV-Vis para buscar similitud en los patrones reportados por Stephan *et al.* (1993).

Díaz de Villegas (2007) señala la importancia de las condiciones de cultivo (*e. g.*, transferencia de oxígeno, fuentes de carbono y nitrógeno, relación carbono-nitrógeno, temperatura y pH) en la estimulación o represión de la síntesis de sideróforos bacterianos implicados en el control de fitopatógenos. En el presente trabajo, se analizó únicamente el efecto de cuatro diferentes fuentes de C (*i. e.*, glucosa, manitol, glicerol y sacarosa) en la estimulación de la síntesis de los sideróforos con actividad fungicida producidos por *B. cenocepacia* MSR2 en cultivo líquido. La acumulación de sideróforos a lo largo del tiempo en todas las fuentes de C fue consistente con la relación general entre crecimiento celular y producción de sideróforos descrita por Neilands (1984). Se determinó que, para las condiciones utilizadas en este estudio, *B. cenocepacia* MSR2 presenta la mayor acumulación de sideróforos ($208.4 \pm 6.7 \mu\text{M}$ DFOM) cuando utiliza manitol como única fuente de C. Asimismo, se observaron importantes diferencias entre las fuentes de C analizadas. Al respecto, Duffy y Défago (1999) concluyeron que la concentración y el tipo de fuente de C afecta directamente la producción de metabolitos por rizobacterias antagonistas, relacionando estas diferencias a los requerimientos metabólicos y bioquímicos de cada microorganismo, así como la planta con la que se encuentran asociados. Por otra parte, estudios realizados por Bartholdson *et al.* (2008) describieron la importancia del manitol en el crecimiento y la producción de exopolisacáridos en bacterias del Bcc, incluida la especie *B. cenocepacia*. Este hallazgo sugería que el aumento en la producción de biomasa y por ende de sideróforos reportadas en este estudio puede deberse a la capacidad de *B. cenocepacia* MSR2 de utilizar este polialcohol en varios de sus procesos metabólicos. Sin determinar la naturaleza del metabolito producido por *B. cepacia* Cs5, Kilani-Feki y Jaoua (2011) reportaron un aumento significativo en el

crecimiento de la cepa, además del incremento en la producción de metabolitos antifúngicos, cuando se utilizó manitol como única fuente de C, coincidiendo con los resultados encontrados en este estudio.

El uso de microorganismos antagonistas como estrategia de control para enfermedades postcosecha ha sido ampliamente estudiado, reportándose el control exitoso de infecciones latentes con la aplicación de bacterias en tratamientos postcosecha (Janisiewicz & Korsten 2002; Sharma, 2008; Droby *et al.*, 2009). Varias cepas del género *Bacillus*, en particular la especie *B. subtilis*, han sido aplicadas sobre la superficie de frutos de aguacate mostrando un importante control de antracnosis y pudrición del pedúnculo causadas por *Dothiorella* sp. y *Colletotrichum* sp., respectivamente (Korsten, 1995). Concerniente al género *Burkholderia* sp. relacionado filogenéticamente con *B. cenocepacia* MSR2, De Costa y Erabadupitiya (2005) reportaron una disminución en la incidencia de la antracnosis en plátano caudada por *C. musae* después de sumergir los frutos en solución acuosa que contenía 1×10^{10} UFC/ mL de la bacteria antagonista *B. cepacia*. En otro estudio realizado por De Costa *et al.* (2008), se demostró que la aplicación de concentraciones en un rango comprendido entre 1×10^4 a 1×10^6 UFC/ mL de la cepa *B. spinosa* redujo la incidencia de antracnosis postcosecha en mango (28%), aguacate (38%) y piña (17.5%).

