

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

TESIS

**“Compuestos orgánicos volátiles de *Burkholderia sensu lato* que
inhiben el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* patógeno de
frutos maduro”**

GRADO ACADÉMICO A OBTENER:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Con opción en Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:

Q.F.B. CECILIA PÉREZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

D. C. VIANEY MARÍN CEVADA

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D.C. LIDIA ESMERALDA GARCÍA DÍAZ

H. PUEBLA DE Z. A DICIEMBRE, 2023

Puebla, Pue. a 24 de noviembre 2023.

**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 **Cecilia Pérez González**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Compuestos orgánicos volátiles de *Burkholderia sensu lato* que inhiben el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* patógeno de frutos maduros”

A nuestro juicio, la alumna **Cecilia Pérez González** 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. Lidia Esmeralda García Díaz



D.C. Lucía Soto Urzúa



D.C. Ricardo Carreño López



D.C. Miguel Castañeda Lucio

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a toda mi familia. Principalmente, a mis padres que me han apoyado para alcanzar mis logros, por sus consejos, cariño incondicional, por enseñarme el sentido de la responsabilidad, el trabajo y perseverancia a lo largo de mi vida. Gracias por estar conmigo en los triunfos y también enseñarme a afrontar los fracasos y dificultades que se presentan en la vida.

A mis hermanos quienes me han apoyado en todo momento gracias por sus consejos y por ser mi ejemplo de trabajo y superación.

A mis sobrinos por su cariño incondicional y llenar mi vida de sonrisas.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, padre, hermanos, sobrinos y cuñadas por todo su apoyo, comprensión y cariño incondicional que siempre me han dado para cumplir mis objetivos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades este logro también es de ustedes.

A mi directora de tesis D. C. Vianey Marín Cevada por darme la oportunidad de trabajar con ella y formar parte de su equipo, le agradezco su apoyo, comprensión en todo momento, paciencia, experiencia transmitida y confianza dada a lo largo de este proceso.

A mi codirectora de tesis D.C. Lidia Esmeralda García Díaz por la oportunidad de trabajar con ella su paciencia, consejos, enseñanzas, tiempo y por compartir su conocimiento a lo largo de este trabajo.

A mi comité tutorial y revisor D.C. Lucia Soto Urzua, D.C Ricardo Carreño López y Miguel Castañeda Lucio por sus aportaciones, consejos, correcciones y asesoramiento.

A Cintia, Indi y Gris por las horas compartidas en el laboratorio que fueron un espacio agradable, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

A mis amigas y compañeras de generación Cinthya, Jearim por las vivencias, trabajos compartidos en clase y los momentos agradables durante este proceso.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico que me otorgó durante el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo prestado durante el desarrollo de esta Tesis.

Al Posgrado en Ciencias Microbiológicas por el apoyo económico otorgado para la terminación de esta tesis.

Al Laboratorio de Adsorción y Cromatografía del Centro de Química del ICUAP por las facilidades, asesoramiento y apoyo durante la realización de este proyecto de tesis.

A la Dra. María del Rayo Guevara Villa y Dra. María de la Paz Elizalde González por las facilidades, apoyo y trato amable durante el desarrollo de esta tesis.

¡A todos muchas gracias!

Ceci

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	ANTECEDENTES	3
4.	MARCO TEORICO.....	4
	<i>Tomate (Solanum lycopersicum L.)</i>	4
	<i>Importancia económica (mundial y en México)</i>	5
	<i>Perdida de alimentos postcosecha</i>	7
	<i>Rhizopus stolonifer: Ciclo de Vida y Mecanismos de Infección</i>	9
	<i>Mecanismos de control de Rhizopus stolonifer</i>	10
	<i>Compuestos Orgánicos Volátiles</i>	11
	<i>COVs producidos por géneros bacterianos</i>	11
	<i>Burkholderia sensu lato</i>	12
5.	JUSTIFICACIÓN.....	13
6.	OBJETIVO GENERAL.....	14
	<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	14
7.	FLUJO EXPERIMENTAL.....	15
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
	<i>Cepario Burkholderia sensu lato</i>	15
	<i>Reactivación de cepas</i>	16
	<i>Aislamiento del hongo fitopatígeno</i>	17
	<i>Purificación del hongo fitopatígeno</i>	17
	<i>Mantenimiento del hongo fitopatígeno</i>	17
	<i>Identificación microscópica</i>	18

<i>Identificación molecular del hongo fitopatógeno.....</i>	<i>18</i>
Extracción de ADN.....	18
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	18
Separación electroforética de los productos de la PCR.....	19
Purificación de los productos de PCR.....	19
<i>Pruebas de evaluación in vitro de la producción compuestos orgánicos volátiles.</i>	<i>20</i>
Ensayo doble placa.....	20
<i>Ensayo de germinación de esporas de Rhizopus stolonifer.</i>	<i>21</i>
<i>Detección e identificación de compuestos orgánicos volátiles.</i>	<i>23</i>
Microextracción en fase sólida (SPME).	23
<i>Ensayo de actividad antagonista in vitro de los antifúngicos sintetizados químicamente.</i>	<i>25</i>
<i>Inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42).</i>	<i>25</i>
<i>Análisis estadístico.</i>	<i>26</i>
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
<i>Aislamiento de hongo fitopatógeno Rhizopus stolonifer.....</i>	<i>27</i>
<i>Identificación microscópica del hongo fitopatógeno Rhizopus stolonifer.</i>	<i>27</i>
<i>Identificación molecular de Rhizopus stolonifer.....</i>	<i>28</i>
<i>Pruebas de evaluación in vitro de la producción compuestos orgánicos volátiles.</i>	<i>30</i>
Ensayo doble placa.....	30
<i>Pruebas de evaluación in vitro de la producción compuestos orgánicos volátiles.</i>	<i>32</i>
<i>Ensayo de germinación de esporas de Rhizopus stolonifer.</i>	<i>38</i>
<i>Detección e identificación de compuestos orgánicos volátiles.</i>	<i>42</i>
Identificación de compuestos orgánicos volátiles mediante estándar.....	42
<i>Ensayo de actividad antagonista in vitro de los antifúngicos sintetizados químicamente.</i>	<i>48</i>
<i>Inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42).</i>	<i>50</i>

10.	CONCLUSIÓN	52
11.	PERSPECTIVAS	52
12.	REFERENCIAS.	53
13.	ANEXOS.....	63
	<i>ANEXO I. Medios de cultivo.....</i>	<i>63</i>
	<i>ANEXO II. Secuencias Rhizopus stolonifer.</i>	<i>65</i>
	<i>ANEXO III. Procedimiento purificación de los productos de PCR.</i>	<i>66</i>
	<i>ANEXO IV. Dispositivo Microextracción en fase sólida (SPME)</i>	<i>66</i>
	<i>ANEXO V. Tabla de asimilación de compuestos reportados en la base de datos BAC DIVE</i>	<i>67</i>
	<i>ANEXO VI. Investigaciones realizadas o trabajos y publicaciones presentadas.</i>	<i>68</i>

