



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

PROYECTO DE TESIS

**“Estudio del efecto antagónico de idiolitos bacterianos contra
Rhizopus stolonifer en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)”**

PRESENTA:

Q.F.B. DULCE AIDEÉ GARCÍA NIETO

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA

DIRECTOR DE TESIS:

D. C. VIANEY MARÍN CEVADA

H. PUEBLA DE Z. A NOVIEMBRE, 2020

Puebla, Pue. a 26 de Noviembre 2020.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Dulce Aideé García Nieto**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio del efecto antagónico de idiolitos bacterianos contra *Rhizopus stolonifer* en tomate (*Solanum lycopersicum L.*)”

A nuestro juicio, la alumna **Dulce Aideé García Nieto**, puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”



D.C. Luis Ramiro Caso Vargas



D.C. Antonino Báez Rogelio



D.C. Jesús Muñoz Rojas



D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado a Dios y a las personas que forman parte de mi vida:

Mis padres; por haberme brindado su apoyo incondicional, por ser ejemplo de fortaleza, perseverancia y valores invaluable en la vida, porque muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluye este.

Mi familia; por sus enseñanzas, consejos y por ser un punto de apoyo en la vida.

Mi mejor amiga; por estar siempre ahí, dispuesta a brindarme su apoyo incondicional, por sus consejos y su amistad, impulsándome siempre a conseguir mis metas

Las personas que conocí en el instituto, en especial a Mari Jo por la amistad y el apoyo en el transcurso de este proyecto

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla mi *Alma mater*, por ofrecerme una invaluable cantidad de enseñanzas, útiles en mi desarrollo personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder realizar los estudios de maestría.

A la Doctora Vianey Marín Cevada por su confianza al dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, sus conocimientos, su apoyo y su increíble calidad humana.

Al comité tutorial por estar presente durante el desarrollo del proyecto, por su apoyo, sus comentarios y sus correcciones.

A la Doctora Norma Elena Rojas Ruiz por su accesibilidad y apoyo al facilitar las instalaciones del EMA6, así como el equipo requerido para la complementación del proyecto.

Al cuerpo académico del Instituto de Ciencias Microbiológicas por brindar sus conocimientos en pro del desarrollo de los alumnos.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021

El presente trabajo fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, del Instituto de Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICM-ICUAP)

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una especie de gran importancia agrícola a nivel mundial. En los pasos posteriores a la cosecha (selección, embarque, transporte y venta) la calidad del fruto es mermada por diversos factores. Entre ellos, las características físicas del fruto que lo hacen susceptible a sufrir magulladuras dadas por el maltrato del mismo durante el empaque y envío a su destino, pero principalmente el daño por fitopatógenos como nematodos, insectos, bacterias y hongos; siendo estos últimos los principales causantes de importantes pérdidas. Durante los últimos años se han mitigado estas pérdidas con ayuda de químicos. Sin embargo, el abuso de los mismos deja residuos con efectos indeseados, como toxicidad y daños al medio ambiente. El presente trabajo de tesis se enfoca en la evaluación del potencial antagónico de una cepa del grupo *Burkholderia sensu lato* para poder evitar o disminuir los daños causados por uno de los hongos con mayor incidencia poscosecha: *Rhizopus stolonifer*. Éste es un hongo capaz de crecer a distintas temperaturas y niveles de pH, se caracteriza por causar pérdidas en diversos cultivos de importancia agrícola como papa, zanahoria, calabaza y tomate. La alternativa propuesta se basa en la producción de metabolitos secundarios por una bacteria perteneciente al grupo de *Burkholderia sensu lato* ya se ha evidenciado que posee potencial en el control de diferentes agentes fitopatógenos. Esto abre la posibilidad de explorar agentes de control efectivos que pertenecen a este grupo de bacterias. En este proyecto se obtuvieron resultados prometedores teniendo una buena actividad antagónica manteniendo esta actividad aún sin la presencia de la bacteria. Con porcentajes de inhibición de hasta un 95 % bajo diferentes técnicas, además de daños estructurales causados por las cepas utilizadas contra el hongo *R. stolonifer*. Sin embargo, será necesario evaluar esta acción en frutos

de tomate, para obtener una alternativa que logre aumentar la vida de anaquel y la calidad poscosecha.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is a species of great agricultural importance. Its fruit is mainly consumed fresh worldwide requiring optimum quality during harvest and postharvest. In the postharvest steps (selection, shipment, transport, and sale) the quality of the fruit decreases since various factors. Mostly, phytopathogens such as nematodes, insects, bacteria and fungi, the latter being the leading cause of significant losses, and the physical characteristics of the fruit that make it susceptible to bruises caused by abuse of the same during packing and sent to its destination. The major attempts that have been made to stop these losses involve the use of chemicals. However, their abuse cause unwanted consequences, such as toxicity and damage to the environment. This thesis focuses on evaluating the antagonistic potential of *Burkholderia sensu lato* group strains for reducing the damage caused by *Rhizopus stolonifera*, one of fungi with a preeminent incidence worldwide. *R. stolonifer* is grows in a great range of temperatures and pH. It is the cause of great losses in various crops of agricultural importance such as potatoes, carrots, squash, and tomatoes. The proposed alternative is based on secondary metabolites produced by *Burkholderia sensu lato*. Those bacteria have potential for the control of different phytopathogens and opens up the possibility to explore effective control agents belong to this group of bacteria. We obtained promising results that show an antagonistic role against *R. stolonifer*.

ÍNDICE

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	2
2.1.- Generalidades del tomate.....	2
2.2.- Importancia económica.....	3
2.3.- Hongos fitopatógenos: importancia poscosecha	7
2.3.1.- <i>Rhizopus stolonifer</i>	8
2.4.- Estrategias alternativas: biocontrol.....	11
2.5.- <i>Burkholderia sensu lato</i>	14
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4.- JUSTIFICACIÓN	17
5.- OBJETIVOS	18
5.1.- Objetivo general.....	18
5.2.- Objetivos particulares	18
6.- HIPÓTESIS	19
7.- DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN	19
7.1.- Material biológico.....	19
7.1.1.- Hongo fitopatógeno	19
7.1.2.- Cepario <i>Burkholderia</i> spp.....	19
7.2 Reactivación de cepas	19
7.3 Aislamiento del hongo fitopatógeno.....	20
7.4 Purificación del hongo fitopatógeno	20
7.5 Mantenimiento del hongo fitopatógeno	20

7.6 Prueba de patogenicidad	21
7.7 Obtención de metabolitos.....	21
7.8 Pruebas de evaluación <i>in vitro</i>	21
7.8.1 Ensayo dual.....	21
7.8.2 Ensayo Dual desfasado	22
7.8.3 Ensayo de inhibición simultanea	23
7.8.4 Doble capa	23
7.8.5 Difusión en pozos	24
7.8.6 Compuestos volátiles	24
8. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico	25
8.1 Inhibición del crecimiento micelial	25
8.2 Inhibición de la esporulación	25
8.3 Identificación de esporangios alterados	26
9.- Análisis estadístico	26
10. - Diagrama experimental	27
11. Resultados y discusión	27
11.1 Aislamiento de hongo fitopatógeno	27
11.2 Mantenimiento de hongo fitopatógeno	29
11.3 Prueba de patogenicidad	30
11.4 Pruebas de confrontación <i>in vitro</i>	30
11.4.1 Ensayo dual.....	30
11.4.2 Ensayo dual desfasado	33
11.4.3 Inhibición simultanea.....	35
11.4.4 Doble capa	37
11.4.5 Compuestos volátiles	39
11.4.6 Ensayo de pozos.....	41

11.5 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico.....	44
11.5.1 Inhibición del crecimiento micelial	44
11.5.2 Inhibición de la esporulación	46
11.5.3 Identificación de esporangios alterados	48
12.-CONCLUSIONES	51
13.- PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53
15.- ANEXOS	60
ANEXO I	60
Medios de cultivo utilizados:	60
ANEXO II	62
Características de cepas con mayor potencial antagónico	62

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Principales estados productores de tomate a nivel nacional Fuente:SIAP-SADER.....	5
Fig. 2 Variedades de tomate consumidas y comercializadas en México Fuente: Infografía tomate mexicano.	7
Fig. 3 Modo de infección de <i>Rhizopus stolonifer</i> fuente: Instituto Nacional de Tecnología Agrícola.....	10
Fig. 4 Diagrama experimental.....	27
Fig. 5 Crecimiento en placa de agar PDA, <i>Rhizopus stolonifer</i> 48 h y 72 h. ..	28
Fig. 6 Características microscópicas de <i>Rhizopus stolonifer</i>	29
Fig. 7 Infección en fruto de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) causada por <i>Rhizopus stolonifer</i>	30
Fig. 8 Ensayo dual en el cual se enfrentó a <i>Rhizopus stolonifer</i> contra cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	32
Fig. 9 Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i> ..	32
Fig. 10 Ensayo dual desfasado, <i>Rhizopus stolonifer</i> enfrentado con cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	34
Fig. 11 Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i> ..	34
Fig. 12 Ensayo simultáneo, <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	36
Fig. 13 Gráfica de halos de inhibición (cm), presentados por las cepas, en el crecimiento del hongo fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i>	36

Fig. 14 Gráfica del halo de inhibición de <i>Rhizopus stolonifer</i> presentado bajo la metodología de doble capa.	38
Fig. 15 Ensayo doble capa, <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	38
Fig. 16 Gráfica del porcentaje de inhibición de <i>Rhizopus stolonifer</i> presentado bajo la metodología de compuestos volátiles.	39
Fig. 17 Ensayo de compuestos volátiles, <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	41
Fig. 18 Ensayo de pozos, <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de metabolitos producidos por cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	42
Fig. 19 Gráfica del halo de inhibición de <i>Rhizopus stolonifer</i> presentado bajo la metodología de pozos.	42
Fig. 20 Ensayo de pozos, microscopía de <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de metabolitos producidos por cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	44
Fig. 21 Inhibición de crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	45
Fig. 22 Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno <i>Rhizopus stolonifer</i> . ..	46
Fig. 23 Gráfica de inhibición de esporulación, presentados por las cepas, a las 72h con respecto al control.	48
Fig. 24 Daños a estructuras de <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	49
Fig. 25 Daños en estructuras de <i>Rhizopus stolonifer</i> en presencia de cepas bacterianas del grupo de <i>Burkholderia sensu lato</i>	50
Fig. 26 Tamaño de esporangios de <i>Rhizopus stolonifer</i> , imágenes tomadas con ayuda de una cámara Moticam.	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Planeación agrícola 2017-2030	4
Tabla 2 Distintos controles utilizados en el tratamiento de <i>Rhizopus stolonifer</i> en diferentes frutos.....	14
Tabla 3 Inhibición de esporulación del hongo <i>Rhizopus stolonifer</i> por acción de cepas bacterianas de <i>Burkholderia sensu lato</i>	48
Tabla 4 Características de cepas Fuente: Cervantes-Álvarez 2016	62

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades poscosecha de frutas y hortalizas causan grandes pérdidas en la producción de alimentos y comercio de los mismos. Es por esto que es de gran importancia mantener los niveles de calidad antes y después de la cosecha, así como brindar protección contra los diversos agentes fitopatógenos a los que son susceptibles dichos productos. El tomate es uno de los productos agrícolas de mayor interés a nivel mundial, por lo que es de suma importancia valorar y controlar las enfermedades y agentes fitopatógenos, para asegurar que el fruto llegue al consumidor, evitando en lo mayor posible los daños y por ende las perdidas tan grandes que se reportan (Rios & Chavez, 2014).

La calidad poscosecha y la vida de anaquel de los frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) son controlados por el estado de madurez en la cosecha (SAGARPA, 2005). Los atributos de calidad de fruto como color, índices de acidez, pH, firmeza son afectados por variaciones genotípicas, pero condiciones de crecimiento, irradiación, estación de cultivo, nutrición, riego, temperatura, enfermedades y condiciones poscosecha son críticos para la calidad. Además, esta calidad dependerá en gran medida de la variedad, de las condiciones climatológicas, del manejo de cultivo, de la madurez y método de cosecha, y del manejo poscosecha. Un tomate de buena calidad debe tener aspecto fresco, con características propias de la variedad, y madurez adecuada según el tipo o variedad. Debe presentar uniformidad de color. Debe ser firme al tacto, bien desarrollado y formado; estar limpio y libre de pudriciones; libre o con manifestación leve de defectos de origen climático (granizo, quemaduras de sol, daño por frío), mecánico, entomológico, genético y fisiológico. No deben presentar olor y/o sabor extraño (SAGARPA, 2005). El tomate es un producto

altamente susceptible a enfermedades ocasionadas principalmente por bacterias y hongos. *Rhizopus stolonifer* es considerado uno de los principales fitopatógenos que provocan enfermedades poscosecha, es el agente causal de la pudrición blanda de frutas y hortalizas. Aproximadamente el 23-25% y el 31-38% de las frutas cosechadas se pierden debido al deterioro posterior a la cosecha. El uso de fungicidas sintéticos es el método más utilizado para el control de hongos poscosecha (Adaskaveg, J.E., Förster, H., and Sommer, 2002). Sin embargo, los fungicidas generan residuos tóxicos en alimentos y medio ambiente poniendo en riesgo la salud del hombre. Por ello, se necesitan enfoques alternativos, ambientales y económicamente viables (Nunes, Usall, Teixidó, & Viñas, 2001).

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, es una planta herbácea anual o perenne, tiene tallo erguido y cilíndrico en planta joven, a medida que esta crece, el tallo cae, presenta vellosidades en la mayor parte de sus órganos, puede llegar a medir hasta 2.50 m. Ramifica de forma abundante y el fruto es una baya de color rojo, cuyo tamaño es variable, desde 3 cm de diámetro hasta 16 cm, su forma puede ser redondeada, achatada o en forma de pera y su superficie lisa o asurcada (Castillo & Moreno-Pérez, 2009)

Es originario de América del sur, se presenta en climas cálidos, semisecos y templados, se le cultiva por su fruto y en ocasiones habita en terrenos de cultivo abandonados, asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosques de encino y de pino (SAGARPA, 2017b).

La planta de tomate se domesticó en México, sin embargo, se produjo una mayor domesticación a un nivel mucho más intenso en toda Europa y más tarde en América del Norte (SAGARPA, 2017b). Hasta la fecha, el cultivo de esta planta se considera el más extendido en el mundo con un valor de millones de dólares (FIRA, 2017). El consumo de este vegetal aumenta junto con las áreas de producción, gestión y comercialización. En general, la fruta se consume en forma fresca, lo que exige una mayor calidad de la fruta durante la manipulación, distribución y venta. Esta fruta contiene vitaminas A y C y una cantidad significativa de licopeno, betacaroteno, magnesio, niacina, hierro, fósforo, potasio, riboflavina, sodio y tiamina (Martínez, Vicente, César, & Saenz, 2012).

2.2.- Importancia económica

El consumo per cápita promedio mundial de tomate presenta una tendencia al alza. De acuerdo con datos de la FAO, entre 2007 y 2017, el consumo aparente conjunto de los diez principales países consumidores de tomate creció a una tasa promedio anual de 3.2 por ciento, al ubicarse en 135.7 millones de toneladas (FAO, 2015). La demanda de esta hortaliza creció a un ritmo mayor en India y China, con tasas promedio anuales de 7.6 y 5.3 por ciento, respectivamente. En Turquía, el crecimiento del consumo ha sido más moderado, con una tasa promedio anual de 2.5 % (SAGARPA, 2018). De Igual manera, en ese mismo periodo de tiempo las exportaciones mundiales crecieron a una tasa promedio anual de 2.2 por ciento. En este rubro destacan México y Países Bajos, que participaron en 2017 con 23.0 y 14.5 por ciento del volumen mundial exportado, respectivamente. Las exportaciones de estos países crecieron a tasas promedio anuales de 5.2 y 2.7 por ciento durante la citada

década. Por su parte México fue el principal exportador de tomate en términos de volumen, exportando principalmente a países como E.U y Canadá (FIRA, 2017). Por otro lado, de acuerdo con la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, elaborada por la SAGARPA, se estima que para el año 2030 la producción de tomate rojo ascenderá a 7.56 millones de toneladas y las exportaciones se ubicarán en 5.50 millones de toneladas, con un valor a precios de 6,641 millones de dólares (Tabla 1) (SAGARPA, 2018).