En sentido estricto, el término biocontrol se define como el uso de un organismo vivo para controlar a otro. Sin embargo, en fitopatología las enfermedades son consideradas como un proceso en el que interaccionan directamente la planta, el patógeno y el antagonista. En este sentido, la definición de biocontrol podría involucrar el uso de un proceso o del producto de un proceso biológico (Droby *et al.*, 2009). En el presente trabajo se registró que el potencial de biocontrol *in vitro* de *B. cenocepacia* MSR2 se relacionó con la presencia de sideróforos en el SLC, producidos por la bacteria en condiciones limitantes de Fe. En ese sentido, se analizó el efecto de SLC ricos en sideróforos y sideróforos purificados mediante SPE (fase reversa C18) sobre la incidencia de la antracnosis en frutos de aguacate. Mediante esta estrategia experimental se alcanzaron niveles de inhibición de antracnosis alrededor del 95%, siendo éstos equivalentes a los obtenidos con la concentración recomendada de Captan (2 g/L), un fungicida sintético

Aparte del estudio realizado por Tortora *et al.* (2011) en el cual se demostró que la inoculación de cepas de *Azospirillum brasilense* productoras de sideróforos disminuyó la incidencia de antracnosis (*C. acutatum*) en plantas de fresa, no se encontraron estudios adicionales mostrando que la aplicación de sideróforos (de extractos semipurificados o sobrenadantes crudos) esté implicada en la reducción de enfermedades fúngicas en postcosecha. Sin embargo, sí se ha demostrado que la utilización de metabolitos producidos por bacterias antagonistas tiene efecto en el desarrollo de enfermedades fúngicas postcosecha. Al respecto, Touré *et al.* (2004) reportaron que *B. subtilis* GA1 produce lipopéptidos que al ser aplicados sobre manzanas, como SLC crudos o purificados disminuyeron significativamente el moho gris ocasionado por *B. cinerea*. Estos resultados mostraron un efecto inhibitorio similar al encontrado en el presente estudio con los sideróforos producidos por *B. cenocepacia* MSR2. Todo lo anterior sugiere fuertemente que podría ser factible utilizar los productos de procesos biológicos como una estrategia de biocontrol contra hongos fitopatógenos presentes en la etapa postcosecha en diversos frutos de interés comercial. Actualmente existe una gran variedad de estudios encaminados a desarrollar productos alternativos que sean seguros para los consumidores y sin repercusiones ambientales. El mercado de los biopesticidas ha tenido un notable incremento en las últimas décadas, indicando que los consumidores y productores están dispuestos a probar esta clase de soluciones innovadoras. Un ejemplo de aplicación de desarrollo biotecnológico es el fungicida *Fungifree AB*[®], producto mexicano utilizado actualmente contra *C. gloeosporioides* en el cultivo de mango. En su publicación al respecto Galindo *et al.*, 2013 describen cómo el resultado de una investigación puede llegar hasta el desarrollo comercial y la aplicación. Sin embargo, los estudios enfocados en la utilización sideróforos presentes en SLC para este fin son escasos. De modo que aún resulta necesario evaluar cada uno de los factores implicados en la calidad de los frutos, la inocuidad alimentaria y el impacto ecológico y económico asociado a la aplicación de nuevos productos para el control de enfermedades en frutos destinados al consumo humano.

CONCLUSIONES

Burkholderia sp. MSR2 es una cepa productora de sideróforos con una significativa actividad antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides* MYA 456 tanto en análisis *in-vitro* (70% de inhibición del crecimiento), como *in-vivo* (inhibición del 95%).

Los sideróforos del tipo hidroxamato (posiblemente ornibactina) producidos por *B. cenocepacia* MSR2 están directamente relacionados con la inhibición del desarrollo de *C. gloeosporioides* MYA 456, así como con la supresión de antracnosis en frutos de aguacate.

La producción de sideróforos está directamente relacionada con el crecimiento celular. Entre las fuentes de carbono analizadas, el manitol fue la fuente de carbono donde se registró la mayor producción de biomasa, así como la máxima concentración de sideróforos (208 μ M UDFOM) en el sobrenadante de la cepa antagonista *B. cenocepacia* MSR2.

Los sideróforos producidos por *B. cenocepacia* MSR2 presentes en el SLC o purificados mediante separación en fase sólida redujo en 95% la incidencia de antracnosis en frutos de aguacate infectados con *C. gloeosporioides* MYA 456, similar a la protección brindada por el fungicida sintético Captan. Lo anterior sugiere que la utilización directa del SLC sobre frutos infectados podría considerarse como una estrategia de control de antracnosis en aguacate.