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción/Rendimiento de Tomates frescos en el Mundo (total) B) Países con mayor producción de tomate.....	6
Figura 2.	Mecanismo de infección <i>Rhizopus stolonifer</i>	10
Figura 3.	Tomate infectado por hongo fitopatógeno <i>R. stolonifer</i>	17
Figura 4.	Diagrama esquemático de la estructura del ADNr de hongos y los sitios de los cebadores universales	18
Figura 5.	Condiciones de reacción para PCR de las regiones ITS, D1/D2.....	19
Figura 6.	Metodología ensayo en doble de COVs producidos por 13 cepas del grupo <i>Burkholderia</i> sensu lato vs <i>Rhizopus stolonifer</i>	21
Figura 7.	Metodología ensayo en doble placa para determinar germinación de esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i> después de la exposición a los COVs.....	22
Figura 8.	Esquema de las etapas de SPME- GC Q-ToF-MS para identificación COVs.	24
Figura 9.	Metodología actividad antagonista <i>in vitro</i> de antifúngicos sintetizados.	25
Figura 10.	Metodología inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42).	26
Figura 11.	Cultivo axénico <i>Rhizopus stolonifer</i> en medio PDA.	27
Figura 12.	Morfología de <i>Rhizopus stolonifer</i>	28
Figura 13.	Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR amplificación de regiones ITS, D1/D2.	29
Figura 14.	Árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML) que muestra las relaciones de aislamiento identificado basados en secuencias que amplifican el fragmento ITS y region D1/D2 del gen rDNA 18S con un Bootstrap de 1000 repeticiones.	30

Figura 15.	Crecimiento micelial aéreo de <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por cepa D336 a los 10 d después de la inoculación.....	33
Figura 16.	Crecimiento micelial aéreo de <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por cepa GA02 β a los 10 d después de la inoculación.....	34
Figura 17.	Porcentaje de inhibición crecimiento micelial aéreo de <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por cepa GA02 β a los 10 d después de la inoculación....	35
Figura 18.	Crecimiento micelial aéreo de <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por la cepa GB42 a los 10 días de la inoculación.....	36
Figura 19.	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>R. stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por las cepas GB42, D336, GA02 β a los 10 días de la inoculación.	37
Figura 20.	Cambios morfológicos evaluados en ensayos de doble placa tras 10 días de exposición a COVs producidos por cepas bacterianas GB42 sobre micelio de <i>R. stolonifer</i> , con tinción azul de lactofenol-algodón.....	38
Figura 21.	Crecimiento micelial aéreo de <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a COVs producidos por cepa GB42 a los 96h después de la inoculación.....	40
Figura 22.	Observación microscópica en cámara de newbauer de la cuantificación de esporas y cambios morfológicos sobre micelio <i>Rhizopus stolonifer</i>	41
Figura 23.	Cromatograma de los compuestos producidos por cepa GB42 en medio MM9 fructosa 3% a las 96h de incubación.	43
Figura 24.	Patrón de fragmentación compuestos orgánicos volátiles verificados por estándar.	45
Figura 25.	Biosíntesis de terpenos de la bacteria <i>Paraburkholderia phymatum</i> (KEGG).	47
Figura 26.	Inhibición del crecimiento micelial de <i>R. stolonifer</i> producidos por los compuestos α pineno, (S) (-) limoneno, 2-heptanona 2-nonanona.....	49

Figura 27. Cambios morfológicos en la estructura de <i>R. stolonifer</i> después de la exposición a los compuestos sintetizados..	50
Figura 28. Dispositivo para experimentación de COVs.	51

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Composición química del fruto tomate (%)	5
Tabla 2. Promedios entre grupos de productos básicos y regiones. Resultados del conjunto de datos sobre pérdida y desperdicio de alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura.	8
Tabla 3. Cepas reactivadas pertenecientes al cepario de <i>Burkholderia sensu lato</i> está conformado por 46 cepas obtenidos a partir de rizosfera.	16
Tabla 4. Porcentaje de inhibición a las 96h de exposición de COVs producidos por 13 cepas con potencial antifúngico evaluadas pertenecientes al género <i>Burkholderia sensu lato</i>	31
Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas <i>Rhizopus stolonifer</i> expuesto a los COVs producidos por la GB42.	40
Tabla 6. Lista de 14 compuestos orgánicos volátiles identificados mediante análisis SPME- GC Q-ToF-MS.	44

1. RESUMEN.

Rhizopus stolonifer es un hongo filamentoso y es considerado uno de los principales agentes causales de la pudrición, afectando a numerosas frutas y hortalizas postcosechadas. Este hongo crece rápidamente sobre la superficie de alimentos con una alta humedad, ricos en carbohidratos como las frutas y hortalizas. Es conocido por su rápida colonización de materiales orgánicos, especialmente alimentos como frutas, hortalizas, lo que puede resultar en la degradación y descomposición de estos productos; En el caso de los alimentos, secreta enzimas que descomponen los componentes orgánicos en formas más simples que el hongo puede absorber como nutrientes, y a menudo destruye los contenidos de productos envasados en pocos días mediante hidrólisis por su habilidad de destrucción de tejidos. Entre los productos con mayor afectación se encuentra el tomate variedad cherry (*Solanum lycopersicum*) y, por ende, conlleva a pérdidas económicas significativas.

El control de patógenos que afectan a frutos postcosechados es esencial para garantizar la calidad y la vida útil de los productos agrícolas. Durante los últimos años se han mitigado estas pérdidas con el uso de agroquímicos como fungicidas y pesticidas. Sin embargo, el abuso de estos deja residuos con efectos indeseados, como toxicidad y daños al medio ambiente y efectos negativos en la seguridad alimentaria; Por consiguiente, en el presente trabajo se evaluaron 13 cepas pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato capaces de afectar el crecimiento de *R. stolonifer* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles.

En este proyecto se propuso la producción de compuestos orgánicos volátiles de acuerdo a la disponibilidad de fuente de carbono tolerable para las bacterias en la que se demostró que la cepa GB 42 obtuvo una inhibición mayor significativa con respecto a las 13 cepas evaluadas y bajo la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) se adsorbieron dichos compuestos en los que posteriormente mediante cromatografía de gases acoplado a masas se detectaron e identificaron catorce compuestos de estos cuatro compuestos verificados por estándar demostraron tener con capacidad antifúngica (α -pineno, 2-heptanona, 2-nonanona, (S) (-) limoneno) mediante pruebas de evaluación *in vitro* de los compuestos sintetizados y se determinó la capacidad antifúngica del compuesto a diferentes concentraciones mostrando hasta un 100% de inhibición en crecimiento radial además se observaron daños estructurales sobre *R. stolonifer*.