Año/período	Estimaciones				Crecimiento promedio anual	
	2016	2018	2024	2030	2003-2016	2016-2030
Producción potencial (mt)	3.35	3.95	5.76	7.56	3.39%	5.58%
Exportaciones (mt)	1.61	2.17	3.84	5.50	4.53%	8.55%
Valor de exportaciones (md)	1,939	2,613	4,633	6,641		

Tabla 1 Planeación agrícola 2017-2030; producción potencial en millones de toneladas (mt), valor en millones de dólares (md). (Fuente: SAGARPA 2017).

México ocupa el noveno lugar en la producción mundial, con una participación de 2.0 por ciento. La producción de tomate está altamente concentrada, en cinco entidades quienes produjeron en conjunto el 56.3 % del total nacional en el año 2017; según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) participaron: Sinaloa (27.0 %), San Luis Potosí (9.8 %), Michoacán (7.3 %), Jalisco (6.3 %) y Zacatecas (5.6 %). También destacan Baja California (5.2 %), Puebla (3.7 %) y Sonora (3.4 %).

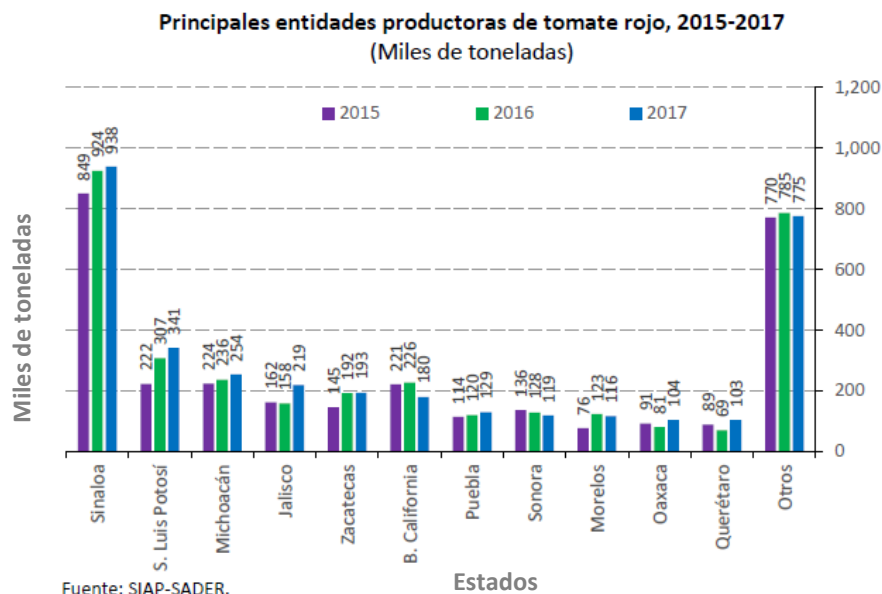


Fig. 1 Principales estados productores de tomate a nivel nacional (Fuente: SIAP-SADER)

Entre las principales entidades productoras, el mayor dinamismo en la producción se observa en Puebla, Querétaro, Oaxaca y San Luis Potosí. En dichas entidades, el volumen cosechado de tomate entre 2007 y 2017 creció a tasas promedio anuales de 22.1, 18.0, 16.8 y 11.0 %, respectivamente, mientras que la producción nacional lo hizo a una tasa promedio anual de 4.8 %. En 2018, el tomate rojo fue el segundo producto más importante en el valor de las exportaciones agropecuarias mexicanas, con una participación de 12.8 %. Durante la última década, las exportaciones mexicanas de tomate crecieron a una tasa promedio anual de 4.7 %, al ubicarse en 1.68 millones de toneladas en 2018, volumen equivalente a 48.7 % de la producción nacional. El 99.7 % de las ventas de tomate mexicano se destinó a Estados Unidos. En ese año, México abasteció 91.1 % de las compras estadounidenses de tomate fresco. Por otra parte, el consumo per cápita anual de tomate en México se ubica en alrededor de 15 kilogramos por año. Alrededor del 98 % del volumen del tomate que se

produce en el país se destina para el consumo en fresco y el resto se industrializa (SAGARPA, 2017a).

El estado de Puebla ocupa el décimo lugar en la producción nacional de tomate, se siembra tomate en una superficie aproximada de 1,400 hectáreas distribuidas en 37 municipios; principalmente de las variedades conocidas como *saladatte* y *bola*; la producción de éstas y otras variedades, tales como: *cherry*, *riñón* y *uva*, (fig. 2) es de alrededor de 57 mil toneladas, de acuerdo a datos de la Secretaría de Desarrollo Rural. Cabe mencionar que a través de la instalación de invernaderos que proporcionan condiciones controladas de producción de tomate, se ha detonado una actividad y alternativa productiva para los productores de la región, introduciendo aspectos de transferencia de tecnología. Además, en el estado de Puebla hay 327 hectáreas de invernaderos en los que se producen 17 mil 521 toneladas de este cultivo en varios municipios, inclusive de la Mixteca, que es una zona de difícil disponibilidad de agua (Castillo & Moreno-Pérez, 2009). De ahí la importancia del uso de invernaderos y del manejo del cultivo con hidroponía que está creciendo en todo el mundo, con la finalidad de cuidar y aprovechar este recurso natural (Pue, 2018).



OTROS TIPOS

- Cocktail
- Liso
- Marmande
- Moneymaker
- Muchamiel
- Pometa
- Ramillete
- San Marzano
- Vemone

Fig. 2 Variedades de tomate consumidas y comercializadas en México Fuente: Infografía tomate mexicano (SAGARPA, 2017a).

2.3.- Hongos fitopatógenos: importancia poscosecha

Los hongos forman parte de un gran grupo de organismos eucariotas, heterótrofos y los cuales ocupan la mayor parte de los hábitats terrestres. Aproximadamente un 10% del total de especies de hongos conocidas son capaces de colonizar tejidos vegetales (Schafer, 1994). Una gran parte de éstos son de importancia agrícola, ya que causan pérdidas económicas importantes, afectando en distintas etapas de la agricultura, desde el cultivo hasta etapas posteriores, como la poscosecha (Agrios, 2004). Los productos agrícolas, tales como el tomate, son susceptibles al ataque por fitopatógenos, los daños mecánicos son la vía de ingreso más importante de los principales hongos y por lo tanto las responsables de los principales problemas en poscosecha. Los daños mecánicos dejan los tejidos frescos totalmente desprotegidos facilitando la entrada de las esporas. En estas heridas, el patógeno comienza a desarrollarse según el nivel de inóculo, la susceptibilidad de la fruta y las condiciones ambientales (Martínez et al., 2012).

Dentro de estos fitopatógenos se destacan los hongos, que atacan cultivos de importancia agrícola tales como calabaza, zanahoria, papaya, tomate, causando

alteraciones en la etapa de poscosecha principalmente (R. Bernal, 2010). A continuación, se mencionan algunos ejemplos de hongos fitopatógenos que atacan diferentes cultivos de importancia económica. *Talaromyces minioluteus* ha sido reportado recientemente en frutas tales como tomate, cebolla, naranja y membrillo causando daños como pudrición y licuefacción total del fruto en poscosecha (Gryganskyi et al., 2018). *Alternaria alternata* es un hongo causante de pudrición negra, esta se presenta como manchas superficiales negras o café secas hundidas y posteriormente se forma una capa densa del hongo sobre las heridas, este hongo ataca al tomate generalmente en la etapa de poscosecha (Wang et al., 2008). *Botrytis cinerea* causa una enfermedad conocida como “moho gris”, caracterizada por manchas y posteriores lesiones en el fruto, además afecta severamente a una amplia variedad de frutas y verduras entre los cuales se encuentra el tomate. Otro hongo fitopatógeno del tomate es *Cladosporium fulvum*, el cual se encuentra entre los patógenos que dañan la parte aérea de la planta ocasionando el “moho foliar”; una enfermedad que provoca que la fotosíntesis no pueda llevarse a cabo en dicha planta, lo que se traduce en la disminución tanto de la calidad como del rendimiento del fruto (Torres, Iannacone, & Gomez, 2008). Uno de los hongos fitopatógenos que afecta al tomate durante la poscosecha es *Rhizopus stolonifer*, tiene el mayor número de reportes a nivel mundial, este hongo causa pudrición blanda conocida por afectar a una gran cantidad de frutas y verduras entre las cuales se encuentran las fresas, naranja, tomate entre otras (Weinberg, n.d.).

2.3.1.- *Rhizopus stolonifer*

Este hongo pertenece a la subdivisión Zygomycotina, clase Zygomycetes, orden; Mucorales, género; *Rhizopus*, las especies de *Rhizopus stolonifer* sobreviven en el suelo por lo que las esporas liberadas pueden sobrevivir bajo

largos períodos secos a temperaturas relativamente altas. Sin embargo, generalmente no causan infección directa de tejido sano, ya que necesitan una herida superficial o magulladura para que la espora logre germinar sobre el fruto (Navarro Garcia & Barba Navarro, 1996).

La infección previa a la recolección por este patógeno ocurre comúnmente en frutas lesionadas por insectos o afectadas por trastornos fisiológicos, como la fosa dividida. Una vez que una espora cae sobre un tejido lesionado, germina y comienza a crecer en la superficie, produciendo un micelio espeso que al mismo tiempo produce enzimas que degradan las células (pectinasas, amilasas) que desnaturalizan los tejidos de antemano y conducen a la infección. *R. stolonifer* produce esporangióforos finos erectos y se ancla al sustrato mediante rizoides. Una vez que finaliza el crecimiento, los esporangióforos dan lugar a esporangios de columnela aérea hemisférica, una pared celular delgada que contiene numerosas esporangiosporas negras cuando está madura (Badii & Abreu, 2006) (Figura 3).

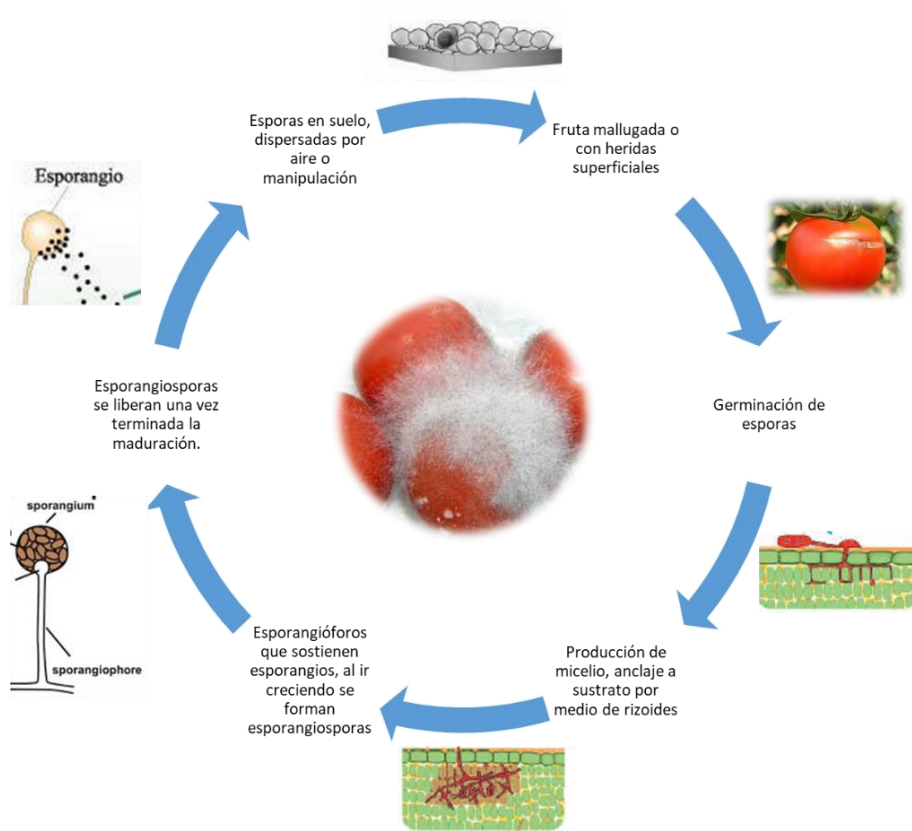


Fig. 3 Modo de infección de *Rhizopus stolonifer* (Fuente: Instituto Nacional de Tecnología Agrícola) (INTA, 2018).

Rhizopus stolonifer causa enfermedades poscosecha de muchas frutas y verduras, debido a la rapidez con la que se disemina desde la fruta en descomposición a una fruta adyacente a la temperatura ambiente, el patógeno es uno de los hongos de descomposición más temidos después de la cosecha. Provoca una enfermedad destructiva que tiene distribución mundial y principalmente el tomate es afectado durante su almacenamiento; normalmente causa una podredumbre acuosa suave y es un hongo de crecimiento muy rápido (Agrios, 2004).

2.4.- Estrategias alternativas: biocontrol

Durante el período posterior a la cosecha, los métodos de almacenamiento adecuado, capaz de retrasar la maduración de la fruta y de frenar el desarrollo de patógenos, pueden prevenir o al menos reducir las pérdidas. El uso desmedido de plaguicidas ha ocasionado graves daños al medio ambiente (Weinberg, n.d.), y que por lo tanto impactan negativamente en la microbiota existente en la planta y en el suelo, afectando así a los microorganismos que son benéficos para la misma (Navarro Garcia & Barba Navarro, 1996). Entre los agentes fitopatógenos que afectan al tomate, existe una extensa diversidad de éstos, siendo hongos y bacterias los principales agresores. Esto sigue siendo una preocupación para los agricultores que pierden sus cosechas y por ende su fuente de ingresos económicos. Se han probado para *Botrytis cinerea* distintas alternativas para su control, como por ejemplo *Streptomyces rectiviolaceus*, una actino bacteria que demostró disminuir su crecimiento hasta en un 80% comparado con el control, y evitando así la utilización de químicos (Kim, Park, Jeon, & Kim, 2019). Así mismo, especies pertenecientes al grupo de *Burkholderia sensu lato* como *Paraburkholderia tropica* también han sido utilizadas como biocontrol para distintos fitopatógenos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium oxysporum*, estos últimos causantes de enfermedades como antracnosis, tizón de plántulas y podredumbre en raíz y tallo en plantas de tomate y otros cultivos agrícolas. Incluso, se ha reportado que *P. tropica* inhibe la población del nematodo *Xhipinema elongatum*, el cual provoca necrosis en raíces y causa daños al cultivo. *P. tropica* se asocia con nemátodos menos patógenos promoviendo un ambiente más favorable para la planta (Bolívar-Anillo, Contreras-Zentella, & Teherán-Sierra, 2016) (Oliveira, Moral, Bouhmidi, & Trapero, 2005) (Sañudo, Salazar,

Betancourth, & Castillo, 2013). Otro ejemplo es *Stemphylium solani*, el cual es un hongo que ataca no solo a tomate sino a diversos productos agrícolas como calabaza y chile morrón, produciendo la enfermedad conocida como “mancha gris de las hojas”; si esta enfermedad llega a afectar de forma severa, provoca la defoliación completa de la planta y la pérdida total de la producción (A. Bernal, Martínez, Díaz, Herrera, & Martínez, 2006). Se han realizado estudios para evaluar posibles agentes de control, utilizando diversas especies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Serratia plymuthica* y *Bacillus subtilis* siendo de los microorganismos más estudiados como posibles antagonistas (A. Bernal et al., 2006). Otro hongo fitopatógeno que además de dañar al tomate, perjudica cultivos de chile morrón, calabaza, zanahoria entre otros es *Cladosporium fulvum*, el cual se encuentra entre los patógenos que afectan la parte aérea de la planta ocasionando el “moho foliar” que conlleva a la disminución de la calidad y del rendimiento del cultivo. Estudios realizados en pro de la evaluación de posibles antagonistas de este fitopatógeno, han llevado a la utilización de hongos como *Trichoderma harzianum*, *T. virens*, *T. viride* y *Hansfordia pulvinata*. Los resultados de esta evaluación mostraron que especies del género *Trichoderma* tuvieron mayor control sobre el fitopatógeno, que por medio de mecanismos de acción como el micro parasitismo (simbiosis antagónica en la que el parasito produce enzimas que afectan al hospedero) logró una disminución significativa en el crecimiento del mismo (Torres et al., 2008).