PERSPECTIVAS

Analizar las fracciones obtenidas para determinar tanto la actividad de sideróforos como la actividad antagónica contra *C. gloeosporioides*, así como identificar los compuestos presentes en los sobrenadantes y extractos obtenidos.

Evaluar el efecto del sobrenadante libre de células (SLC) rico en sideróforos, producido por *B. cenocepacia* MSR2 contra otros hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en diferentes cultivos de interés comercial, en etapas tanto de pre y postcosecha.

Evaluar las características físico-químicas, así como los posibles cambios fisiológicos en el proceso de maduración de frutos de aguacate, al ser tratados con SLC ricos en sideróforos.

Optimizar la síntesis de sideróforos por *B. cenocepacia* MSR2 mediante el estudio de todos los parámetros físicoquímicos involucrados en el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 36–41.
- Adler, C. *et al.*, 2012. Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. *PLoS ONE*, 7, 1–7.
- Ahemad M., S.K.M., 2011. Funtional aspects of PGPRB recent advavances. *Insight Microbiology*, 3, 39–54.
- Ahmed, E. & Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7, 196–208.
- Akhtar, M.S. & Siddiqui, Z.A., 2010. Role of plant growth promoting rhizobacteria in biocontrol of plant diseases and sustainable agriculture. In D. K. Maheshwari, ed. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria Microbiology Monographs*. New York, USA, 157–195.
- Alcaraz, M.L., Thorp, T.G. & Hormaza, J.I., 2013. Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 164, 434–439.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D. a., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39–45.
- Ali, S.S. & Vidhale, N.N., 2013. Bacterial siderophore and their application: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2, 303–312.
- Altschul, S.F. *et al.*, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodríguez-Quiñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, 215–237.
- Arnou, L.E., 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry*, 188, 531–537.

- Arruda, L. *et al.*, 2013. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, 63, 15–22.
- Bach, E. *et al.*, 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, 141–149.
- Bagg, a & Neilands, J.B., 1987. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiological Reviews*, 51, 509–18.
- Bartholdson, S.J. *et al.*, 2008. Plant host and sugar alcohol induced exopolysaccharide biosynthesis in the *Burkholderia cepacia* complex. *Microbiology*, 154, 2513–2521.
- Bautista-Banos, S., 2014. *Postharvest Decay: Control Strategies* S. Bautista-Banos, ed., Mexico, D.F.
- Beno-Moualem, D. & Prusky, D., 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 90, 553–559.
- Bevivino, A. *et al.*, 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: Effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 225–237.
- Bill, M. *et al.*, 2014. Avocado Fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Reviews International*, 30, 169–202.
- Cazorla, F.M. *et al.*, 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1950–1959.
- Cello, F. Di *et al.*, 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4485–4493.
- Coenye, T. & Vandamme, P., 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5, 719–729.
- Compant, S. *et al.*, 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant

- diseases: principles , mechanisms of action and future prospects: Minireview. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4951–4959.
- De Costa, D.M. *et al.*, 2008. Effectiveness and molecular characterization of *Burkholderia spinosa*, a prospective biocontrol agent for controlling postharvest diseases of banana. *Biological Control*, 47, 257–267.
- De Costa, D.M. & Erabadupitiya, H.R.U.T., 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 31–39.
- Crowley, D.E., 2001. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In L. L. Barton & J. Abadía, eds. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Dordrecht, The Netherlands, 169–198.
- Csaky, T., 1948. On the estimation of bound hydroxylamine in Biological Materials. *Acta Chemica Scandinavica*, 2, 450–454.
- Dean, R. *et al.*, 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414–430.
- Dekkers, L.C. *et al.*, 1998. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 11,763–71.
- Demoz, B.T. & 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.
- Díaz de Villegas, M.E., 2007. Biotechnological production of siderophores. In A. Varma & S. Chincholkar, eds. *Microbial Siderophores*. Verlag, Berlin Heidelberg, 219–227.
- Dreher, M.L. & Davenport, A.J., 2013. Hass avocado composition and potential health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 738–750.
- Droby, S. *et al.*, 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a