2. INTRODUCCIÓN.

Rhizopus stolonifer es ampliamente reconocido como uno de los principales responsables de la descomposición, causando daños en una variedad considerable de frutas y verduras después de la cosecha. De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año (2019), se estima que, a nivel global, aproximadamente el 14% del valor económico de los alimentos producidos se pierde después de la cosecha, y una proporción significativa del 21.6% de estas pérdidas corresponde a frutas y hortalizas. Los microorganismos patógenos, insectos, roedores y aves son considerados los principales agentes que causan el deterioro de los productos almacenados postcosecha y pérdidas económicas millonarias (Agricultura, 2019). Por ende, para mejorar las tasas de rendimiento de la producción agrícola se ocupan más de 2 millones de toneladas de pesticidas químicos cada año en todo el mundo. Sin embargo, la actual preocupación sobre los posibles riesgos de los residuos de fungicidas ha originado el interés en la búsqueda de alternativas que comprende aplicaciones de productos naturales antifúngicos.

En general, *R. stolonifer* se controla mediante fungicidas sintéticos y recientemente se han reportado métodos no-convencionales como es el uso de microorganismos antagonistas, con el fin de disminuir la aplicación de fungicidas químicos para el manejo de este fitopatógeno (Bautista-Baños et al., 2014; Velázquez-del Valle et al., 2008). Las plantas tienen un sistema inmunológico innato único que les permite protección contra patógenos (Fang & Gu, 2021), a diferencia de la mayoría de los microorganismos que suelen carecer de sistema inmunológico por lo que han desarrollado la producción de metabolitos secundarios algunos de los cuales son secreción de sideróforos, antibióticos, antifúngicos y compuestos orgánicos volátiles (Bach, Passaglia, et al., 2022; Wu et al., 2020). En particular, los compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos (COVs) son sustancias químicas importantes que tienen la capacidad de difundirse a través de soluciones acuosas y no solo juegan un papel sobre el suelo sino también debajo de éste y generalmente, su producción puede variar según las condiciones del entorno, la humedad, la temperatura, el pH del medio de cultivo, la luz, los niveles de CO₂ y O₂, y el medio rico en nutrientes. La composición del medio de cultivo tiene una gran influencia tanto cualitativa como producción cuantitativa de metabolitos volátiles (Romoli et al., 2014).

Por otro lado, los metabolitos secundarios pertenecientes a cepas bacterianas del grupo *Burkholderia* sensu lato han sido frecuentemente involucrados en el control biológico de

varias enfermedades postcosecha de la fruta y se consideran unos de los más prometedores mostrando por la capacidad para producir varias enzimas hidrolíticas extracelulares (quitinasa, proteasa, celulasa, amilasa y glucanasa), metabolitos bioactivos (bacteriocinas, alcaloides, lipopéptidos y polipéptidos), utilizado eficazmente como agentes de control biológico en la agricultura (Bach, Passaglia, et al., 2022; Elshafie & Camele, 2021). Estudios recientes demostraron actividad antimicrobiana, por ejemplo, de una cepa identificada como *B. cenonceptacia* contra una amplia gama de hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora cactorum* (Chen et al., 2020).

Es por ello la importancia de identificar nuevas sustancias bioactivas que puedan ser empleadas para el control biológico.

3. ANTECEDENTES.

En 2013, Tenorio-Salgado y colaboradores evaluaron la actividad antagónica de 15 cepas de *Burkholderia tropica* (reclasificada como *Paraburkholderia tropica*) contra cuatro hongos fitopatógenos (*Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* y *Sclerotium rolfsii*). La inhibición radial obtenida varió de 6 a 74% en comparación con el control mediante ensayos dual de antagonismo en placa se puso en confrontamiento el hongo patógeno con la bacteria promoviendo la producción de compuestos orgánicos volátiles presente en el espacio cerrado de este ensayo. En otro reciente estudio, se identificaron los compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa *Burkholderia gladioli* BBB-01. Los más relevantes por su efecto antifúngico fueron identificados como disulfuros de dimetilo (DFM) y el 2,5-dimetilfurano (DMDS) (Chen et al., 2020). En nuestro grupo de trabajo se han realizado diversos estudios de antagonismo *in vitro* que han evidenciado bajo diferentes metodologías la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico por compuestos orgánicos volátiles emitidos por bacterias pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato las cuales tienen capacidad de inhibir el crecimiento de los siguientes hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y *Alternaria longissima*. Las cepas utilizadas pertenecen al cepario bacteriano conformado por 46 aislamientos ambientales, estas fueron aislados a partir de rizosfera de plantas silvestres y cultivos de interés agrícola procedente del Estado de

Puebla. Los ensayos antagónicos realizados con estos aislados contra hongos fitopatógenos han mostrado actividad antifúngica diversa: el crecimiento radial de *F. solani* (37% de las cepas), *F. oxysporum* (50 % de las cepas), *A. longissima* (45 % de las cepas) (Jiménez-Gómez, 2018). Con base a los resultados de Jiménez Gómez, se seleccionaron a las 12 cepas que mostraron una notable actividad antagónica y se observó que el 58% inhiben el crecimiento de *R. stolonifer* y en un rango del 35.8 a 72.6% inhiben el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (García Nieto, 2020; Islas Jiménez, 2021). Así mismo, también se exploró el papel antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por estas cepas. Jiménez Gómez reportó que tres cepas mostraron una inhibición del crecimiento radial del 6 % para el hongo *F. solani* y del 16% para *F. oxysporum* con respecto al control. Posteriormente, en otro estudio realizado por García Nieto (2020) se evaluó el crecimiento micelial del hongo *R. stolonifer* cuando se expuso a los compuestos orgánicos volátiles de doce aislados seleccionados y observó que el crecimiento de este hongo fue inhibido hasta en un 13.7% (García Nieto, 2020; Jiménez-Gómez, 2018).

4. MARCO TEORICO.

Tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más cruciales para la producción de hortalizas en todo el mundo. El tomate, originario de América del Sur, fue domesticado en México y luego llevado a España, Italia y otros países europeos. El cultivo de tomate crece rápidamente con un período de 90 a 150 días en zonas cálidas las temperaturas diarias ideales para el crecimiento son de 20 a 24°C y con una humedad relativa de 75%. Planta herbácea con un tallo largo, grueso y pubescente tiene un sistema radicular poco ramificado, pivotante y profundo. La planta no se sostiene por sí sola ya que el tallo principal está formado por tallos secundarios compuestos de epidermis con pelos glandulares, corteza, cilindro vascular y tejido medular. Las flores se encuentran agrupadas en inflorescencia de racimo o cimas racimosas (SAGARPA, 2017). Dentro de la composición química del tomate (tabla 1) se encuentra formado por 95 % de agua y un 5% por vitaminas y sales minerales que le dan un gran aporte nutrimental, esta baya tiene una variedad de colores que van del amarillento al rojo debido a la presencia de pigmentos de licopeno y caroteno en ella. El sabor es ligeramente ácido. La forma generalmente es redonda y aplanada (Blancard, 2011). El fruto generalmente es grande, aunque varía en

tamaño esto según su variedad algunas de ellas son: cocktail, liso, marmande, moneymaker, muchamiel, pometa, ramillete, san marzano, vemone y las más consumidas en México son: saladette o roma, pera, bola y cherry. Además, posee propiedades curativas como antiséptico, alcalinizante, depurativo, diurético, digestivo, laxante, desinflamatorio y remineralizante.

Tabla 1. Composición química del fruto tomate (%). (Adaptación de Blacard, 2011).