Por otro lado, es bien conocido que *Rhizopus stolonifer* es uno de los hongos fitopatógenos con mayor número de reportes como agente causal de pérdidas de tomate a nivel poscosecha. La utilización de productos químicos es un

método común, generalmente su uso es desmedido y a pesar de esto no se obtiene un control total de la enfermedad. En los tomates, no hay pruebas suficientes sobre la efectividad de la aplicación química para controlar la enfermedad de la pudrición provocada por *R. stolonifer* debido a las características de crecimiento y desarrollo del hongo, provocando un daño extensivo en un periodo corto de tiempo (FAO, 2015). Derivando en una problemática económica a nivel mundial, ya que no se logra cumplir con la calidad para exportación y consumo, además de la pérdida completa de los frutos. Para el enfrentamiento de este hongo fitopatógeno se ha recurrido a diversos tratamientos químicos, así como alternativas basadas en biocontrol. Entre éstas se puede mencionar la disminución del daño causado por el hongo, utilizando a *Pantoea agglomerans* logrando un efecto dado por la competencia de nutrientes entre la bacteria antagonista y el hongo (Cabrefiga et al., 2006; Nunes et al., 2001). Otra de las alternativas es el uso de productos derivados de extractos de plantas, como el timol y el ácido salicílico, los cuales actúan sobre las estructuras del hongo logrando causar daños al mismo y afectando su desarrollo (Tabla 2) (Yao et al., 2019). Por estas razones, las comunidades científica y social mantienen el interés por descubrir nuevas y mejores opciones que sustituyan el uso de químicos. Las alternativas que se buscan, se pueden encontrar albergadas en el término de control biológico o biocontrol, referido desde el siglo XIX y que se basa en la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, con la finalidad de erradicar o disminuir los daños ocasionados por fitopatógenos (Badii & Abreu, 2006).

Tabla 2 Distintos controles utilizados en el tratamiento de *Rhizopus stolonifer* en diferentes frutos.

Control Vs <i>Rhizopus stolonifer</i>	Tipo	Fruto	% de inhibición	Referencia
Dicloran	Químico	Tomate	87%	Northover y Zhou 2002 (Northover & Zhou, 2002)
Iprodione	Químico	Durazno	59%	Abdel-Mallek et al., 2016 (Abdelmalek & Salaheldin, 2016)
Quitosano	Polímero natural	Tomate	79%	Alvarado Hernandez, 2011 (María et al., 2011)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Hongo	Uvas	73%	Castoria et al., 2001 (Felice et al., 2007)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Hongo	Durazno	80%	Zhang et al., 2019 (S. Zhang, Zheng, Xu, & Liu, 2019)
<i>Trichosporon pullulans</i>	Hongo	Manzana	67%	Francés et al., 2006 (Cabrefiga et al., 2006)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Bacteria	Pera	80%	Nunes et al., 2011 (Nunes et al., 2001)

2.5.- *Burkholderia sensu lato*

Las primeras especies de *Burkholderia* fueron descritas por primera vez en 1942, por Walter H. Burkholder, sin embargo, el género ha pasado por diversas divisiones a través de los años. En el año 2016 en un estudio de revisión, Estrada de los Santos et al., proponen la división en dos grandes grupos; grupo A (*Caballeronia* y *Paraburkholderia*) y grupo B (donde se incluyen la mayoría de patógenos humanos, animales y vegetales). En el año 2017 Beukes *et al.*, realizan un estudio donde se incluyen las 78 cepas tipo y otras especies ambientales, logrando una división formal basada en los genomas centrales y es a partir de este estudio que es considerado el grupo *Burkholderia sensu lato*.

Burkholderia sensu lato es un grupo grande y complejo que comprende más de 122 especies, contiene cepas patógenas (*Burkholderia cepacia* (LPSN, 2020), *B. pseudmallei* (LPSN, n.d.) *B. latens* (LPSN, 2008b)), fitopatógenas (*Burkholderia glumae* (LPSN, 1994)), simbióticas (*B. rhizoxinica* (LPSN, 2007), *B. tropica*(LPSN, 2004)) y no simbióticas (*B. anthina* (LPSN, 2002), *B. diffusa* (LPSN, 2008a), *B. lata*(LPSN, 2009)) de una amplia gama de hábitats ambientales (suelo, agua, plantas, hongos) y clínicos (animales, humanos). Pertenece a la clase β -Proteobacteria, dentro de la familia *Burkholderiaceae*. Dentro de sus características generales podemos encontrar que son bacilos rectos, catalasa positivos, Gram-negativos, oxidasa variable (por lo general positiva), mesófilos, aerobios, movilidad positiva y pueden tener un flagelo polar único o bien un penacho de flagelos polares bacteria lofótrica).

Actualmente, la división en *Burkholderia sensu stricto*, *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *micetohabitans* y *Robbsia* está fuertemente respaldada por el análisis del genoma (Bournaud et al., 2018). Estos nuevos géneros corresponden ampliamente a los diversos hábitats/estilos de vida de *Burkholderia sensu lato* y sus posibles aplicaciones biotecnológicas incluida la biorremediación, por ejemplo, todas las cepas beneficiosas para la planta y ambientales (PBE) están incluidas en *Paraburkholderia* (que también incluye todos los simbioses de leguminosas que fijan N_2) y *Caballeronia*, mientras que la mayoría de los patógenos humanos y animales se conservan en *Burkholderia sensu stricto* (Santos, Rojas-rojas, Tapia-garcía, Vásquez-murrieta, & Hirsch, 2016). Existen evidencias experimentales de que algunas cepas de *Burkholderia cepacia* y *Burkholderia tropica* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios (idiolitos) los cuales han demostrado tener un efecto antagónico sobre el crecimiento de hongos patógenos de importancia clínica y agrícola (Tenorio-salgado et al., 2013).

En este estudio, se utilizó un cepario de nuestro grupo de trabajo conformado por 46 cepas ambientales aisladas a partir de plantas silvestres y cultivos de interés agrícola procedente de diferentes regiones del Estado de Puebla e identificadas como miembros del grupo *Burkholderia sensu lato* mediante la secuenciación del gen 16S rRNA (Cervantes, 2016). En un estudio previo, Jiménez-Gómez realizó un estudio en búsqueda de bacterias antagónicas a hongos fitopatógenos a partir del cepario de *Burkholderia sensu lato*, en el cual obtuvo como resultado que 15 cepas de las 46 cepas estudiadas inhibieron el crecimiento radial de 4 hongos fitopatógenos del café: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria longissima* y *Hemileia vastatrix*, obteniendo porcentajes de inhibición de hasta un 63% y para el caso de *Hemileia vastatrix* una disminución en su % de germinación hasta un 15%.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La calidad poscosecha del tomate (*Solanum lycopersicum*) es disminuida por la afectación de microorganismos fitopatógenos, los cuales además de absorber nutrientes del fruto para su propio crecimiento. Muchos de ellos tienen la capacidad de secretar sustancias (enzimas, toxinas, etc.) que afecten la apariencia del fruto. Por lo tanto, la intromisión de estos fitopatógenos provoca grandes pérdidas económicas. Dentro de los causantes que disminuyen la calidad del fruto del tomate poscosecha se destacan los hongos como agentes etiológicos de diversas enfermedades, tal como *Rhizopus stolonifer*, el cual es considerado como uno de los principales fitopatógenos que provocan enfermedades poscosecha en distintos productos de importancia agrícola como calabaza, zanahoria, papaya y principalmente tomate. Para contrarrestar estos daños se recurre de primera mano a los tratamientos químicos. Sin embargo, si

se piensa en una relación costo-beneficio, las desventajas por su utilización son mayores que los resultados que ofrecen. Por ejemplo, los daños al medio ambiente, la contaminación, el aumento en costos de producción y el rechazo de los consumidores a estos compuestos.

4.- JUSTIFICACIÓN

México es el principal proveedor a nivel mundial de tomate con una participación en el mercado internacional de 25% del valor de las exportaciones mundiales. En 2019, fue el principal exportador de tomate en términos de volumen, abasteció 84.9 por ciento del volumen de tomate fresco importado por Estados Unidos, de acuerdo la base de datos de Estadísticas del Comercio Internacional de las Naciones Unidas (UN Comtrade database, 2019). Para la exportación del producto se requiere de ciertos estándares de calidad. Sin embargo, la calidad del producto es disminuida por diversos factores, principalmente hongos, esto provoca que el producto no cumpla con los niveles de calidad establecidos para la exportación y a su vez genera grandes pérdidas económicas. Uno de los hongos con mayor incidencia a nivel mundial es *Rhizopus stolonifer*, el cual invade el fruto y los adyacentes, creando redes de micelio sobre los productos que en pocos días pueden llegar a afectar la totalidad de los mismos. Posee una rápida velocidad de crecimiento y se desarrolla en una amplia variedad de temperaturas y humedades relativas, características que le permiten colonizar rápidamente a su hospedero. En solamente cuatro días este hongo puede pudrir totalmente los frutos, provocando pérdidas considerables en un corto período de tiempo (Yao et al., 2019).

A pesar de que se han aplicado diversos métodos principalmente químicos para la conservación del tomate, éstos no han sido suficientes para contrarrestar los daños y por consecuencia las pérdidas. Además, la aplicación y uso desmedido de los mismos provoca estragos irreversibles en el medio ambiente (FAO, 2015).

Frente a esta situación surge la necesidad del desarrollo de nuevas alternativas que sean eficientes, económicas y ecológicas, que puedan reducir el daño generado por los hongos y aumentar tanto la calidad como la vida de anaquel. Por lo anterior, en el presente proyecto se plantean obtener cepas productoras de sustancias antifúngicas que puedan inhibir o aminorar la incidencia o severidad de afectación por parte del hongo *Rhizopus stolonifer*. Evitando de esa manera pérdidas económicas y elevando la calidad del fruto para asegurar tanto su consumo como su exportación adecuada, sin generar riesgos al medio ambiente.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general

Evaluar la actividad antagónica *in vitro* a partir un cepario de grupo *Burkholderia sensu lato* que produce metabolitos secundarios, frente a *Rhizopus stolonifer* que afecta a *Solanum lycopersicum*.

5.2.- Objetivos particulares

1. Aislar al hongo *Rhizopus stolonifer* a partir de fruto de tomate
2. Seleccionar a las cepas con mayor potencial antifúngico frente al hongo fitopatógeno.

3. Evaluar *in vitro* la capacidad antagónica de los idiolitos producidos con actividad antifúngica contra *R. stolonifer*

6.- HIPÓTESIS

A partir del cepario bacteriano de aislamientos pertenecientes al grupo *Burkholderia sensu lato* se encuentran especies capaces de producir compuestos que inhiben el crecimiento del hongo *Rhizopus stolonifer*.

7.- DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

7.1.- Material biológico

7.1.1.- Hongo fitopatógeno

Rhizopus stolonifer se aisló de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad bola con síntomas de pudrición ocasionada por el hongo (Angulo-escalante et al., 2009).

7.1.2.- Cepario *Burkholderia* spp.

En este estudio se utilizaron 12 aislamientos que en estudios previos demostraron inhibición del crecimiento micelial frente a cuatro hongos fitopatógenos: *Hemileia vastatrix*, *Alternaria longissima*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Jiménez-Gómez, 2018). Estas cepas fueron reactivadas para evaluar su crecimiento, pureza y viabilidad.

7.2 Reactivación de cepas

Se reactivaron 12 cepas pertenecientes al cepario de *Burkholderia sensu lato*, las cuales fueron aisladas e identificadas previamente (Cervantes, 2016). Estas

cepas se encontraban conservadas en glicerol al 30% y almacenadas a -80 °C. Para su reactivación se utilizó medio NB líquido y sólido para evaluar su viabilidad y pureza.

7.3 Aislamiento del hongo fitopatógeno

Se colectaron frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) con síntomas de pudrición blanda, la cual es ocasionada por *Rhizopus stolonifer*. Se tomaron secciones del fruto para posteriormente colocarlas en placas Petri que contenían agar PDA y se incubaron por 72 h a 25 °C (Hartanti, Rahayu, & Hidayat, 2015).

7.4 Purificación del hongo fitopatógeno

Fue preparada una suspensión de esporas, agregando 10 mL de agua destilada estéril a una placa Petri con un cultivo de 72 h, se hizo un raspado superficial con la ayuda de un portaobjetos estéril, la suspensión se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL. A partir de esta suspensión hubo diluciones seriadas hasta 10^{-7} para posteriormente sembrar cada una en placas con agar PDA y obtener una colonia aislada, estas se incubaron por 24 h a 25 °C (± 2 °C) (Bautista, 2006).

7.5 Mantenimiento del hongo fitopatógeno

Porciones de micelio con presencia de esporangiosporas, se introdujeron en tubos de microcentrífuga con 1 mL de agua destilada estéril y se almacenaron a -80 °C. Por otro lado, se vertió agar PDA en tubos de vidrio con tapa, se gelificó de manera inclinada para obtener agar en pico de flauta, para posteriormente sembrar el hongo fitopatógeno. El crecimiento, se cubrió con aceite mineral estéril y fue almacenado a temperatura ambiente.

7.6 Prueba de patogenicidad

Frutos de tomate *saladatte* previamente lavados, desinfectados y secados se colocaron individualmente en bolsas Ziploc®, se añadieron 3 mL de suspensión del hongo fitopatógeno, en el caso del control se añadió agua destilada estéril. Se incubaron por 96 h a 25 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). se observaron cada 24 h (Cabrefiga et al., 2006).

7.7 Obtención de metabolitos

Se prepararon inóculos de las cepas bacterianas, ajustados a una densidad óptica de 0.05 a 600nm, posteriormente fueron inoculados en medio MM9 adicionado con ácido succínico (0.05%) y glicerol (10%), e incubados por 48 h a 30 °C. pasado este tiempo de incubación fueron centrifugados a 4000 rpm, repitiendo este paso tres veces, el sobrenadante se sometió a dos procesos: fueron filtrados con ayuda de un filtro Millipore de 0.22 μm , y por otro lado inactivados por calor a baño María a 90 °C por 15 min.

7.8 Pruebas de evaluación *in vitro*

7.8.1 Ensayo dual

En un medio de cultivo PDA, el cual se esterilizó durante 15 min a 15 PSI, se enfrió a 45 °C y se vació en cajas Petri bajo condiciones asépticas. En el centro de la placa fue colocado un cuadro de agar de 1cm² con *Rhizopus stolonifer* en crecimiento activo de 72 h a 25 °C, posteriormente se colocaron 5 gotas de 3 μL de cultivo bacteriano de 48 h (30 °C). Las cajas para el control contenían de igual manera el cuadro de 1 cm, con 5 gotas de 3 μL de medio sin inocular. El ensayo fue incubado a (25 °C) por 96 h, midiendo el diámetro de crecimiento del hongo cada 24 h (Tenorio-salgado et al., 2013).

El resultado se calculó y se expresó en porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y se obtuvo a partir de la ecuación descrita por Vallejo-Cohen *et al.* en 1999 (Vallejo-Cohen, Vargas-arispuro, Corrales-Maldonado, & Martínez-Téllez, 2005).

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{\text{Crecimiento micelial testigo} - \text{Crecimiento micelial tratamiento}}{\text{Crecimiento micelial testigo}} \times 100$$

7.8.2 Ensayo Dual desfasado

Se preparó medio de cultivo PDA, el cual se esterilizó durante 15 min a 15 lb/plg², se enfrió a 45 °C y se vació en cajas Petri bajo condiciones asépticas. Fueron colocadas 5 gotas de 3 µL de cultivo bacteriano de 48 h (30 °C), estas placas se incubaron por 24 h a 25 °C, pasado este tiempo, en el centro de la placa se colocó un cuadro de agar de 1 cm x 1 cm con *Rhizopus stolonifer* en crecimiento activo. Las cajas para el control contenían de igual manera el cuadro de 1 cm, con 5 gotas de 3 µL de medio sin inocular, previamente colocadas sobre la placa (24 h antes). Las placas se incubaron a (25 °C) por 96 h, midiendo el diámetro de crecimiento del hongo cada 24 h (Suthar, Patel, Singh, & Khunt, 2017).

El resultado se calculó y se expresó en porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y se obtuvo a partir de la ecuación descrita por (Vallejo-Cohen *et al.*, 2005).

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{\text{Crecimiento micelial testigo} - \text{Crecimiento micelial tratamiento}}{\text{Crecimiento micelial testigo}} \times 100$$

7.8.3 Ensayo de inhibición simultanea

A partir de un cultivo de *R. stolonifer*, incubado por 72 h a 25 °C, se destapó la placa que lo contenía en condiciones de asepsia, se colocaron 10 mL de agua destilada estéril sobre el cultivo, cuidando el cubrir por completo el crecimiento del hongo, posteriormente se hizo un raspado de la superficie con ayuda de un portaobjetos estéril, obteniéndose una suspensión de esporas que se vertió en un tubo falcón de 50 mL.

Se prepararon placas de agar PDA, previamente esterilizado 15 min a 15 lb/plg², colocando 50 µL de la suspensión de esporas del hongo y extendiéndola sobre la superficie del agar con ayuda de un asa de Driglasky, se dejaron secar por 30 minutos y posteriormente en el centro de cada placa se colocó una gota de 20 µL de suspensión bacteriana. Las placas se incubaron por 96 h a 25° C y se midieron los halos de inhibición cada 24 h (Suthar et al., 2017).