- new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137–145.
- Duffy, B.K. & Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2429–2438.
- Duijff, B.J., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B., 1994. Suppression of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 279–288.
- Eckert, J.W. & Ogawa, J.M., 1985. the chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual. Review of. Phytopathology*, 23, 421–435.
- Fernández-Scavino, A. & Pedraza, R.O., 2013. The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In D. K. Maheshwari, M. Saraf, & A. Aeron, eds. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. Heidelberg, Alemania: Springer, 265–285.
- Galindo, E. *et al.*, 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-23.
- Glick, B.R. & Bashan, Y., 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15, 353–378.
- González-Sánchez, M.Á. *et al.*, 2013. Evaluation of the effectiveness of biocontrol bacteria against avocado white root rot occurring under commercial greenhouse plant production conditions. *Biological Control*, 67, 94–100.
- Green, M.R. & Sambrook, J., 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Hantke, K., 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 172–177.
- Hartill, W.F.T., 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 19, 297–304.
- Horst, R.K., 2008. *Westcott 's Plant Disease Handbook* 7 th. R. K. Horst, ed., Verlag,

Berlin, Heidelberg, New York.

- Ito, Y. & Butler, A., 2005. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Limnology and Oceanography*, 50, 1918–1923.
- Janisiewicz, W.J. & Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 411–441.
- Jeffries, P. *et al.*, 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, 39, 343–366.
- Kapoor, R., Sharma, D. & Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae*, 116, 227–239.
- Kilani-Feki, O. & Jaoua, S., 2011. Biological control of using the antagonistic and endophytic Cs5 for vine plantlet protection. *Canadian Journal of Microbiology*, 57, 896–901.
- Kim Y.K., *et al.*, 1998. Induction of Ca²⁺-Calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of Bacteriology*, 180, 5144–5150.
- Kloepper, J.W. *et al.*, 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4, 317–320.
- Kobashi, K. *et al.*, 1985. A colorimetric method for the determination of hydroxamic acid by iodine oxidation. *Analytical biochemistry*, 146, 7–12.
- Korsten, L., 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease*, 79, 1149.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow, eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, 115–148.
- Latunde-Dada, a. O., 2001. *Colletotrichum*: Tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, 2, 187–198.

- Liu, X. *et al.*, 2010. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1465–1471.
- de los Santos-Villalobos, S. *et al.*, 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2615–2623.
- Lugtenberg B. & Dekkers I., 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent. *Environmental Microbiology*, 1, 9–13.
- Mendes, R. *et al.*, 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7259–7267.
- Menge, J. & Ploetz, R., 2003. Diseases of avocado. *Diseases of tropical fruit crops*, Ploetz, R.C., CABI Publishig, Wallingford, UK, 35–71.
- Menzel, C.M. & Le Lagadec, M.D., 2014. Increasing the productivity of avocado orchards using high-density plantings: A review. *Scientia Horticulturae*, 177, 21–36.
- Meyer, J.-M. *et al.*, 1995. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 8, 309–317.
- Miethke, M. & Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 413–451.
- Moshe, A., *et al.*, 1994. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 6579-6583.
- Narayanasamy, P. & Agents, B.C., 2013. *Biological Management of Diseases of Crops*.
- Neilands, J.B., 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual review of nutrition*, 1, 27–46.
- O'Connell, R.J. *et al.*, 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum*

- fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44, 1060–5.
- O’Sullivan, D.J. & O’Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56, 662–676.
- Pal, K.K. *et al.*, 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 156, 209–223.
- Patel, A.K. *et al.*, 2009. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology*, 100, 368–373.
- Payne, S., 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores. *Siderophore methodology*, 235, 329–344.
- Peres, N.A.R. *et al.*, 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 150, 128–134.
- Pérez-Jiménez, R.M., 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2, 1–24.
- Perfect, S.E. *et al.*, 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 27, 186–98.
- Photita, W. *et al.*, 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, 18, 117–133.
- Phoulivong, S., 2011. *Colletotrichum*, naming , control , resistance , biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1, 53–73.
- Pliego, C. *et al.*, 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil*, 340, 505–520.
- Prusky, D. *et al.*, 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*,

14, 1105–1113.