Compuesto	Porcentaje
Agua	95
Azúcares (glucosa, fructosa)	5
Ácidos (cítrico, málico)	
Sales minerales	
Pigmentos carotenoides: Pigmentos amarillo naranja (betacaroteno y provitamina A) o rojo (licopeno)	
Compuestos volátiles	
vitaminas Vitamina C (18 a 25mg/100 g de fruto fresco), B, K, E	

Importancia económica (mundial y en México).

En 2018, el mundo produjo un total de 868 millones de toneladas de frutas y 1089 millones de toneladas de verduras (FAOSTAT, 2023). Entre las principales verduras se encuentra el tomate su consumo aparente del 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 esto entre el 2007 y 2017. 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 (FIRA, 2019). Mientras la producción de tomate ha aumentado cada año de acuerdo con información de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la superficie cosechada de tomate a nivel mundial creció en el 2021 fue de más de 189 millones de toneladas en todo el mundo como se muestra en la figura 1A.

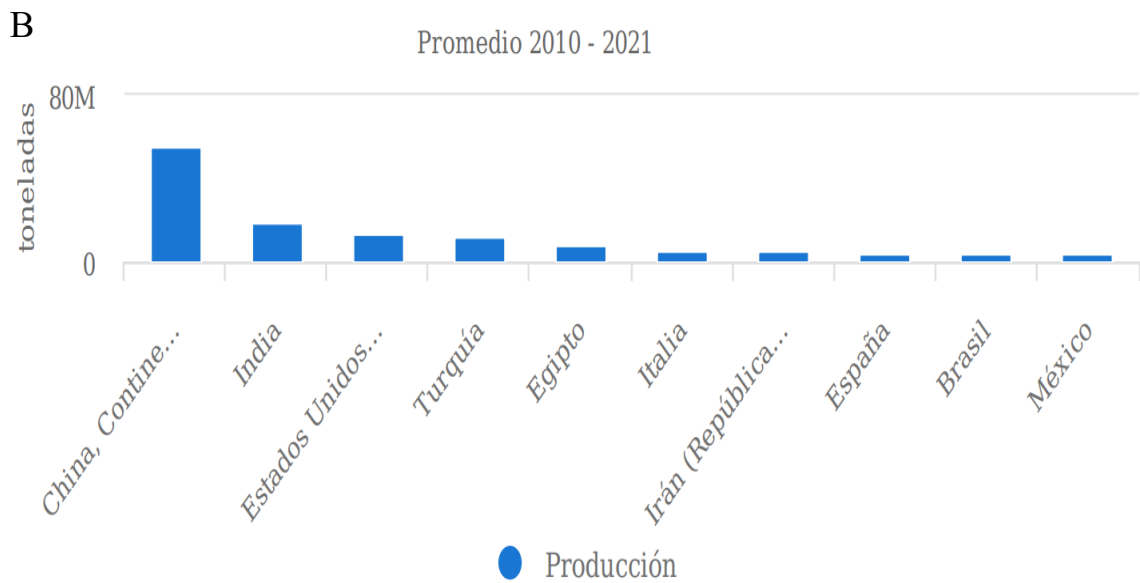
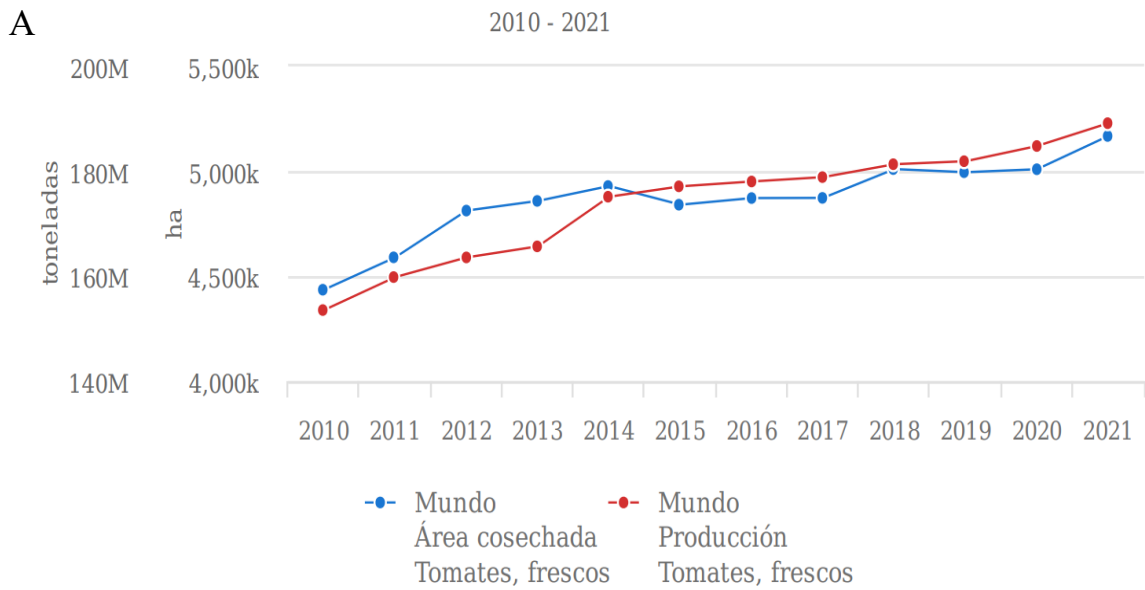


Figura 1. A) Producción/Rendimiento de Tomates frescos en el Mundo (total) B) Países con mayor producción de tomate. (Fuente: FAOSTAT)

Entre los diez principales países con mayor producción de tomate entre el 2017 y 2021 se encuentra México ubicado en la octava posición como figura 1B.

En México tomate (*Lycopersicon esculentum*) es el octavo cultivo más importante después del sorgo, según la producción en el 2021 fue de más 4 millones de toneladas (FAOSTAT, 2023) y representa un 3.46% del PIB agrícola nacional. Actualmente se satisface el 100% del requerimiento en el país y se exporta un 47.96% de la producción disponible esto según lo reportado por la SAGARPA en la planeación agrícola nacional (2017- 2030), una de las actividades más significativa es la exportación en 2021 logró ventas récord de casi un millón 730 mil toneladas y los cinco destinos más importantes de esta hortaliza son Estados Unidos, Canadá, Japón, Emiratos Árabes Unidos y Singapur (SIAP, 2022). Los estados principales de la república con la mayor producción de tomate en el ciclo otoño invierno siendo Sinaloa el principal estado productivo, con un volumen de producción 536,829 ton, aporta 62.2% de la producción nacional, seguido de Baja California Sur con 51,988, concentra 6.0%, Sonora 43,370 (5.0%) y Michoacán 36,855 (4.3%), estos cuatro estados aportan más de la mitad de la producción del país con 77.5% en el 2022.

Perdida de alimentos postcosecha.