7.8.4 Doble capa

Se prepararon inóculos de 12 de las cepas bacterianas de *Burkholderia sensu lato*. Estas cepas, por separado se colocaron al centro de cada placa que contenía agar MM9 modificado. Estas placas fueron colocadas en un recipiente e incubadas por 72 h a 30 °C. Pasado este tiempo de incubación, el crecimiento bacteriano fue retirado con ayuda de un portaobjetos estéril. Con la finalidad de aniquilar las células bacterianas, las placas fueron expuestas a vapores de cloroformo durante 60 minutos. Posteriormente se agregó una capa más de agar PDA inoculado previamente con el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*; 50 µL por cada 20 mL de medio de cultivo. El ensayo se incubó por 96 h a 25 °C, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición, cada 24 h (Pérez-y-terrón, Gonzalez-montfort, & Muñoz-rojas, 2014).

7.8.5 Difusión en pozos

Se preparó medio LB sin sal con 7.5 % de agar, en este medio se inoculó el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer* con una relación de 50 µL por cada 20 mL del medio, se mantuvo a temperatura ambiente hasta su gelificación. Posteriormente se realizaron pozos sobre el agar con ayuda de puntas azules estériles, estas se colocaron de manera invertida y se utilizó como un sacabocado. Después de realizar estos pozos, se colocaron 50 µL de los metabolitos obtenidos de las cepas bacterianas. Las placas se dejaron a temperatura ambiente por 24 h y posteriormente se incubaron por 72 h a 25 °C, midiendo el halo de inhibición cada 24 h. Para las placas control, se siguió el mismo procedimiento pero en cada pozo se colocó medio sin inocular (Pérez-y-Terrón, Gonzalez-Montfort, & Muñoz-Rojas, 2014).

7.8.6 Compuestos volátiles

El hongo fitopatógeno se sembró en placas de agar PDA después de 72 h se añadieron 10 mL de agua destilada estéril sobre el cultivo, se hizo un leve raspado con ayuda de un portaobjetos estéril y se colocaron 50 µL de la suspensión del hongo *Rhizopus stolonifer* al centro de la placa, posteriormente fue distribuido con ayuda de un asa de Driglasky, se dejaron las placas por 24 h hasta que se secaran. Por otra parte, en placas de agar NB modificado, se colocaron las cepas bacterianas a retar, una vez secas, las placas se juntaron (base + base), y fueron selladas con vita film y plástico adherente, para incubarse por 96 h a 25 °C y los resultados se ley registrar los resultados cada 24 h (Tenorio-salgado et al., 2013).

8. Evaluación *in vitro* del efecto antagónico

8.1 Inhibición del crecimiento micelial

Se realizó un cultivo del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, se sembró en agar PDA y se incubó por 3 días a 25 °C, para su uso posterior.

Se preparó medio de cultivo PDA en cajas Petri. Una vez gelificado fue colocado en el centro un cuadro de agar con crecimiento activo de 1 cm², alrededor del cuadro se colocaron 5 gotas de los metabolitos bacterianos. En el caso del control se colocó medio sin inocular. El ensayo se realizó por triplicado, midiendo el crecimiento del micelio hasta que el crecimiento abarco por completo la placa de agar, con revisiones cada 24 h.

8.2 Inhibición de la esporulación

Se realizó un cultivo del hongo *Rhizopus stolonifer* a partir del cual se obtuvo una suspensión de esporas agregando 10 mL de agua destilada estéril y realizando un raspado con ayuda de un portaobjetos estéril, ésta se vertió en un tubo previamente esterilizado. Se tomó una alícuota para llenar una cámara de Neubauer y realizar el conteo de esporas del control. Una vez obtenido este número, se realizó un conteo de las esporas del hongo después de enfrentarse a las cepas elegidas (GB99 y GB94), se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. La concentración de esporas fue determinada con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico, realizando el conteo con un aumento total de 400 X y siguiendo la fórmula reportada (Bautista, 2006). Se analizaron los resultados por ANOVA de una vía y fueron graficados para una mejor observación.

Para el porcentaje de inhibición de la esporulación se hicieron los cálculos correspondientes a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Número de esporas control} - \text{Número de esporas tratamiento}}{\text{Número de esporas control}} \times 100$$

8.3 Identificación de esporangios alterados

Se realizaron tinciones por medio del método de la cinta adhesiva. Brevemente, en condiciones asépticas se tomaron muestras de las estructuras del hongo fitopatógeno de 72 h de crecimiento, tanto del control como de los tratamientos, se colocó un pedazo de cinta adhesiva en el asa micológica, se colocaron sobre el crecimiento activo para posteriormente colocarlas sobre un portaobjetos que tenía una gota de colorante de lactofenol azul de algodón. Estas muestras se observaron con ayuda de un microscopio equipado con una cámara (Moticam), también se utilizó el software S-Eye_Setup-1.6.0.11 para capturar las imágenes y determinar el tamaño de cada uno.

9.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada ensayo se obtuvieron por triplicado y posteriormente se sometieron a un análisis estadístico (ANOVA de una vía) y se graficaron para una mejor interpretación de los resultados. Todo se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.4.2.

10. - Diagrama de flujo experimental

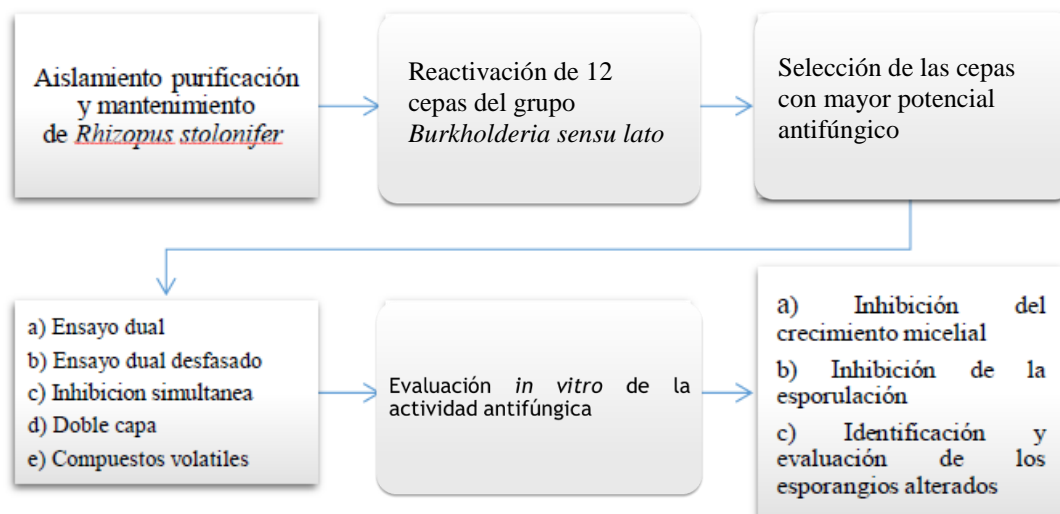


Fig. 4 Diseño experimental que se llevó a cabo en el presente trabajo de tesis. Se muestran los componentes principales de las metodologías empleadas.

11. Resultados y discusión

11.1 Aislamiento de hongo fitopatógeno

El hongo se sembró en agar PDA y desarrollo un micelio abundante aéreo de color blanco que en días posteriores se tornó a un color grisáceo oscuro, de igual manera se lograron observar varios esporangios de color negro, el crecimiento cubrió la placa por completo a las 48 h (fig. 5)

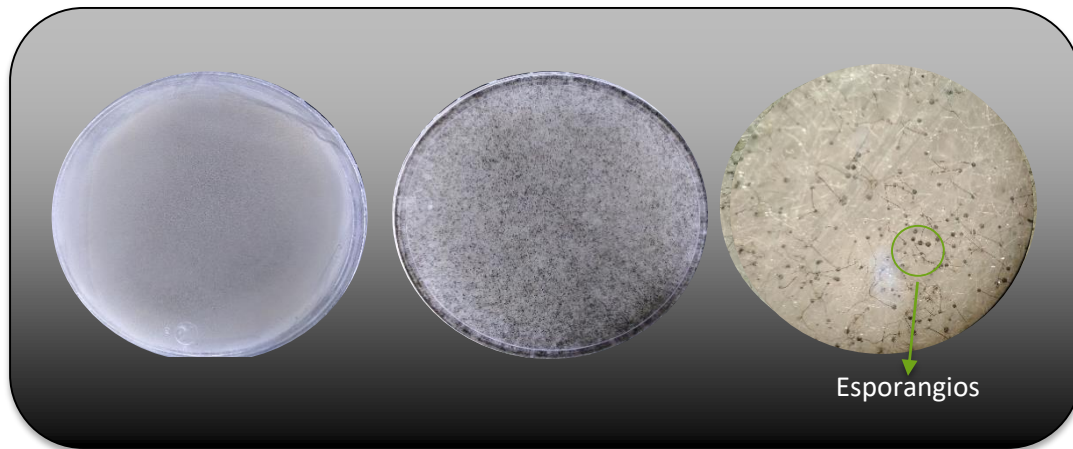


Fig. 5 Crecimiento en placa de agar PDA, *Rhizopus stolonifer* 48 h y 72 h.

En cuanto a características microscópicas (fig. 6) se observaron estructuras tales como: hifas aceptadas (entre 5-10 μm), esporangios que contenían dentro las esporangiosporas redondeadas a ovaladas con un tamaño de 8 a 15 μm , también se observó la columnela, así como los rizoides característicos tal como se describe en el atlas de micología de Alexandre Bonifaz (Vágvölgyi, Heinrich, Ács, & Papp, 2004).

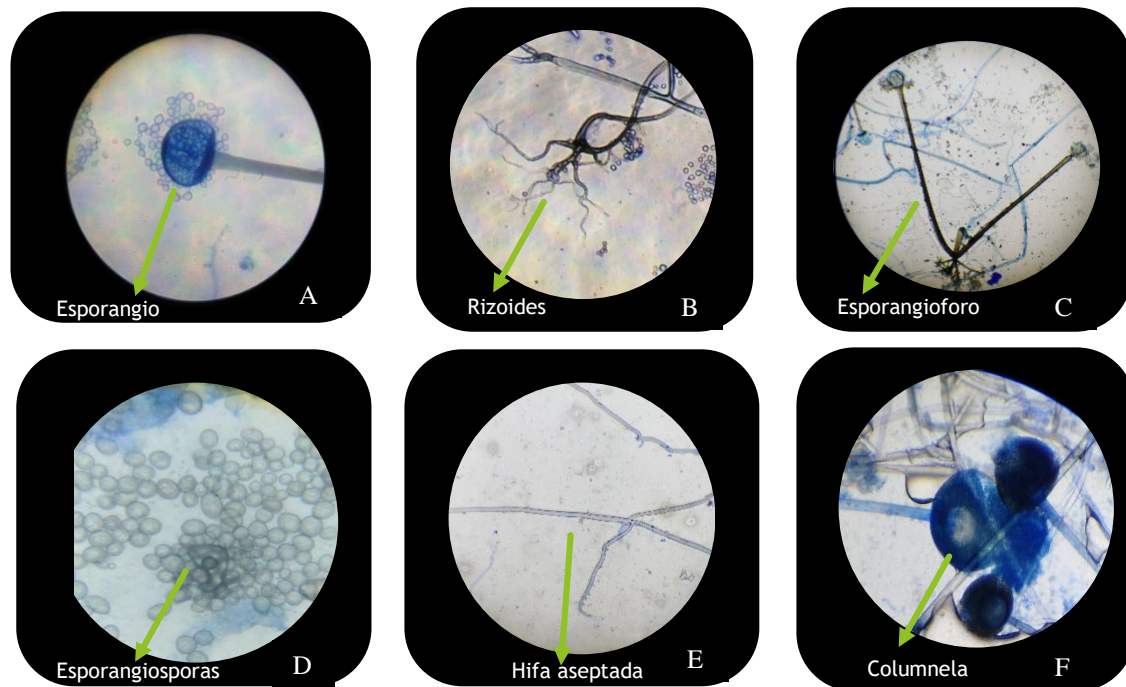


Fig. 6 Características microscópicas de *Rhizopus stolonifer*, aumento total 100x. A Esporangio, B rizoides, C esporangioforo, D esporangiosporas, E hifas aseptadas, F columnela.

11.2 Mantenimiento de hongo fitopatógeno

Se siguieron las metodologías reportadas por Smith (1994) (Smith, Ceazan, & Brooks, 1994) y Bueno y Gallardo (1984) (Bueno & Gallardo, 1984); por lo tanto, a partir de un cultivo de *Rhizopus stolonifer* en agar PDA de 72 h se tomaron fragmentos de micelio para poder inocularlos en tubos inclinados que contenían agar PDA, posteriormente se cubrieron con aceite mineral estéril. También se guardaron fragmentos de micelio en tubos de microcentrífuga con agua destilada estéril, estos tubos fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de cuatro meses, el hongo contenido tanto en aceite mineral como el que se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron sembrados en placas de agar PDA para verificar que el crecimiento no tuviera alteraciones, así como la conservación de las características tanto macroscópicas como microscópicas. Esto se observó en el cultivo después de 72 h de ser sembrado.

11.3 Prueba de patogenicidad

Con la finalidad de verificar la capacidad de infección del hongo fitopatógeno aislado, se realizó una prueba de patogenicidad con base a la metodología descrita por Cabrefiga & Badosa (2006) (Cabrefiga et al., 2006). Se inocularon con el hongo *Rhizopus stolonifer*, frutos de tomate variedad saladatte adquiridos en un mercado de la localidad, previamente lavados y desinfectados, se dejaron individualmente en bolsas ziploc y se monitoreó durante 96 h. A las 12 h se mostraron los primeros signos de infección por *Rhizopus stolonifer*: se observó micelio de color blanco en la superficie del tomate, a las 24 h el hongo había invadido una cuarta parte del fruto y finalmente a las 72 h el hongo infectó por completo al fruto, observándose un micelio abundante, cubriendo la superficie del mismo (Fig. 7).



Fig. 7 Infección en fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) causada por *Rhizopus stolonifer* a las 72h.

11.4 Pruebas de confrontación *in vitro*

11.4.1 Ensayo dual

Se realizó un ensayo de confrontación bacteria/hongo, en el cual el posible antagonista y el hongo fitopatógeno se confrontan al mismo tiempo, este ensayo

se realizó en placas de agar PDA, como se describe a continuación. Se utilizaron 12 cepas pertenecientes al grupo de *Burkholderia sensu lato*, así como el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. El ensayo se incubó por tres días y monitoreó cada 24 h, se tomaron medidas del diámetro de crecimiento del hongo, el cual se reportó en centímetros y finalmente se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de inhibición.

De las 12 cepas utilizadas, siete mostraron una inhibición en el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* a las 72h, tiempo en el cual el control había cubierto por completo la placa, el porcentaje de inhibición fue desde un 32% hasta un 78% comparado con el control, esta inhibición se observó como una limitación en el crecimiento general del fitopatógeno (fig. 8) siendo las cepas GB99, GB94 y D450 las que mostraron un porcentaje mayor, estos resultados se graficaron después de un análisis estadístico utilizando ANOVA de una vía (fig. 9). Estos porcentajes de inhibición superaron hasta un 30 % a los reportados por Toledo et al., 2002 (Toledo, Hernández, Alvarez, Martín, & Várquez, 2002), quienes reportaron el potencial como agente biocontrol de una cepa de *Burkholderia cepacia* probada contra el hongo *Fusarium* sp. atribuyendo este potencial a la producción de sustancias antifúngicas y sideróforos; sin embargo, los autores no mencionan una identificación de los mismos.

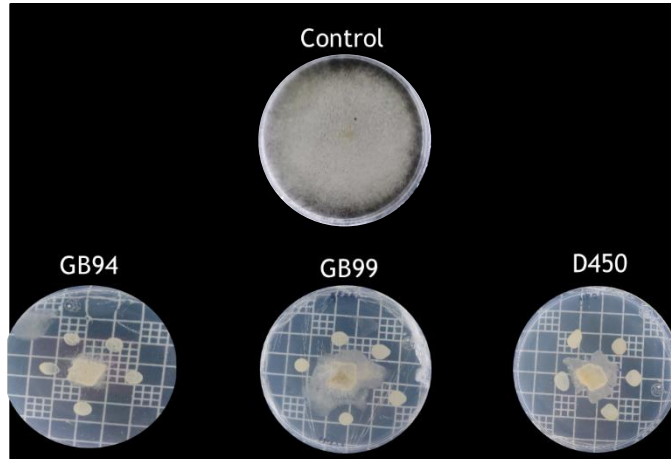


Fig. 8 Ensayo dual en agar PDA incubado por 72 h, en el cual se enfrentó a *Rhizopus stolonifer* contra cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. En la parte superior se observa el crecimiento del control, cubriendo por completo la placa Petri. En la parte inferior; el hongo en presencia de las cepas GB94 (inferior Izquierda), GB99 (inferior central), D450 (inferior derecha).