- Prusky, D. & Lichter, A., 2008. Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 281–289.
- Rahman, M. a. *et al.*, 2007. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6, 12–20.
- Raymond, K.N. *et al.*, 1984. Complexation of iron by siderophores a review of their solution and structural chemistry and biological function. *Structural Chemistry*, 123, 49–102.
- Rettinassababady, C. & Jeyalakshmi, C., 2014. Bio-Fungicides: the best alternative for sustainable food security and ecosystem. In R. N. Kharwar *et al.*, eds. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. New Delhi, Dorderech, Heidelberg, London, New York: Springer, 401-411.
- Rindermann, S. & Ma, D., 2014. Desempeño competitivo de la fruticultura competitiva performance of the mexican fruit production , 1980-2011 Resumen. , 5, 1287–1300.
- Rodríguez-López, E.S. *et al.*, 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz . y Sacc . en Aguacatero (*Persea americana* Mill): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27, 53–63.
- Saha, R. *et al.*, 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 303–317.
- Saraf, M., Pandya, U. & Thakkar, A., 2014. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169, 18–29.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160, 47–56.
- Schalk, I. J., Hannauer, M. & Braud A., 2011. New roles for bacterial siderophores in

- metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology* 13, 2844-2854.
- Sharma, M. & Kulshrestha, S., 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. 12, 1233–1246.
- Sharma, M., Luo, Y. & Buchanan, R., 2011. Microbial safety of tropical and subtropical fruits, *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Yahia, E. M. Philadelphia, EUA. Woodhead Publishing Limited, 288-314.
- Sharma, R.R., Singh, D. & Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 205–221.
- Shin, S.H. *et al.*, 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 89–95.
- SIAP-SAGARPA, 2015. Anuario de producción agrícola 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>
- Siddiqui, Z. A., 2006. *PGPR: Biocontrol and biofertilization*.
- Silva-Rojas, H. V. & Ávila-Quezada, G.D., 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60, 899–908.
- Stephan, H. *et al.*, 1993. Ornibactins-a new family of siderophores from *Pseudomonas*. *Biometals*, 6, 93–100.
- Tamura, K. *et al.*, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24, 1596–1599.
- Thomas, M.S., 2007. Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia* complex. *BioMetals*, 20, 431–452.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. & Pedraza, R.O., 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193, 275–286.
- Touré, Y. *et al.*, 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of*

- Applied Microbiology*, 96, 1151–1160.
- Voisard, C. *et al.*, 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8, 351–358.
- Willingham, S.L. *et al.*, 2006. Effects of rootstock and nitrogen fertiliser on postharvest anthracnose development in Hass avocado. *Australasian Plant Pathology*, 35, 619–629.
- Winkelmann, G., 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions*, 30, 691–6.
- Yakoby, N. *et al.*, 2001. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits. *Phytopathology*, 91, 143–148.
- Zivkovic, S. *et al.*, 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62, 611–623.

APÉNDICES

Apéndice I

Preparación de medio mínimo M9

Reactivo	Cantidad (para 1.0 mL)
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g

Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y KOH y esterilizar la solución salina en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

MgSO ₄ (1.0 M)*	2.0 mL
Glucosa (20%)*	10.0 mL
CaCl ₂ (1.0 M)*	0.1 mL

* Esterilizar por separado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y agregar a la solución salina la cantidad determinada en esterilidad.

Composición de medio MSM modificado.

Reactivo	Cantidad (para 1 L)
MgSO ₄	0.1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
Glucosa	2.0
KH ₂ PO ₄	9.0

* pH 6. Ajustar con MES hidratado y KOH

Composición de la solución Winston.

Reactivo	Cantidad (para 100 mL)
SDS	1 gr
Tritón X-100	25 mL
NaCl	584.4 mg
Tris HCl	157.6 mg
EDTA	87.22 mg