A pesar de que cada año aumenta la demanda y producción de frutas y vegetales no todo el producto que se cultiva hoy en día llega al consumidor. Se estima que alrededor de 1/3 de los alimentos producidos para consumo humano se pierden cada año en todo el mundo, lo que equivale aproximadamente 1,300 millones de toneladas (Mayienga, 2021). En América del sur se pierden hasta un 24.3% para el caso de los vegetales y un 18% para las frutas (tabla 2). Según la FAOSTAT en el 2020 se perdieron 17 millones toneladas de tomate fresco en todo el mundo y en México 301 mil toneladas, estas pérdidas postcosecha pueden ser originadas por varios factores disminuyendo así la vida útil de estos productos algunos de ellos son provocados por daños mecánicos, insectos, roedores, aves y microorganismos patógenos.

Tabla 2. Promedios entre grupos de productos básicos y regiones. Resultados del conjunto de datos sobre pérdida y desperdicio de alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (Adaptación de Mayienga, 2021).

Índice de pérdida de alimentos en porcentaje (%)		
Región	Vegetales	Frutas
Caribe	9.9	10.1
América central	10	6.5
África oriental	2.1	1.8
Europa oriental	2.4	0.9
África del norte	N. D	1.5
América del norte	N. D	18
Europa del norte	13.3	N. D
América del sur	24.3	13.7
Asia sudoriental	N. D	N. D
Asia meridional	N. D	13.7
África occidental	N. D	N. D
Asia occidental	9.3	6.7
Europa occidental	12.5	13.5

N.D. No determinado

Dentro de los agentes patógenos que infectan al tomate se encuentran las llamadas bacterias de la pudrición blanda, las bacterias forman una película delgada y viscosa conocida como biopelícula o biofilm algunas de las bacterias que provocan esta enfermedad son *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Bacillus*.

Los hongos son unos de los principales microorganismos que provocan enfermedades postcosecha estos son considerados más difíciles de suprimir que las bacterias ya que producen esporas altamente resistentes a la sequedad y condiciones adversas ambientales algunos de los hongos que afectan el cultivo de tomate son: *Botitris cinérea*, *Geotrichum candidum*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium*, *Geotrich candidum*, *Mucor spp.*, *Penicillium spp.* *Rhizotecnia solani* y *Rhizopus stolonifer* (Mahovic et al., 2009).

***Rhizopus stolonifer*: Ciclo de Vida y Mecanismos de Infección.**

R. stolonifer pertenece a clase *Zygomycetes*, del orden *Mucorales*, de la familia *Mucoraceae*, del género *Rhizopus* y de la especie *R. stolonifer*. Es el agente causal de la enfermedad llamada pudrición blanda. Suele desarrollarse desde los 10 hasta 30°C siendo su temperatura óptima 25°C (Plascencia-Tenorio et al., 2012).

R. stolonifer puede reproducirse de forma sexual y asexual su reproducción sexual se presenta con la formación de esporangióforos, cuyos esporangios producen las esporangiosporas del mismo tipo de compatibilidad sexual. Cuando los esporangios maduran, sus paredes se rompen, liberando las esporangiosporas que posteriormente germinarán y darán origen en un nuevo grupo de hifas. Mientras que la reproducción asexual ocurre cuando los progametangios indicados como (+ / -) se fusionan y forman dos células apicales denominadas los gametangios estos se fusionan produciendo núcleos diploides esta célula multinucleada forma un zigosporangio que contiene una zigospora. Posteriormente ocurre la meiosis seguida de la germinación que ocurre mediante la ruptura de la pared del zigosporangio y emerge el esporangióforo a partir de la zigospora. En su extremo, el esporangióforo porta un esporangio que dará origen a esporas (dos SANTOS et al., 2019).

Las esporas de *R. stolonifer* favorecen la propagación en la atmósfera infectan los frutos adyacentes y se colonizan rápidamente, lo que resulta en pérdidas significativas de frutos maduros durante la postcosecha dado que en esta fase los productos sufren lesiones que permiten la entrada del hongo, envasado, almacenamiento y transporte (Wu et al., 2020; Alvarado Hernández, 2012). Este un hongo saprofito que crece rápidamente sobre la superficie de alimentos con una alta humedad, ricos en carbohidratos como las frutas y hortalizas, para que se produzca la infección, comúnmente requiere, entre otras, lesiones, grietas o heridas mecánica es un buen colonizador de plantas y de frutas en cosecha, destruyendo a menudo los contenidos de productos envasados en pocos días mediante hidrólisis por enzimas pectinasa y amilasa por habilidad de destrucción de tejidos (Camacho Téllez & Nieto Gómez, 2017). *R. stolonifer* continúa desarrollándose dentro de los tejidos formando rizoides de los que se sostiene los esporangióforos y en sus puntas se encuentran los esporangios los cuales alojan las esporangiosporas.

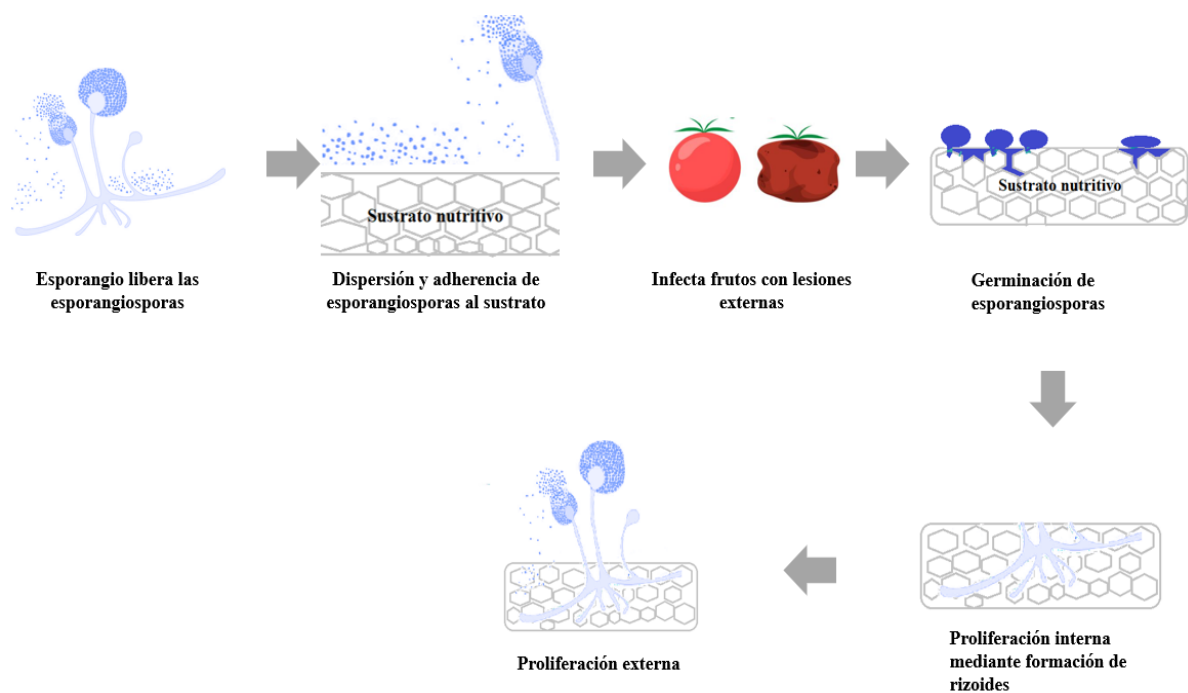


Figura 2. Mecanismo de infección *Rhizopus stolonifer* (Adaptación INTA, 2018).