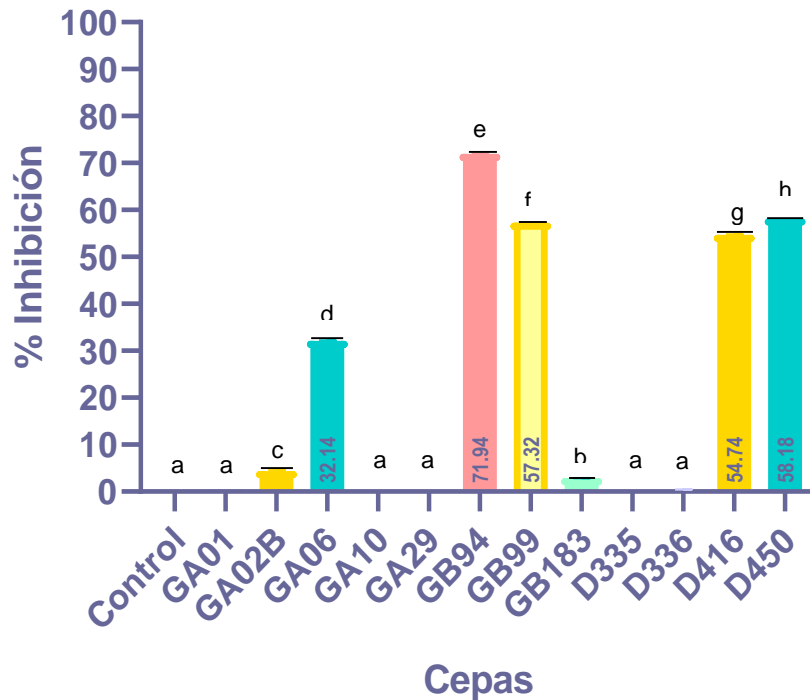


Fig. 9 Ensayo dual *Burkholderia sensulato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, a las 72 h con respecto al control. $p < 0.0001$

11.4.2 Ensayo dual desfasado

Se realizó un ensayo dual con ciertas modificaciones, se inocularon las cepas bacterianas y al hongo fitopatógeno. Las cepas bacterianas se incubaron por 24 h sobre la placa de agar PDA, y posteriormente se sembró al hongo fitopatógeno. Se utilizaron las tres cepas que presentaron mayor potencial antagonico bajo la metodología previamente utilizada. El ensayo se monitoreó y se midió el crecimiento del hongo cada 24 h. Se hicieron los cálculos correspondientes con base en la fórmula descrita por Vallejo-Cohen *et al* (1999) para reportar los resultados en porcentaje de inhibición. Las cepas GB94, GB99 y D450 mostraron potencial antagonico. Este porcentaje fue mayor en un 20 % con respecto al ensayo dual, mostrando un antagonismo hacia *Rhizopus stolonifer* reflejado en la disminución de su crecimiento comparado con el control (fig. 10). El porcentaje de inhibición presentado por las cepas fue de un 83.53% para D450, 87.37% para GB99 y 92.33% para GB94. Estos datos fueron obtenidos del ensayo realizado por triplicado y graficados después de realizar el análisis estadístico de los datos (fig. 11). Este aumento en el porcentaje de inhibición se esperaba de acuerdo a la modificación de la metodología, debido a que se aumentó el tiempo de incubación de la bacteria. Por lo que se otorgó cierta ventaja sobre el crecimiento rápido del hongo. Al aumentar el tiempo de incubación de la bacteria se dio pauta a la producción de metabolitos antifúngicos. Esta metodología fue reportada recientemente por Sarven et al., 2020 (Sarven et al., 2020) al confrontar al hongo *Metarhizium anisopliae*, contra *Botrytis cinerea*, hongo necrótico que afecta principalmente a la vid, obteniendo un porcentaje de inhibición de hasta un 43%.

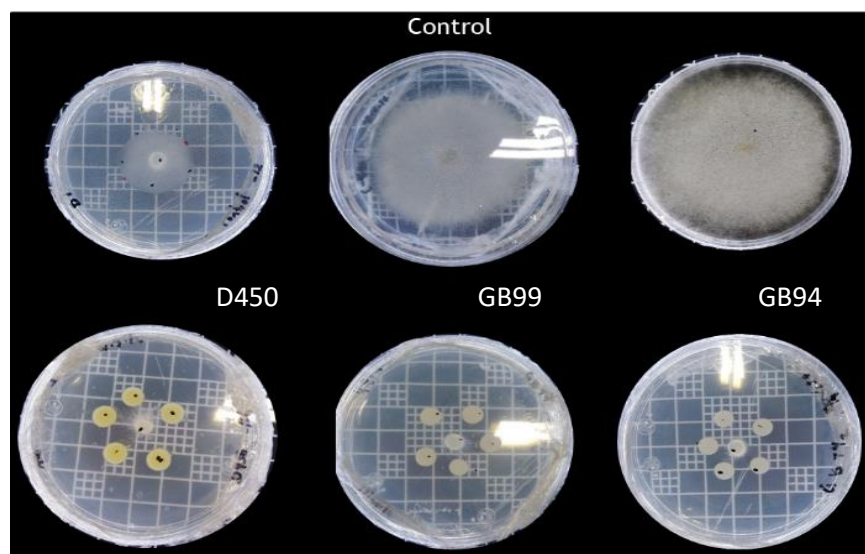


Fig. 10 Ensayo dual desfasado en agar PDA a las 72 h. *Rhizopus stolonifer* enfrentado con cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. En la parte superior se observa el crecimiento del control. En la parte inferior; el hongo en presencia de las cepas D450 (inf. Izquierda), GB99 (inf. central), GB94 (inf. derecha).

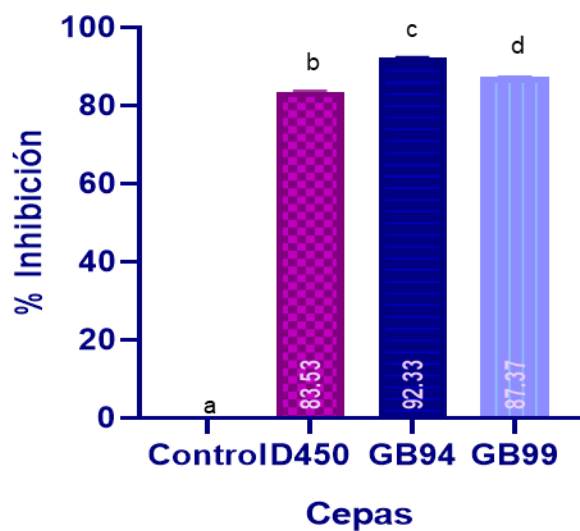


Fig. 11 Ensayo dual desfasado *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, a las 72 h con respecto al control. $p < 0.0001$

11.4.3 Inhibición simultanea

Una metodología utilizada en la evaluación de la capacidad antagónica es el método de inhibición simultánea, en esta metodología tanto el antagonista como el hongo a retar son “presentados” al mismo tiempo. Para este ensayo fueron utilizadas las 12 cepas del grupo de *Burkholderia sensu lato* y el hongo fitopatógeno *R. stolonifer*. El ensayo fue realizado en cajas Petri que contenía agar PDA, el ensayo se incubó y se tomaron las medidas del halo de inhibición que se presentó al estar el hongo en presencia de las cepas bacterianas. Ocho de las cepas utilizadas presentaron una inhibición notable del crecimiento del hongo, con un halo de inhibición de 1.5 cm a 3.7 cm (fig. 12). Las cepas GB94 y GB99 presentaron el mayor halo de inhibición, teniendo además diferencias estadísticamente significativas entre ellas (fig. 13). Estos resultados muestran el potencial antagónico presentado por las cepas probadas de *Burkholderia sensu lato* en comparación con *Pantoea agglomerans* (Nunes et al., en 2001) (Nunes et al., 2001). Esta última no fue efectiva en el control de la incidencia de *Rhizopus stolonifer*.

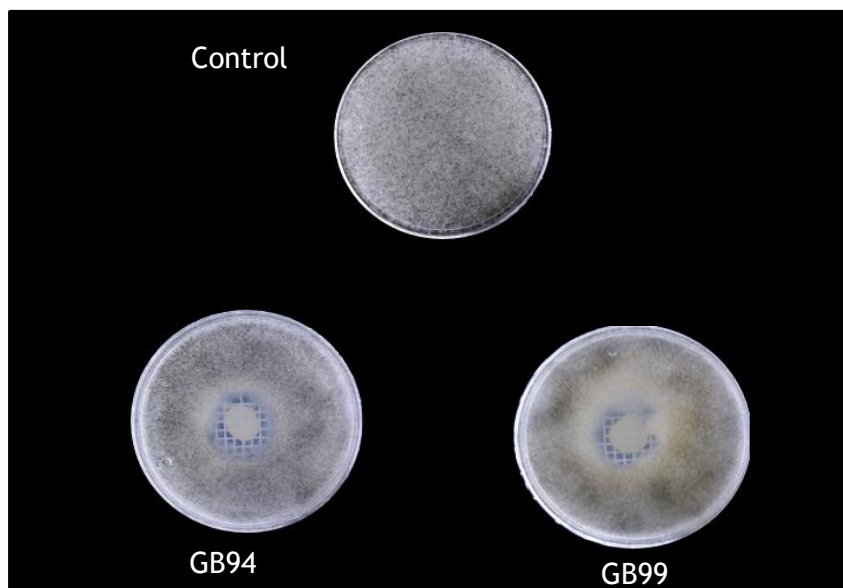


Fig. 12 Ensayo simultaneo en agar PDA a las 72 h de incubación. *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Se observan las dos cepas con mejores resultados en la inhibición del hongo y el control; el hongo fitopatógeno sin presencia de bacteria.

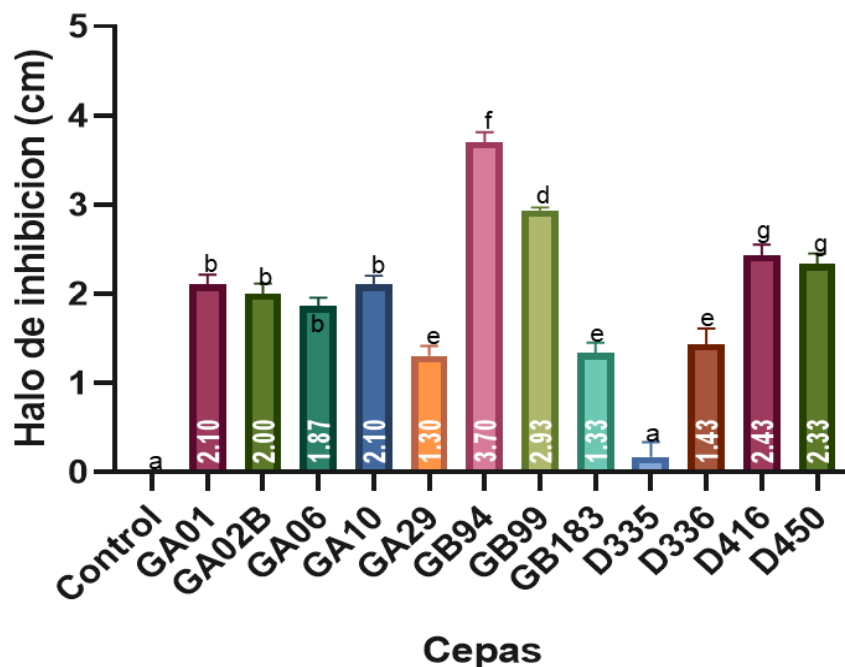


Fig. 13 Ensayo simultáneo *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica de halos de inhibición (cm), presentados por las cepas, en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, a las 72 h con respecto al control. $p < 0.0001$.

11.4.4 Ensayo de doble capa

Una técnica distinta para evaluar la capacidad antagónica es en donde los metabolitos del posible antagonista y el fitopatógeno se enfrentan y es muy útil para evidenciar la capacidad antagónica de un microorganismo. Para este ensayo se utilizaron las 12 cepas del grupo de *Burkholderia sensu lato* y el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Así mismo, se midieron los halos de inhibición presentados. Siete de las cepas mostraron un halo de inhibición desde 0.5 cm hasta 2.6 cm (fig. 14). Las cepas GB99 y GB94 (fig. 15) mostraron los mayores halos de inhibición con 2.4 cm y 2.6 cm, respectivamente. Estos resultados nos indican que las cepas probadas son capaces de producir sustancias antagónicas aun sin la presencia del hongo fitopatógeno, y éstas son difusibles en el medio utilizado en un rango aproximado de 2.6 cm de diámetro. Esto resulta en una enorme ventaja si se piensa en una producción masiva de estos compuestos, además al ser posiblemente identificados podría facilitarse la integración de los mismos a un recubrimiento para ser aplicados en frutos y/o productos agrícolas para mejorar la calidad poscosecha. Previamente han sido utilizadas cepas de *Burkholderia cepacia* para el control de diferentes hongos fitopatógenos, obteniendo bajo esta metodología halos de hasta 3 cm siendo mayores que los presentados contra *Rhizopus stolonifer*.

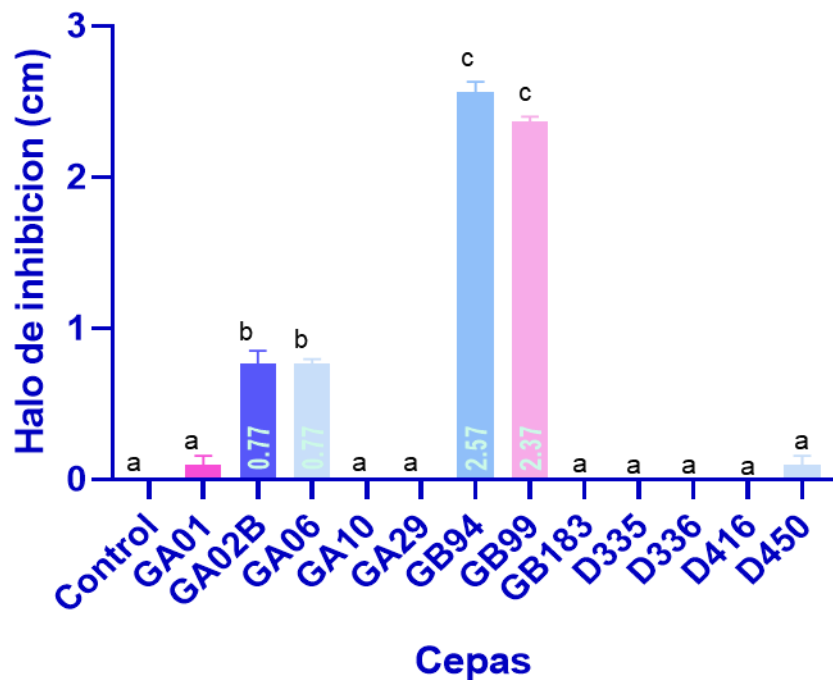


Fig. 14 Ensayo doble capa *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica del halo de inhibición de *Rhizopus stolonifer* presentado bajo la metodología de doble capa. Cada barra corresponde a la media obtenida (n=3), las barras de error corresponden al error estándar de la media. $p < 0.001$.

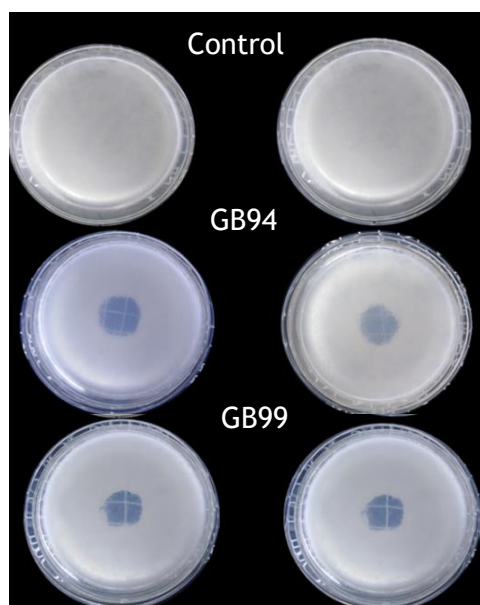


Fig. 15 Ensayo doble capa, *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Incubado por 72 h, se observan las dos cepas con mejores resultados en la inhibición del hongo y el control; el hongo fitopatógeno sin presencia de bacteria.

11.4.5 Compuestos volátiles

La acción antagónica de los microorganismos es dada algunas veces por compuestos volátiles orgánicos. En un estudio de 2013 Tenorio-Salgado y colaboradores (Tenorio-salgado et al., 2013) reportaron que algunas cepas de *Burkholderia* tenían efecto antagónico sobre algunos hongos fitopatógenos y esta acción era debida a compuestos volátiles producidos por dichas cepas bacterianas. Por lo anterior se probó esta técnica utilizando 12 cepas del grupo de *Burkholderia sensu lato* enfrentándolas con el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

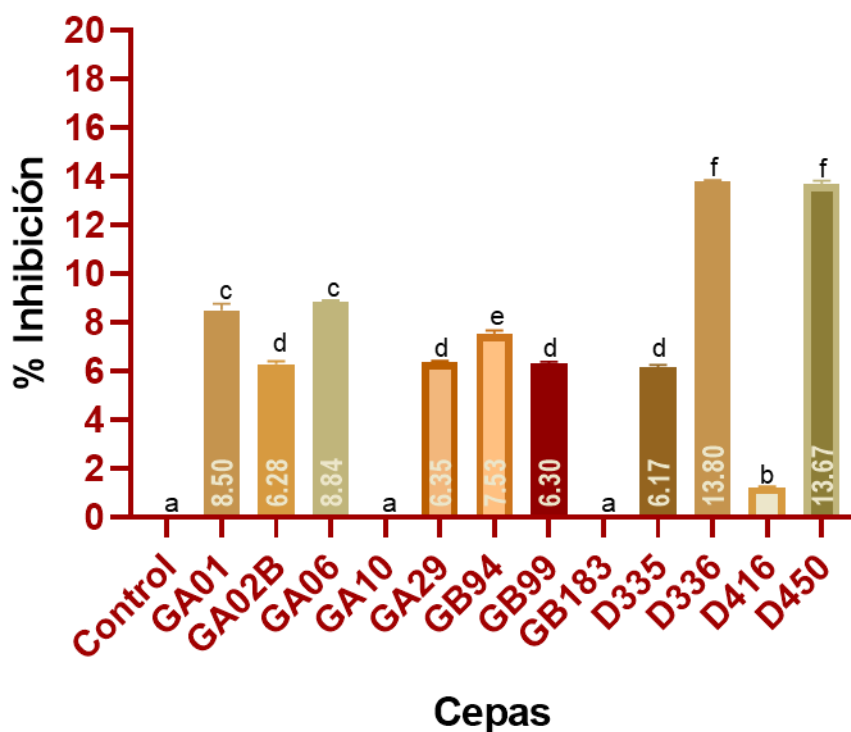


Fig. 16 Ensayo de compuestos volátiles *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica del porcentaje de inhibición de *Rhizopus stolonifer* presentado bajo la metodología de compuestos volátiles. Cada barra corresponde a la media obtenida (n=3), las barras de error corresponden al error estándar de la media. $p < 0.001$.

Se evaluó el crecimiento del hongo y se reportó en porcentaje de inhibición. De las cepas probadas, diez presentaron un porcentaje de inhibición de 1.2 % a 13.7 % (fig. 16). Las cepas con mayor porcentaje de inhibición fueron las cepas D336 y D450 (fig. 17). Por otro lado, las cepas que bajo otras metodologías mostraban buena actividad (GB94 y GB99), en este ensayo mostraron porcentajes de inhibición solo de 6 y 7 % respectivamente. Con estos resultados se logró determinar que la actividad antagónica mostrada por las cepas, no está dada potencialmente por compuestos volátiles ya que exhiben poca actividad antifúngica, en un estudio previo realizado por Jiménez Gómez 2018 (Jiménez-Gómez, 2018), cepas de este grupo mostraron una inhibición parecido a la que se obtuvo contra *Rhizopus stolonifer*. Éstas fueron probadas contra diferentes hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. solani* obteniendo una inhibición del 6 al 16%. Con respecto al estudio realizado por Tenorio- Salgado en 2013 quienes enfrentaron a *Burkholderia* contra cuatro cepas diferentes de hongos, obtuvieron porcentajes mayores que fueron reportados desde un 6% hasta un 74%. Éste último mucho mayor a lo presentado en el presente trabajo contra *Rhizopus stolonifer*. Los resultados fueron obtenidos bajo la misma técnica. Recientemente Wu et al., 2020 enfrentaron a la bacteria *Paenibacillus polymyxa* CF05 contra *Rhizopus stolonifer* bajo la misma metodología y obtuvieron una inhibición eficaz de un 60.64 % a un 75.88 %, siendo estos porcentajes mayores a los obtenidos en nuestro caso utilizando a *Burkholderia sensu lato*. Entre los compuestos volátiles que reportan los autores el benzotiazol y el hidroxitolueno butilado mostraron la actividad inhibidora más eficaz contra *R. stolonifer*.

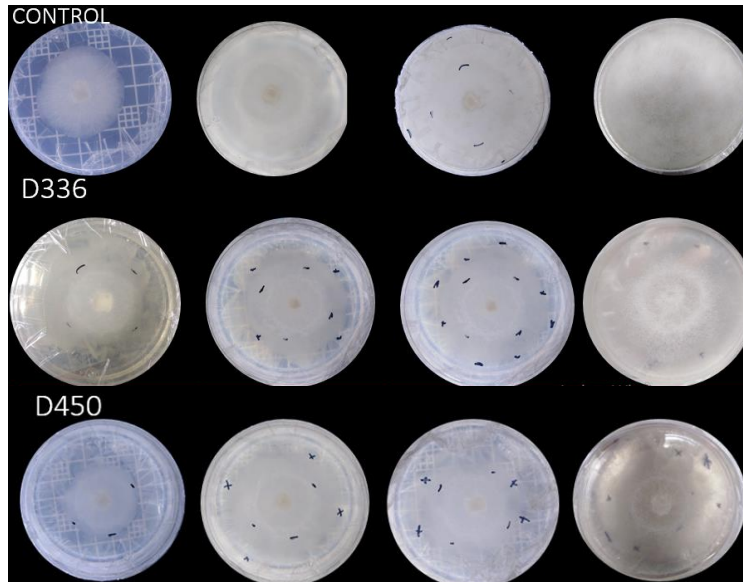


Fig. 17 Ensayo de compuestos volátiles, *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Se observan las dos cepas con mejores resultados en la inhibición del hongo y el control; el hongo fitopatógeno sin presencia de bacteria.

11.4.6 Ensayo de pozos

La técnica de difusión en pozos es un ensayo en el cual se evalúa la capacidad antagonista de los metabolitos secundarios producidos por la bacteria utilizando un volumen mayor del sobrenadante que contiene los compuestos antifúngicos producidos por la bacteria con actividad antagonista. Se utilizó un inóculo de 50 μL , corroborando la inhibición del crecimiento micelial del hongo, así como evidenciando afectaciones en las estructuras del mismo. En este ensayo se utilizaron cultivos de 72 h de incubación, dado que en un estudio previo Jiménez-Gómez en 2018 mostró que el efecto antagonista de las cepas del grupo de *Burkholderia sensu lato* frente a distintos hongos fitopatógenos fue mejor en un tiempo de incubación de 72 h y el efecto disminuyó en tiempos mayores. Las dos cepas evaluadas mostraron un efecto antagonista (fig. 18). Se muestran los

halos de inhibición obtenidos en placa estos fueron de 1.1 y 1.4 cm respectivamente (fig. 19).

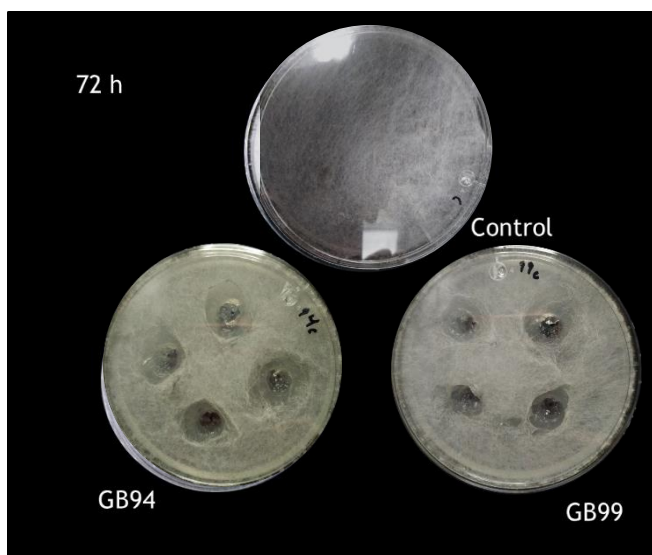


Fig. 18 Ensayo de pozos, *Rhizopus stolonifer* en presencia de metabolitos producidos por cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Se observan las dos cepas con mejores resultados en la inhibición del hongo y el control.

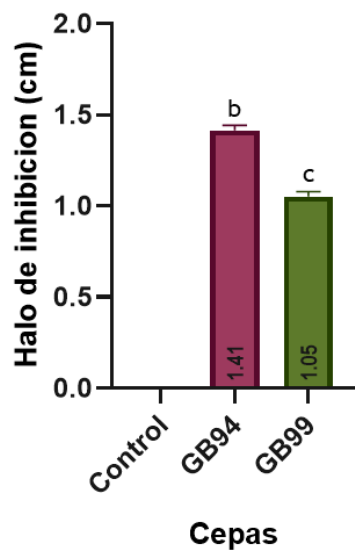


Fig. 19 Ensayo de difusión en pozos inactivados de *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica del halo de inhibición de *Rhizopus stolonifer* presentado bajo la metodología de pozos. Cada barra corresponde a la media obtenida (n=3), las barras de error corresponden al error estándar de la media. $p < 0.001$.

Estos resultados fueron consistentes con los mostrados en el ensayo de doble capa descrito anteriormente, en el cual se evidenció igualmente el efecto antagónico de las cepas GB94 y GB99. El halo en placa no se observó como se esperaba, es decir en la parte inferior de la placa que es en donde se siembra el hongo. No obstante, el efecto antagónico logró observarse en la parte superior de la placa, observándose una falta de crecimiento del micelio en el área del pozo y sobre esta. El micelio se expandió ya que crece desde la base de la placa y llega a invadir también la superficie interior de la placa superior (tapa). Por lo anterior, se recurrió a evaluar también el daño causado a estructuras del hongo *R. stolonifer*, a partir de tinciones con el método de cinta adhesiva. Se lograron observar daños en los esporangióforos y a nivel de los esporangios mostrados en la figura 20, Bowman et al., 2006 (Bowman & Free, 2006), indican que las estructuras del hongo dan protección y permiten la interacción del mismo con el medio, además como afirma Pontón en 2008 (Pontón, 2008), su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica. En literatura revisada no se encontró un ensayo similar para la búsqueda de un control de *Rhizopus stolonifer* bajo esta metodología.

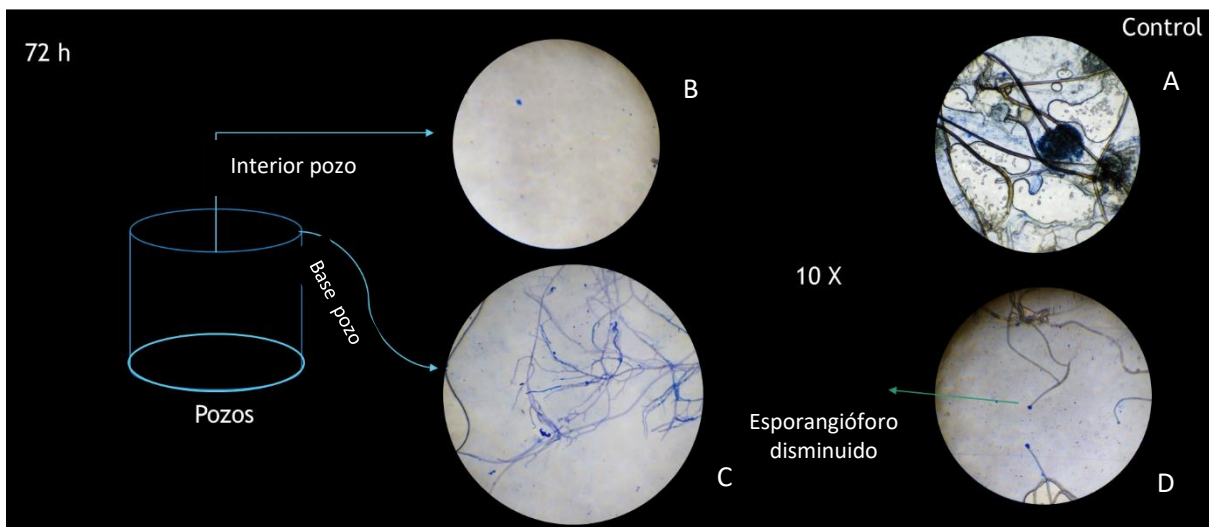


Fig. 20 Ensayo de pozos realizado en agar semisólido al 75% e incubado por 72 h. Microscopía de *Rhizopus stolonifer* en presencia de metabolitos producidos por cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Se observan daños en estructuras (C, D), el interior del pozo sin crecimiento alguno (B) y el control; el hongo fitopatógeno sin presencia de bacteria(A) Observación con un aumento total de 100x.

11.5 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico

11.5.1 Inhibición del crecimiento micelial

Se realizó un cultivo del hongo *Rhizopus stolonifer*, después de 72 h de crecimiento se sembró un cuadro de 1 cm² en agar PDA previamente preparado y esterilizado confrontando el crecimiento con un inóculo de 25 µL de las cepas GB94 Y GB99 a una concentración de 10⁷ UFC/mL en cinco puntos de 5 µL cada uno equidistantes al hongo, se utilizaron dichas cepas por haber sido las que obtuvieron mejor efecto antagónico bajo las metodologías utilizadas anteriormente. En la figura 21 se observa que las dos cepas mostraron un efecto antagónico, el crecimiento de *R. stolonifer* disminuyó considerablemente al enfrentarse y rodearse con los compuestos antifúngicos que secretó la bacteria. En contraste con el control el cual obtuvo un crecimiento radial en la placa de PDA de 8 cm, el crecimiento del hongo fue solo de 1.73 cm y 1.2 cm

respectivamente al encontrarse en contacto con la bacteria antagonista. Los resultados obtenidos después de un periodo de 72 h, en porcentaje de inhibición fue del 87.50 % para la cepa GB99 y de 92.15% presentado por la cepa GB94, estos resultados pueden observarse en la figura 22.

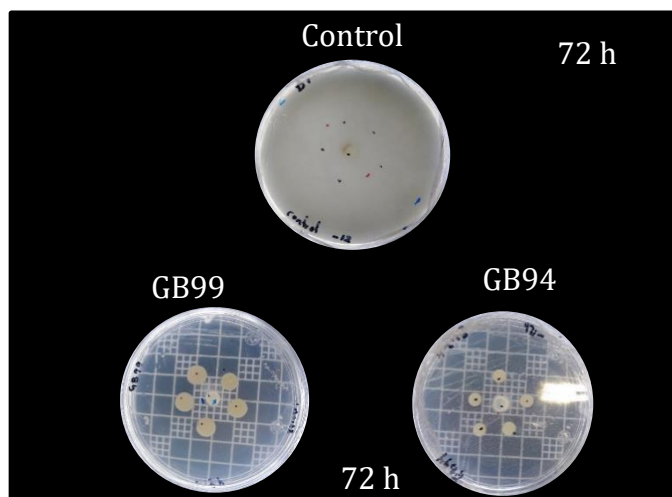


Fig. 21 Inhibición de crecimiento micelial en agar PDA de *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Placas con crecimiento frente a GB94 y GB99, control: hongo fitopatógeno sin presencia de bacteria.

En un estudio experimental reportado por Qin *et al.*, en el año 2004 (Qin, Tian, & Xu, 2004) mostró que *Pichia membranefaciens*, una levadura, era efectiva en un 65% para controlar el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*. Estos resultados fueron obtenidos utilizando una metodología similar y el potencial antagónico en el caso de la levadura fue atribuido a la competencia por nutrientes. Sin embargo, a bajas temperaturas se suprimía el crecimiento de la bacteria antagonista y por tanto el efecto se perdía. Los porcentajes obtenidos en nuestro ensayo bajo esta metodología (inhibición simultánea) son mayores a los obtenidos por Zhang *et al.*, en 2007 (H. Zhang, Zheng, Wang, Li, & Liu, 2007). Ellos obtuvieron un porcentaje del 80% empleando al hongo *Cryptococcus laurentii* contra *Rhizopus stolonifer* bajo la misma metodología. Zhao *et al.*, en

2008 (Lin et al., 2019) mostraron un posible efecto de competencia por los nutrientes al confrontar a otra levadura, *P. guilliermondii*, contra *Rhizopus stolonifer* en un estudio *in vivo* obteniendo un porcentaje de inhibición de 40 %, representando menos del 50% en comparación con las cepas GB94 y GB99.