Mecanismos de control de *Rhizopus stolonifer*.

La mayoría de las pudriciones del fruto después de la cosecha se pueden prevenir mediante la implementación de buenas prácticas agrícolas en el campo y durante la cosecha. Sin embargo las lluvias en épocas de otoño y el transporte suelen afectar negativamente al producto y lo hacen susceptible a la colonización por *R. stolonifer* es por ello que actualmente se utilizan diversos métodos para controlar este microorganismo el más utilizado es el uso de pesticidas químicos como son: bencimidazol (tiabendazol y benomilo) y azol (imazalil, propiconazol y tiocarbamatos) también el ortofenilfenol y su sal de sodio, el ortofenilfenato de sodio asimismo se utilizan desinfectantes como el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio (Bautista-Baños et al., 2014). Otros métodos son los cambios físicos ambientales constan de temperaturas moderadamente bajas así como el uso de atmósferas controladas en las que se utilizan atmósferas hipobáricas, otra alternativa es la radiaciones gama y luz UV, también se han implementado el uso de productos de origen vegetal como son los aceites esenciales y el quitosano estos han demostrado tener actividad antifúngica (Hernández-López et al., 2019; Velázquez-del Valle et al., 2008). Actualmente se han reportado el uso de antagonistas microbianos uno de los más utilizados es el uso de levaduras ya que colonizan rápidamente y sobreviven en la superficie del fruto así mismo el uso de bacterias es debido a su producción de

antibióticos, enzimas líticas, sideróforos y otros metabolitos secundarios (Velázquez-del Valle et al., 2008).

Compuestos Orgánicos Volátiles.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs), a veces llamados VOC (por sus siglas en inglés), son compuestos, que se convierten fácilmente en vapor o gas y que tienen a 20° C una presión de vapor igual o mayor a 0,01 kPas. El término COVs agrupa a una gran cantidad de tipos de compuestos químicos, entre los que se incluyen los hidrocarburos alifáticos y aromáticos (clorados o no), y otros compuestos como aldehídos, cetonas, éteres, ácidos y alcoholes (Sánchez Montero, 2009).

Los compuestos orgánicos volátiles en los últimos años han estado relacionados principalmente por su capacidad de actuar como sustancias precursoras en el proceso de formación de contaminantes fotoquímicos, dentro de los que se destaca el ozono troposférico. Además de los COVs producidos por la actividad humana, también hay COVs provenientes de fuentes naturales con aportes significativos de las plantas y el suelo. Los COVs naturales se conocen como compuestos orgánicos volátiles biogénicos (COVB), y algunos de estos compuestos son liberados por microorganismos y vegetación. Los COVB promueven el crecimiento vegetal, sirven como antibacterianos y antifúngicos he incluso protegen las plantas contra altas temperaturas. (Caicedo et al., 2010).

COVs producidos por géneros bacterianos.

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por microorganismos (s) son sustancias químicas importantes tienen la capacidad de difundirse a través de soluciones acuosas y no solo juega un papel sobre el suelo si no también debajo de éste. Los volátiles han resultado ser una rica fuente de nuevos ingredientes naturales, como son los volátiles de origen bacteriano, de modo similar a otros volátiles de origen biológico, también pueden servir como i) infoquímicos, ii) señalizadores celulares, iii) válvula de liberación de carbono y iv) promotores o inhibidores de crecimiento celular (Kai et al., 2016). La función de estos compuestos orgánicos volátiles no está completamente clara, recientemente Bach y colaboradores (2022) proponen que pudiesen ser considerados como un tipo de material de desecho, un sistema de desintoxicación de los organismos o la producción de metabolitos antagonistas para mejorar la competencia en ambientes

como el suelo y la rizosfera de las plantas. Por otro lado, los (s) pueden pertenecer a diferentes familias de sustancias químicas tales como alcoholes, ésteres, hidrocarburos, terpenos, cetonas, compuestos que contienen azufre y ácidos carboxílicos (Bach, Passaglia, et al., 2022; Elshafie et al., 2013). Generalmente, su producción puede variar según las condiciones del entorno, insumos, y a la dinámica de población y función. De igual modo, la humedad, la temperatura, el pH del sustrato, la luz, los niveles de CO₂ y O₂, y el medio rico en nutrientes. Romoli y colaboradores (2014) sugirieron que la composición del medio de cultivo tiene una gran influencia tanto cualitativa como producción cuantitativa de metabolitos volátiles (Romoli et al., 2014). En general, los medios ricos en nutrientes promueven grandes cantidades de metabolitos en comparación con medios pobres en nutrientes. Su trabajo experimental evidenció que las emisiones de COVs pueden depender de diferentes factores, como son: fase de crecimiento, subcomposición de los estratos y la forma en que los microorganismos utilizan diferentes nutrientes. En comparación con otros metabolitos secundarios de microorganismos, los COVs tienen propiedades deseables para transmitirse a largas distancias (aún en bajas concentraciones) y mediar interacciones entre organismos tales como bajo peso molecular, baja polaridad, lipofílicos, alta presión de vapor y bajo punto de ebullición; por esta razón, se han utilizado para el control biológico de enfermedades de las plantas (Kong et al., 2020). De hecho, en frutos como el durazno y el kiwi se han aplicado, incluso proporcionaron características sensoriales adicionales para el consumidor, contribuyendo al sabor y aroma característicos en determinados alimentos, compuestos como el etanol, el acetaldehído y la acetona son responsables del sabor agradable en los alimentos. Además, los metabolitos volátiles pueden influir positivamente en el olor, sabor, color y textura de las matrices de frutas y/o alimentos (Di Francesco et al., 2020). Algunos de los géneros de bacterias que producen COVs: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Collimonas*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*.

Burkholderia sensu lato.

Este grupo está formado por una colección de géneros estrechamente relacionados dentro de la familia *Burkholderiaceae* que incluye especies de importancia ambiental, industrial, biotecnológica y clínica. Se describen como bacilo recto, Gram negativo, catalasa y oxidasa positivos, movilidad variable con uno o varios flagelos polares estas bacterias son saprofitos. Este género puede dividirse actualmente en *Burkholderia sensu lato*

stricto, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia*, *Pararobbsia* *Mycetohabitans* y *Trinickia* (Bach, Sant'Anna, et al., 2022; Elshafie & Camele, 2021) y está conformada por más de 100 especies y se pueden encontrar en diferentes ambientes como el agua y el suelo también se ha observado que pueden establecer una relación beneficiosa con plantas como endófitos o desarrollando nódulos en leguminosas y algunas especies pueden ser patógenas para el ser humano, las plantas y animales.