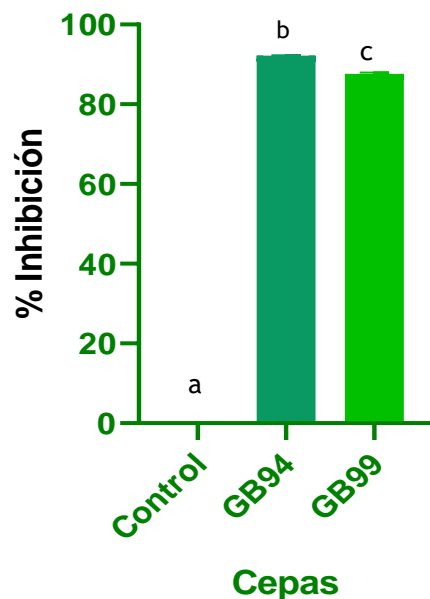


Fig. 22 Ensayo dual desfasado *Burkholderia sensu lato* vs *Rhizopus stolonifer*. Gráfica de porcentaje de inhibición presentados por las cepas con mayor efecto en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*, a las 72h con respecto al control. $p < 0.0001$.

11.5.2 Inhibición de la esporulación

El resultado del número de esporas del control fue de 2.26×10^{10} esporas/mL. Una vez enfrentado el hongo a las cepas elegidas (GB99 y GB94), se obtuvieron conteos de 1.2×10^7 y 2.5×10^7 esporas/mL respectivamente, reflejando tres órdenes de magnitud por debajo del control, y por lo tanto disminuye drásticamente su viabilidad cuando se enfrenta a los metabolitos secundarios producidos por ambas cepas (Tabla 3). Se analizaron los resultados por

ANOVA de una vía y los resultados fueron graficados para una mejor visualización (fig. 23). Estos resultados ayudan a dilucidar un daño evidente y determinante en el desarrollo del hongo, ya que significa que hay esporangios vacíos o bien un defecto en las estructuras reproductivas del hongo. Solo sobrevivió el 0.05 % de esporas en presencia de la cepa GB94, y del 0.11% en el caso de la cepa GB99. Al encontrarse dramáticamente disminuido el número de esporas se puede inferir que la cantidad de esporangiosporas producidas será mucho menor. Es decir, si hay un número menor de esporangiosporas habrá menos hongos que puedan desarrollarse para infectar al fruto, impactando directamente en la población del fitopatógeno. Ello constituye un punto clave en cuanto a su capacidad de desarrollar la podredumbre en poscosecha, disminuyendo la posibilidad de infección. En un estudio realizado en el año 2009 por Armenta Reyes *et al.* (Angulo-escalante et al., 2009), se menciona una disminución en el número de esporas de *Rhizopus stolonifer* al enfrentarse con extractos naturales de semillas de *Swietenia humilis* Zucc, una especie de árbol de la familia Meliaceae. Sin embargo, no menciona un número determinado por lo que no se podría comparar si es un número mayor o menor que el obtenido por las cepas GB99 y GB94. En este estudio sugieren que el extracto metanólico de las semillas de *Swietenia humilis* contiene diversos limonoides a los que se les puede atribuir el efecto fungicida. En 2011 Zhou *et al.*, estudiaron el efecto de *Bacillus subtilis* frente a *Rhizopus stolonifer* reportando un efecto antagónico por parte de la cepa bacteriana. Entre sus resultados reportan una inhibición en la esporulación de 65.24 %. Sin embargo el mecanismo de acción antagónico no es dilucidado en dicho trabajo de investigación. Por otra parte, el porcentaje reportado del antagonismo a *Rhizopus stolonifer* dado por *Bacillus subtilis* es menor al obtenido en este ensayo bajo la misma metodología utilizando las cepas bacterianas de *Burkholderia sensu lato*.

Tabla 3 Inhibición de esporulación del hongo *Rhizopus stolonifer* por acción de cepas bacterianas de *Burkholderia sensu lato*

Tratamiento	Cuantificación (esporas/ml)
Control	2.26 x 10 ¹⁰ esporas/mL
GB94	1.2 x 10 ⁷ esporas/mL
GB99	2.5 x 10 ⁷ esporas/mL

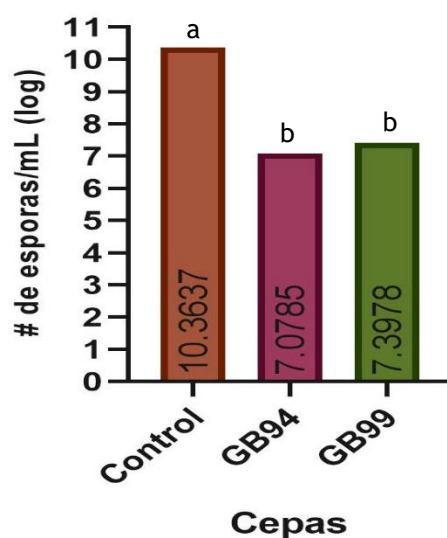


Fig. 23 Gráfica de inhibición de esporulación de *Rhizopus stolonifer*, presentados por las cepas GB94 y GB99, a las 72 h con respecto al control. Cada barra corresponde a la media obtenida (n=3), las barras de error corresponden al error estándar de la media. p<0.001.

11.5.3 Identificación de esporangios alterados

Se observaron las muestras con un aumento total de 100X y se encontraron disminuciones en el tamaño de esporangios y esporangióforos con respecto al control (fig. 24). También se lograron observar daños en el esporangióforo los cuales en contraste con el control presentaba una aparente lisis. En cuanto a los rizoides, la estructura de anclaje al sustrato, mostraban menor tamaño y número. Los daños se traducen en una complicación para la colonización del hongo

fitopatógeno y su sobrevivencia en el medio. Se encontraron esporangios vacíos, lo que contrasta con los resultados en el conteo del número de esporas realizado con anterioridad. En un estudio de investigación realizado por Tang et al., en 2014 (Tang et al., 2014) se reportan daños estructurales a *Rhizopus stolonifer*, provocados por la exposición del hongo fitopatógeno desarrollado en presencia de *Bacillus subtilis*. En este artículo se mencionan daños como degradación de las hifas refiriéndose especialmente a necrosis y lisis de las mismas, sus resultados fueron obtenidos con ayuda de técnicas como SEM y TEM.

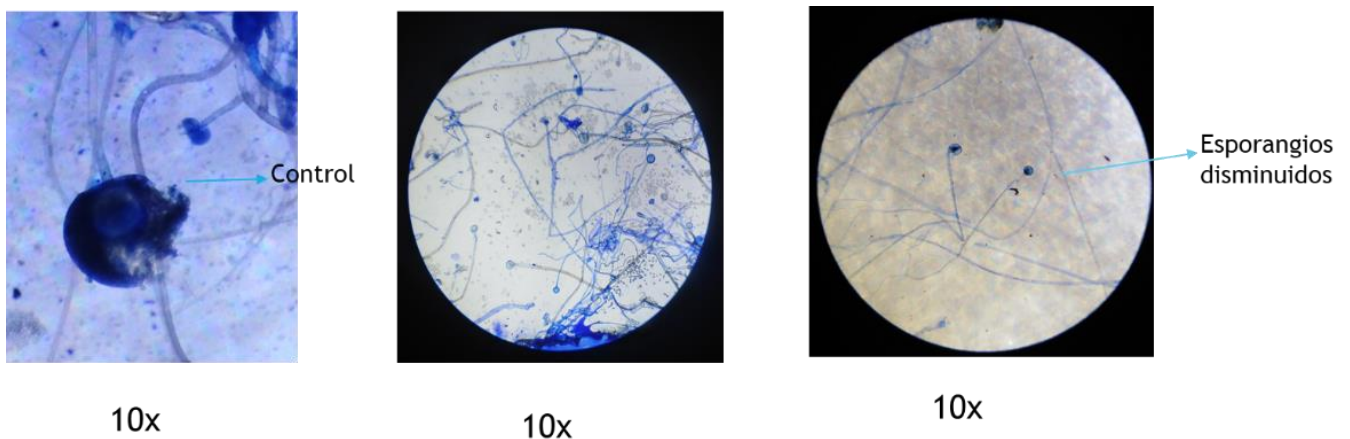


Fig. 24 Daños a estructuras de *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*. Observadas bajo microscopio con un aumento total de 100x, se observan principalmente esporangios disminuidos.

Otro hallazgo importante fue la formación de Zigosporas, las cuales son desarrolladas por el hongo cuando este se encuentra en condiciones de estrés. Para los fines de este ensayo estas estructuras resultan ventajosas si se toma en cuenta que cuando se desarrollan esporangios cada una de estas estructuras contiene cerca de treinta mil esporangiosporas mientras que los zigosporangios

solo desarrollan una, disminuyendo de manera importante la población resultante (fig. 25)

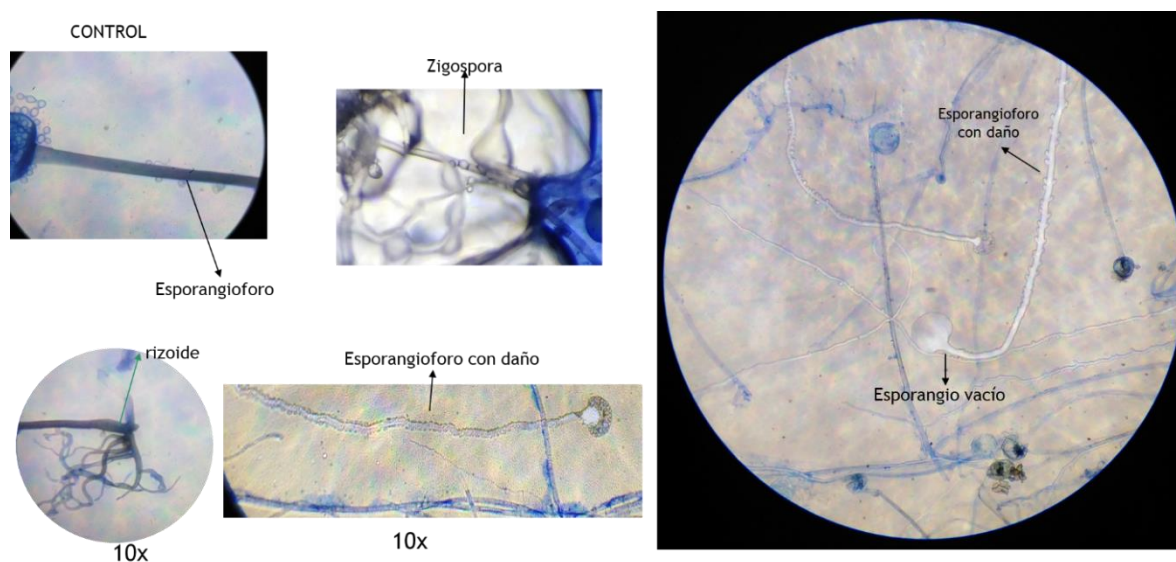


Fig. 25 Daños en estructuras de *Rhizopus stolonifer* en presencia de cepas bacterianas del grupo de *Burkholderia sensu lato*; se observan daños en rizoides, y esporangióforos, así como esporangios vacíos y presencia de Zigosporas. Imágenes tomadas bajo un objetivo 10x, aumento total de 100x.

Por medio del uso de una cámara digital (Moticam[®]) se logró obtener el tamaño relativo de las estructuras sobre todo esporangios. Se observó una disminución en su tamaño; el control midió 140 μm lo que concuerda con datos reportados por Zheng *et al.*, 2007 (Zheng, Chen, Huang, & Liu, 2007) , mientras que los que habían sido enfrentados con las bacterias disminuyeron su tamaño hasta 7 μm , lo que representa una disminución en el tamaño de hasta un 95% (fig. 26). En esta disminución también está implicada la falta de desarrollo de las estructuras como los esporangios que sostienen al esporangioforo, y por ende un desarrollo defectuoso en estructuras como la columnela. Esta disminución en el tamaño de las estructuras es mucho mayor a la reportada por Angulo-Escalante en 2009 (Angulo-escalante *et al.*, 2009) el cual obtuvo una

disminución del tamaño de los esporangios de hasta 110 μm al enfrentar extractos naturales de caoba contra *Rhizopus stolonifer*.

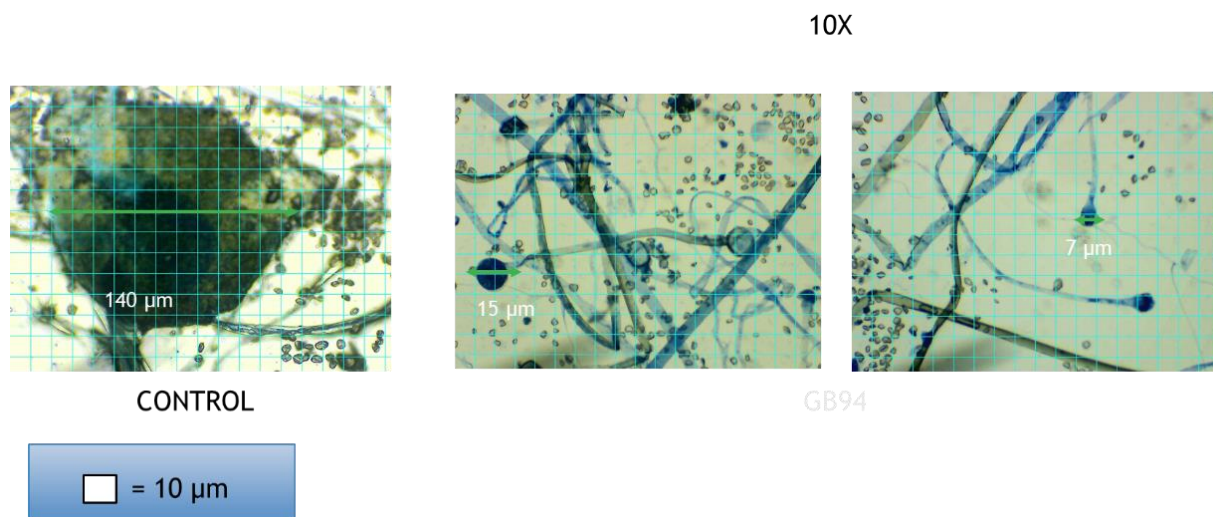


Fig. 26 Tamaño de esporangios de *Rhizopus stolonifer*, imágenes tomadas con ayuda de una cámara Moticam. Imagen de esporangio control comparado con esporangios que se desarrollaron en presencia de *Burkholderia sensu lato*, imágenes tomadas bajo un objetivo 10x, con un aumento total de 100x.

12.-CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se evidenció bajo distintas metodologías que el 58% de las 12 cepas probadas pertenecientes al género *Burkholderia* sp. tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*. Las cepas GB94 y GB99 mostraron mayor inhibición, manteniendo su potencial antagónico aun sin la confrontación directa con el hongo fitopatógeno. Esta inhibición aumentó cuando el tiempo de incubación de la bacteria se aumentó 24 h.

Es importante mencionar que al enfrentar al hongo fitopatógeno con las cepas de mayor potencial antagónico hubo una disminución en la esporulación. Así mismo, se lograron identificar importantes daños en estructuras de desarrollo del hongo como los esporangios, los cuales se vieron disminuidos y algunos se encontraron vacíos lo que contrastó con la disminución en el conteo de número

de esporas. Con base en este estudio se llega a evidencia de que las dos cepas bacterianas del grupo *Burkholderia sensu lato*, GB94 y GB99 presentan potencial antagónico significativo contra el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Sin embargo, hace falta realizar ensayos *in vivo* para complementar el presente trabajo.

13.- PERSPECTIVAS

1. Realizar la identificación molecular del hongo *Rhizopus stolonifer* para confirmar la identificación macro y microscópica del aislamiento obtenido.
2. Llevar a cabo ensayos *in vivo* en tomates utilizando los metabolitos producidos por la cepa seleccionada, así como controles positivos, pudiendo ser o un antifúngico químico y un antifúngico de origen biológico, para evaluar la eficiencia antifúngica.
3. Efectuar la purificación e identificación metabolitos producidos por las cepas bacterianas que presentaron mayor potencial antagónico bajo las diferentes metodologías utilizadas por medio de técnicas tales como espectroscopía infrarroja (IR), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) entre otras.
4. Una vez identificados dichos metabolitos, pudiera realizarse una optimización del medio de cultivo para aumentar la producción de dichos metabolitos.