Burkholderia sensu lato está implicado en la síntesis de metabolitos secundarios para desarrollo biotecnológico se producen en la fase de crecimiento exponencial o estacionario tardío y la mayoría se sintetizan de forma no ribosómica a través de maquinarias biosintéticas basadas en policétido sintasas y péptido-sintetasa no ribosómica (Bach, Passaglia, et al., 2022). Estos compuestos están relacionados con diversos mecanismos para la promoción del crecimiento de plantas, antimicrobianos (antibacterianos y antifúngicos), también se ha registrado incluso un compuesto que actúa de manera citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer (Xu et al., 2019).

Los antimicrobianos compuestos pueden ser heterociclos que contienen nitrógeno, polienos, sideróforos (compuestos quelantes de hierro), macrólidos, bacteriocinas, quinolonas y compuestos volátiles. Algunos de ellos actúan dirigiéndose a la pared celular, la membrana celular, la síntesis de ácidos grasos de membrana, la síntesis de proteínas, la degradación de proteínas y la inhibición enzimática (Rodríguez-Cisneros et al., 2023).

5. JUSTIFICACIÓN.

Hoy en día, se estima que las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas frescas son del 20% al 40% en todo el mundo, lo que genera una gran preocupación frente a la inminente demanda de alimento que se proyecta si se continúa bajo este esquema. Estos alimentos al ser perecederos después de su cosecha, y los daños mecánicos durante y después de la cosecha pueden resultar en su deterioro por microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Esta es una de las razones clave detrás de las pérdidas económicas globales del sector agrícola. Los fungicidas químicos se utilizan a menudo para evitar que los productos frescos se pudran después de la cosecha debido al crecimiento de los hongos. Sin embargo, se requieren de nuevas alternativas para estos agroquímicos, ya que su uso extenso y continuo genera un perjudicial impacto en el medio ambiente y la salud humana.

Una de las soluciones más prometedoras es el uso de microorganismo como agentes de control biológico de fitopatógenos. La producción de compuestos orgánicos volátiles es uno de los mecanismos microbianos poco explorado.

En el caso de prologar la vida de anaquel de frutas frescas, la aplicación de COVs en condiciones herméticas asegura una rápida saturación de la atmósfera y sugiere ser una estrategia con potencial para el control de hongos patógenos.

Rhizopus stolonifer es un hongo que causa pudrición en diversos frutos cosechados y genera grandes pérdidas económicas. Actualmente, la estrategia de control aplicada sobre este fitopatógeno es por medio de métodos convencionales.

La identificación de moléculas bioactivas, así como la interrelación dinámica en la que están involucradas, contribuirán al conocimiento y desarrollo de tecnologías que permitirán un mejor manejo y almacenamiento.

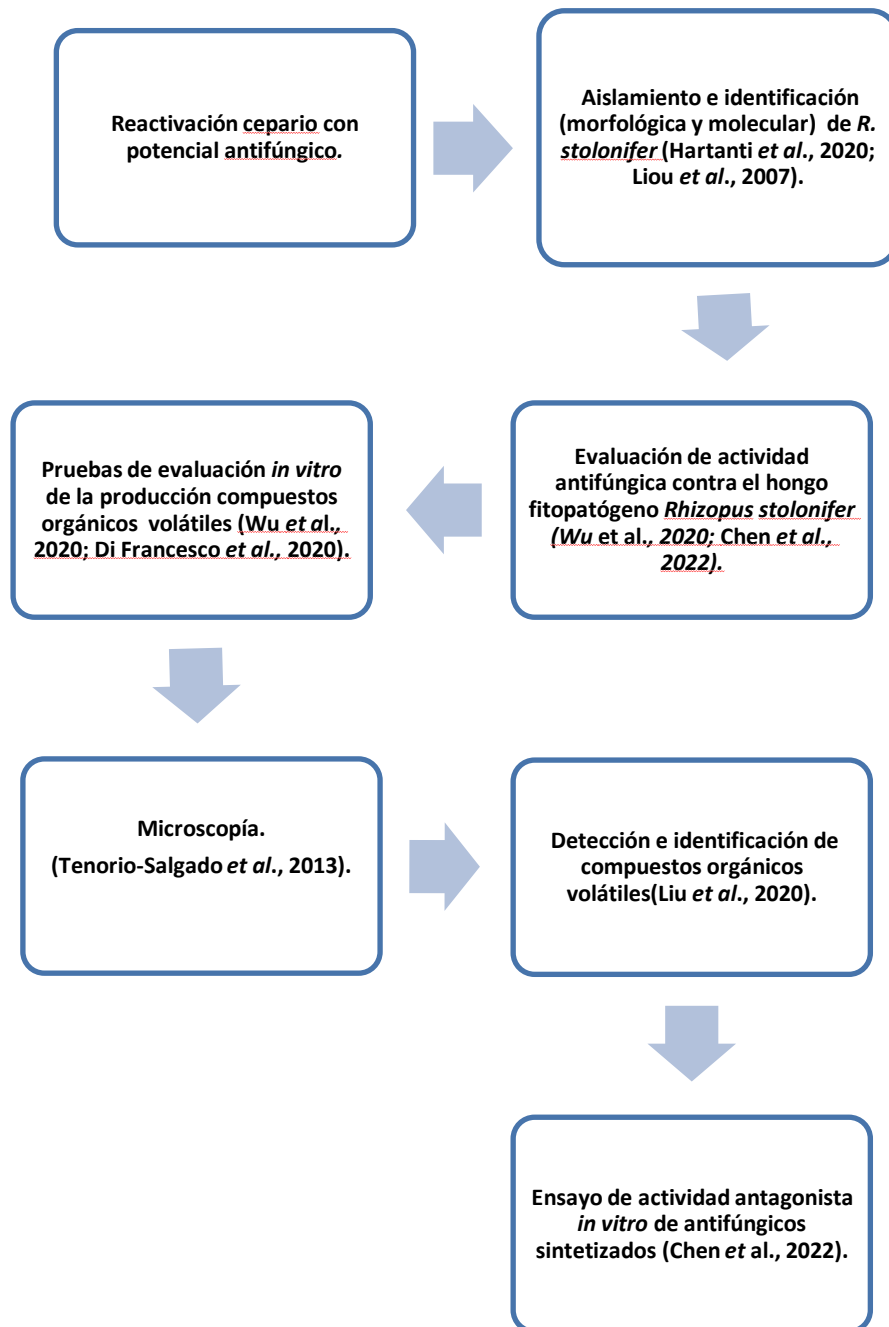
6. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antagonica de los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato sobre *Rhizopus stolonifer*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Aislar e identificar morfológica y molecularmente al agente causal de la pudrición blanda *Rhizopus stolonifer* a partir del fruto de jitomate.
- Evaluar *in vitro* el efecto de compuestos orgánicos volátiles producidos por aislados bacterianos del grupo *Burkholderia* sensu lato sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*.
- Identificar químicamente los compuestos orgánicos volátiles producidos por la(s) cepa(s) que mostraron mayor actividad antifúngica sobre *Rhizopus stolonifer*
- Evaluar la actividad antagonica *in vitro* de antifúngicos sintetizados sobre *Rhizopus stolonifer*.