REFERENCIAS

- Abdelmalek, G. A., & Salaheldin, T. A. (2016). Silver Nanoparticles as a Potent Fungicide for Citrus Phytopathogenic Fungi. *Journal of Nanomedicine Research*, 3(5). <https://doi.org/10.15406/jnmr.2016.03.00065>
- Adaskaveg, J.E., Förster, H., and Sommer, N. F. 2002. (2002). *Tecnología poscosecha de cultivos hortícolas*. (A. Kader, Ed.). Oakland, California, Estados Unidos.
- Agrios, N. G. (2004). Plant pathology. *Elsevier*, 5–24.
- Angulo-escalante, M. Á., Armenta-reyes, E., García-, R. S., Carrillo-fasio, J. A., Salazar-villa, E., Valdéz-, J. B., ... Antifúngica, A. (2009). Extracts of *Swietenia humilis* Zucc . Seed with Antifungal Activity in *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb .: Fr .) Vuill . *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 27, n2, 84–92.
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Consciene*, 1(1), 82–89. <https://doi.org/1870-557X>
- Bautista, B. S. (2006). ENFERMEDADES POSTCOSECHA EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS : USO DE MICROORGANISMOS HORTICULTURAL COMMODITIES : USE OF MICROORGANISMS ANTAGONIST. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 8, 1–6.
- Bernal, A., Martínez, I., Díaz, M., Herrera, L., & Martínez, B. (2006). Empleo de cepas de bacterias antagonistas en el control de *Stemphylium solani* Webber en tomate bajo cultivo protegido. *Centro Agricola*, (3), 37–40.
- Bernal, R. (2010). *Enfermedades del tomate (Lycopersicum esculentum Mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión*. (Vol. 4).
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* UNA BACTERIA CON GRAN POTENCIAL PARA SU USO EN LA AGRICULTURA. *Tip*, 19(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Bournaud, C., Moulin, L., Cnockaert, M., Faria, S. De, Prin, Y., Severac, D., & Vandamme, P. (2018). *Paraburkholderia piptadeniae* sp . nov . and *Paraburkholderia ribeironis* sp . nov ., two root-nodulating symbiotic

- species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(May), 432–440. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001648>
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1984). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 166–168.
- Cabrefiga, J., Badosa, E., Francés, J., Bonaterra, A., Moreno, M. C., & Montesinos, E. (2006). Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*, 39(3), 299–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.002>
- Castillo, F. S., & Moreno-Pérez, E. C. (2009). Producción de jitomate hidropónico bajo invernadero en un sistema de dosel en forma de escalera. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(120), 67–73. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v15n1/v15n1a10.pdf>
- Cervantes, A. I. (2016). *Instituto de ciencias*. Benemerita Universidad Autonoma de Puebla.
- FAO. (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Retrieved October 14, 2019, from <http://www.fao.org/home/es/>
- Felice, D. V. de, Solfrizzo, M., Curtis, F. de, Visconti, A., Cicco, V. de, Castoria, R., ... de Cicco, V. (2007). *Aureobasidium pullulans* strains degrade ochratoxin A in vitro and protect wine grape from ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius*. *Bulletin OILB/SROP*, 30(6(1)), 203–207.
- FIRA. (2017). *Panorama agroalimentario*. Retrieved from www.diees/fira.gob.mx
- Gryganskyi, A. P., Golan, J., Dolatabadi, S., Mondo, S., Idnurm, A., Muszewska, A., ... Stajich, J. E. (2018). Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus Species*. *Genes, Genomes, Enetics*, 8(June), 2007–2018. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200235>
- Hartanti, A. T., Rahayu, G., & Hidayat, I. (2015). *Rhizopus Species* from Fresh Tempeh Collected from Several Regions in Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.004>

- INTA. (2018). Instituto Nacional de Tecnología Agrícola. Retrieved from <http://www.fao.org/family-farming/detail/es/c/288306/>
- Jiménez-Gómez, I. (2018). *Búsqueda y evaluación de antifúngicos producidos por el género Burkholderia dirigidos contra hongos patógenos en cultivo de café*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Kim, J. Do, Park, M. Y., Jeon, B. J., & Kim, B. S. (2019). Disease control efficacy of 32,33-didehydroroflamycoin produced by *Streptomyces rectiviolaceus* strain DY46 against gray mold of tomato fruit. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49779-6>
- Lin, F., Xue, Y., Huang, Z., Jiang, M., Lu, F., Bie, X., ... Lu, Z. (2019). Bacillomycin D inhibits growth of *Rhizopus stolonifer* and induces defense-related mechanism in cherry tomato. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7663–7674. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09991-w>
- LPSN. (n.d.). *Burkholderia pseudomallei*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-pseudomallei>
- LPSN. (1994). *Burkholderia glumae*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-glumae>
- LPSN. (2002). *Burkholderia anthina*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-anthina>
- LPSN. (2004). *Burkholderia tropica*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-tropica>
- LPSN. (2007). *Burkholderia rhizoxinica*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-rhizoxinica>
- LPSN. (2008a). *Burkholderia diffusa*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-diffusa>
- LPSN. (2008b). *Burkholderia latens*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-latens>
- LPSN. (2009). *Burkholderia lata*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-lata>
- LPSN. (2020). *Burkholderia cepacia*. Retrieved from <https://lpsn.dsmz.de/species/burkholderia-cepacia>
- María, A., Hernández, A., Leticia, L., Necha, B., Niurka, A., Lauzardo, H., &

- Velázquez, G. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb .: Fr .) Vuill ., agente causal de la pudrición blanda del tomate Antifungal activity of chitosan and essential oils on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb .: Fr .) Vuill. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(December 2011), 127–134.
- Martínez, J. R., Vicente, A. A., César, J., & Saenz, M. (2012). Un tesoro perecedero en México : el tomate , tecnologías para prolongar su vida de anaquel 1 A perishable treasure in Mexico: tomato , technologies to prolong its shelf- life. *Investigacion y Ciencia*, 54, 57–63.
- Navarro Garcia, A., & Barba Navarro, S. (1996). Comportamiento De Los Plaguicidas En El Medio Ambiente. *Hojas Divulgadoras*, 95(9), 28. Retrieved from http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1995_09.pdf
- Northover, J., & Zhou, T. (2002). Control of *rhizopus rot* of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(2), 144–153. <https://doi.org/10.1080/07060660309506989>
- Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1), 53–61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00523-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00523-2)
- Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp . causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31, 531–548.
- Pérez-y-terrón, R., Gonzalez-montfort, T. S., & Muñoz-rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1, 53–60.
- Pérez-y-Terrón, R., Gonzalez-Montfort, T. S., & Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82.

[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70024-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70024-x)

Pue, s d. (2018). Sintesis agropecuaria de puebla, pp. 1–5. Retrieved from <http://www.sicde.gob.mx>

Qin, G., Tian, S., & Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 51–58. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00130-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00130-3)

Rios, O. O., & Chavez, S. J. (2014). TRADITIONAL PRODUCTION AND DIVERSITY OF NATIVE TOMATO (*Solanum lycopersicum L.*): A STUDY CASE IN TEHUANTEPEC-JUCHITÁN, MÉXICO. *ASyD*, 11, 35–51.

SAGARPA. (2005). *Características de calidad del tomate*.

SAGARPA. (2017a). *Planeacion agricola nacional*. Retrieved from www.sagarpa.gob

SAGARPA. (2017b). Secretaria de Agricultura y Desarrollo Social. Retrieved October 27, 2019, from <https://www.gob.mx/agricultura>

SAGARPA. (2018). Tomate rojo (Jitomate).

Santos, P. E. L., Rojas-rojas, F. U., Tapia-garcía, E. Y., Vásquez-murrieta, M. S., & Hirsch, A. M. (2016). To split or not to split : an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology*, 66, 1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1183-1>

Sañudo, G., Salazar, G. C., Betancourth, C., & Castillo, M. A. (2013). EFECTO DE CONTROLADORES BIOLÓGICOS SOBRE EL NEMATODO *Meloidogyne spp* EN LULO (*Solanum quitoense Lam*) EFFECT OF BIOLOGICAL CONTROL IN NEMATODE *Meloidogyne spp* IN LULO (*Solanum quitoense Lam*). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 29(July 2016), 81–92.

Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Pathogens*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>

Schafer, W. (1994). MOLECULAR MECHANISMS OF FUNGAL PATHOGENICITY TO PLANTS, 32, 461–477.

Smith, R. L., Ceazan, M. L., & Brooks, M. H. (1994). Autotrophic, hydrogen-

- oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1949–1955. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.1949-1955.1994>
- Suthar, K. P., Patel, R. M., Singh, D., & Khunt, M. D. (2017). Efficacy of *Bacillus subtilis* isolate K18 against chickpea wilt *Fusarium* Efficacy of *Bacillus subtilis* Isolate K18 Against Chickpea Wilt *Fusarium oxysporum* F. Sp. ciceri. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(June), 838–843. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.2646> ISSN:
- Tang, Q., Bie, X., Lu, Z., Lv, F., Tao, Y., & Qu, X. (2014). Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Microbiology*, 52(8), 675–680. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3605-3>
- Tenorio-salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-duhalt, R., Perez-rueda, E., Tinoco, R., Vazquez-duhalt, R., ... Perez-rueda, E. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 5979(4), 238–242. <https://doi.org/10.4161/bioe.23808>
- Toledo, Y., Hernández, A., Alvarez, M., Martín, G., & Várquez, R. (2002). DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE UN BIOPREPARADO A PARTIR DE UNA CEPA DE *Burkholderia cepacia* ANTE *Fusarium sp* EN EL CULTIVO DEL GLADIOLO (*Gladiolus sp*). *Cultivos Tropicales*, 23(4), 11–15. <https://doi.org/10.1234/ct.v23i4.641>
- Torres, E., Iannacone, J., & Gomez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, 67(1), 169–178. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100021>
- Vágvölgyi, C., Heinrich, H., Ács, K., & Papp, T. (2004). Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Netherlands*, 86, 181–188.
- Vallejo-Cohen, S., Vargas-arispuro, I., Corrales-Maldonado, C., & Martínez-Téllez, M. Á. (2005). Correlation between sulphur content and antifungal activity of varieties of *Brassica oleracea* L. for control of *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 23(January).

- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., & Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.002>
- Weinberg, J. (n.d.). Guía para las ONG sobre los plaguicidas peligrosos y el SAICM. Marco de acción para proteger la salud humana y el medio ambiente de los plaguicidas peligrosos, 42–57. Retrieved from http://www.ipen.org/sites/default/files/documents/ngo_guide_hazpest_sai cm-es.pdf
- Yao, W., Kong, J., Cheng, Y., Ju, J., Guo, Y., Qian, H., ... Quek, S. Y. (2019). Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes. *Food Chemistry*, 285(1800), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.099>
- Zhang, H., Zheng, X., Wang, L., Li, S., & Liu, R. (2007). Effect of yeast antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus rot* of strawberries. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 281–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.027>
- Zhang, S., Zheng, Q., Xu, B., & Liu, J. (2019). Identification of the fungal pathogens of postharvest disease on peach fruits and the control mechanisms of *bacillus subtilis* jk-14. *Toxins*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/toxins11060322>
- Zheng, R. Y., Chen, G. Q., Huang, H., & Liu, X. Y. (2007). A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*, 59(2), 273–372.

15.- ANEXOS

ANEXO I

Medios de cultivo utilizados:

LB	
Compuesto	Cantidad
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	7.5 g

MM9 modificado	
Compuesto	Cantidad
Citrato férrico (6g/l)	1 mL
Goodies	2.5 mL
Ácido succínico	0.05 g
Solución 10x M9	100 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O 1M	1 mL
Glicerol	5 mL
Agar	15 g
Goodies	
ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 mg
BO ₃ H ₃	300 mg
CoCl ₂	200 mg
CuCl ₂ H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ ·2 H ₂ O	30 mg
Solución 10X MM9	
Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

PDA	
Compuesto	Cantidad
PDA	39 g
NB	
Compuesto	Cantidad
Caldo nutritivo	8 g
Ácido succínico	0.08 g
Glicerol	10 mL

Avena	
Compuesto	Cantidad
Avena	3 g
Extracto de levadura	100 mg
Agar	7 g

V8	
Compuesto	Cantidad
Agua destilada	800 mL
Jugo V8	10 mL
Carbonato	2 g

Food rabbit	
Compuesto	Cantidad
Comida de conejo	25 g
Agar	15 g

ANEXO II

Características de cepas con mayor potencial antagónico

Cepa	Sitio geográfico	Origen	Clima	pH	Altitud (MSNM)	Id
GB94	Chignahuapan	Rizósfera de pino (<i>Pinus</i> spp.)	Templado subhúmedo	5.18	2290	<i>Burkholderia catarinensis</i>
GB99	Chignahuapan	Rizósfera de Maguey (<i>Agave</i> sp.)	Templado subhúmedo	5.88	2290	<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>

Tabla 4 Características de cepas Fuente: Cervantes-Álvarez 2016

GB94:

ACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGG
GCCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGA
CGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG
CAATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACITTTGTCCGGAAGAAAACCTTTGGGCTAATACCTTGAGGGGATGACGGT
ACCCGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
TGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
GGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCA
TGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTTA
GTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT
GGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTTCGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAA
AGAACCGGCGCACAGGTGTGCTGATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAG
TTGCTACGAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCGCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCATGGCCCTTATGGGTAGG
GCTTACACGTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGTCGCCAACCCGCGAGGGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAC
TCTGCAACTCGAGTGCCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCATGGGAGTG

GB99:

CGGCAGCAGGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCCTGTAGTGGGGATAGCCCGCGGAA
GCCGGATTAATACCGCATAACGATCTGCGGATGAAAGCGGGGATCCTTCGGGACTCGCGCTGCAGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CACITTTGTCCGGAAGAAAACCTTGGTTAATACCCGAGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGGCGAGGCGGTTCCGTAAGACAGATGTGAAATCCCCG
GGTTAACTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCGGGTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGA
TGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTGTGGGGATTCATTTCTTGTAGTAACTAGCTAAGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAG
TACGGTGCAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT
TACCTACCCTTGACATGGTTCGGAATCCCGCTGAGAGGTGGGAGTGTCTGAAAGAGAACCAGGGGACAGGTTGCTGATGGCTGTGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTTAAGGAGACTGCCGTTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGGTCCGC
AACCCGCGAGGGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCCTGGAAGTGGATCGCTAGTAAT

Fuente: Cervantes-Álvarez 2016

Protegiendo al jitomate: Biocontrol al día

Dulce Aldoé García-Nieto^{*1,2}, Vianey Marín-Cevada¹, Tlautoskalotl Montes-Reyes².

¹Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México. Edificio 103 J, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570. ²Facultad de Ciencias Químicas BUAP.

*Email autor correspondiente: dulkay.0492@gmail.com

Recibido: 15 diciembre 2019. **Aceptado:** 31 diciembre 2019

RESUMEN

La creciente actividad agrícola ha conllevado al uso de diferentes estrategias para el control de fitopatógenos que afectan, tanto al proceso de cosecha como a nivel de postcosecha. El jitomate es un fruto, que, debido a sus características, está expuesto a ser atacado por diversos agentes fitopatológicos (hongos, bacterias, nematodos, etc.) lo cual causa pérdidas importantes a nivel mundial. Sin embargo, los agentes químicos se han usado como una primera opción y el uso desmedido de estos ha dejado estragos en el medio ambiente, así como en la salud humana. Al conocer las consecuencias de esta sobreutilización de químicos, surge la necesidad de buscar alternativas que aseguren una protección a la agricultura, pero a su vez no tengan consecuencias sobre el medio ambiente. Esto ha impulsado la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas a agentes químicos. Alternativas de las cuales en los últimos años ha destacado el biocontrol. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende hacer una revisión de diferentes métodos de biocontrol, así como sus ventajas y microorganismos sobre los que actúan. Dejando a puerta abierta el desarrollo de nuevas estrategias que ayuden a la protección del jitomate.

Palabras clave: Biocontrol, fitopatógenos, agricultura, *Solanum lycopersicum*

ABSTRACT

The increasing agricultural activity has led to the use of different strategies for the control of phytopathogens that affect both the harvest process and the post harvest level. The tomato is a fruit, which, due to its characteristics, is exposed to being attacked by various