7. FLUJO EXPERIMENTAL.



8. MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepario *Burkholderia sensu lato*.

El cepario de *Burkholderia sensu lato* está conformado por 46 cepas aisladas a partir de plantas silvestres y cultivos de interés agrícola procedente del Estado de Puebla e identificados mediante la secuenciación del gen 16S rDNA (Cervantes Álvarez, 2016; Vega Aguilar, 2015).

Tabla 3. Cepas reactivadas pertenecientes al cepario de *Burkholderia* sensu lato está conformado por 46 cepas obtenidos a partir de rizosfera (Merino Espinoza, 2020).

Reactivación de Cepas <i>Burkholderia</i> sensu lato				
CEPA	ZONA GEOGRÁFICA	ORIGEN	ESPECIE	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
GA 01	La Paz Toxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i>	99.86%
GA10	La Paz Toxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i>	99.93%
GB99	Chignahuapan	Rizosfera de pino (<i>Pinus sp.</i>)	<i>Paraburkholderia</i> <i>aromaticivorans.</i>	98.44%
GB94	Chignahuapan	Rizosfera de maguey (<i>Agave sp.</i>)	<i>Burkholderia</i> <i>catarinensis</i>	99.38%
D416	Cuetzalan	Rizosfera de ajo (<i>Allium sativaum</i>)	<i>Burkholderia</i> <i>contaminans</i>	99.71%
GB42	Chignahuapan	Rizosfera de helecho (<i>Filicopsida</i>)	<i>Paraburkholderia</i> <i>panacisoli</i>	98.98%
GB137	Chignahuapan	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia sp.</i>)	<i>Caballeronia terrestris</i>	99.41%
UAP7070	Loma Bonita, Oaxaca	Rizosfera de Bromelia (<i>Bromelia sp.</i>)	<i>Burkholderia gladioli</i>	100%
D336	Cuetzalan	Rizosfera de chile canario (<i>Capsicum pubescens</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.57%
GB33	Chignahuapan	Suelo de laguna/maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Paraburkholderia</i> <i>ginsengisoli</i>	99.57%
GA29	La Paz Toxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Burkholderia</i> <i>cenocepacia</i>	99.93%
GA06	La Paz Toxcolpan	Rizosfera de maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>Burkholderia gladioli</i>	100%
GA02 β	La Paz Toxcolpan	Rizosfera de leguminosa (<i>Fabaceae</i>)	<i>Burkholderia gladioli</i>	99.93%

Reactivación de cepas.

Se reactivaron las 13 cepas pertenecientes al cepario grupo *Burkholderia* sensu lato las cepas se encontraban conservadas en glicerol al 30% y almacenadas a -80°C. La reactivación se realizó en medio NB sólido y líquido para comprobar su viabilidad y pureza.

Aislamiento del hongo fitopatígeno.

Se colectaron tres frutos de tomate a exposición ambiental durante cinco días posteriormente a que presentaron síntomas de pudrición blanda ocasionada por *Rhizopus stolonifer*. Se tomó un solo esporangio a partir del fruto para colocarlas en placas Petri que contenían agar PDA y se incubaron por 72 h a 23-28 °C. (Tenorio-Salgado et al., 2013).



Figura 3. Tomate infectado por hongo fitopatígeno *R. stolonifer*. (Fuente: elaboración propia).

Purificación del hongo fitopatígeno.

Fue preparada una suspensión de esporas, agregando 5 mL de agua destilada estéril a una placa Petri con un cultivo con crecimiento previo de 72 h, se hizo un raspado superficial con la ayuda de un portaobjetos estéril, el micelio se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} para posteriormente sembrar en placa en agar PDA y obtener una colonia aislada, estas se incubaron por 48 h a 23-28 °C.

Mantenimiento del hongo fitopatígeno.

A partir de un cultivo de 96 h en medio PDA, se hizo un raspado con la ayuda de un portaobjetos estéril, se transfirió a un tubo Falcón de 50 mL que contenía 10 mL de medio Malta con glicerol al 30%, se almaceno a 8°C.

En tubos eppendorf de 1.5mL que contenían 1mL medio malta con glicerol al 30% se colocó un corte de 0.5 cm del micelio a partir de un cultivo de 96 h en medio PDA.

Identificación microscópica.

Se cultivaron las muestras durante un período de 48 horas. Para la tinción, se empleó azul de algodón siguiendo un procedimiento que consistió en la aplicación de una sola gota de este colorante. Utilizando un dispensador, se distribuyó uniformemente el colorante sobre la muestra. Luego, se cortó una tira de cinta adhesiva transparente y se colocó cuidadosamente sobre el cultivo. La cinta se extendió suavemente para asegurar una adecuada fijación de las estructuras.

Identificación molecular del hongo fitopatógeno.

Extracción de ADN.

Se inoculó un solo esporangio en agar PDA y se incubaron a 26 °C durante 3 y 6 días se realizó la extracción del ADN utilizando el Kit Zymo Research DNA.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación por PCR y secuenciación directa del ADN se realizó para dos regiones (figura 4). La región espaciadora interna transcrita (ITS) utilizando los cebadores ITS4-ITS5 (330 pb) las secuencias del set de cebadores son ITS-Forward (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'), ITS-Reverse (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') (Kang et al., 2018). La región D1/D2 de la subunidad 28S del LSU ADN ribosomal utilizando los cebadores NL1-NL4 (600 pb) las secuencias del set de cebadores son NL-Forward (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG AAG -3'), NL-Reverse (5'-GGT CCG TGT TTC AAG G -3') (Hartanti et al., 2020).

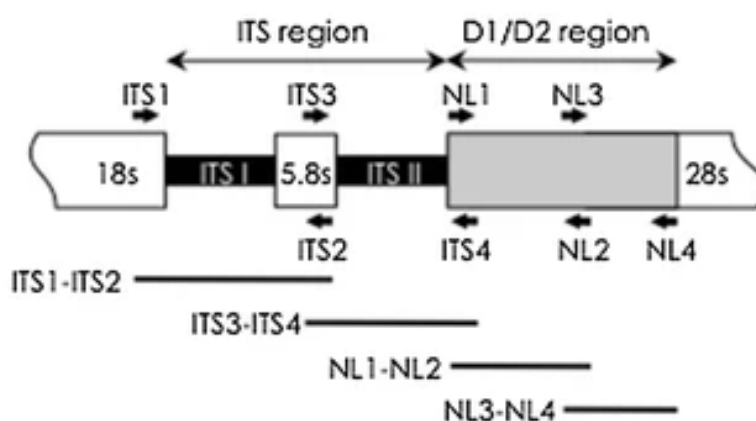


Figura 4. Diagrama esquemático de la estructura del ADNr de hongos y los sitios de los cebadores universales (Horisawa et al., 2013)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ambas regiones se realizó con un volumen total de 25 μ L y se agregó en un microtubo eppendorf 18.93 μ L de agua, 2.5 μ L de buffer, 0.38 μ L dNTPs, 0.94 μ L de primer R, 0.94 μ L primer F, 0.31 de Taq polimerasa y 1 μ L de DNA. En la figura 5 se muestran las condiciones de reacción.

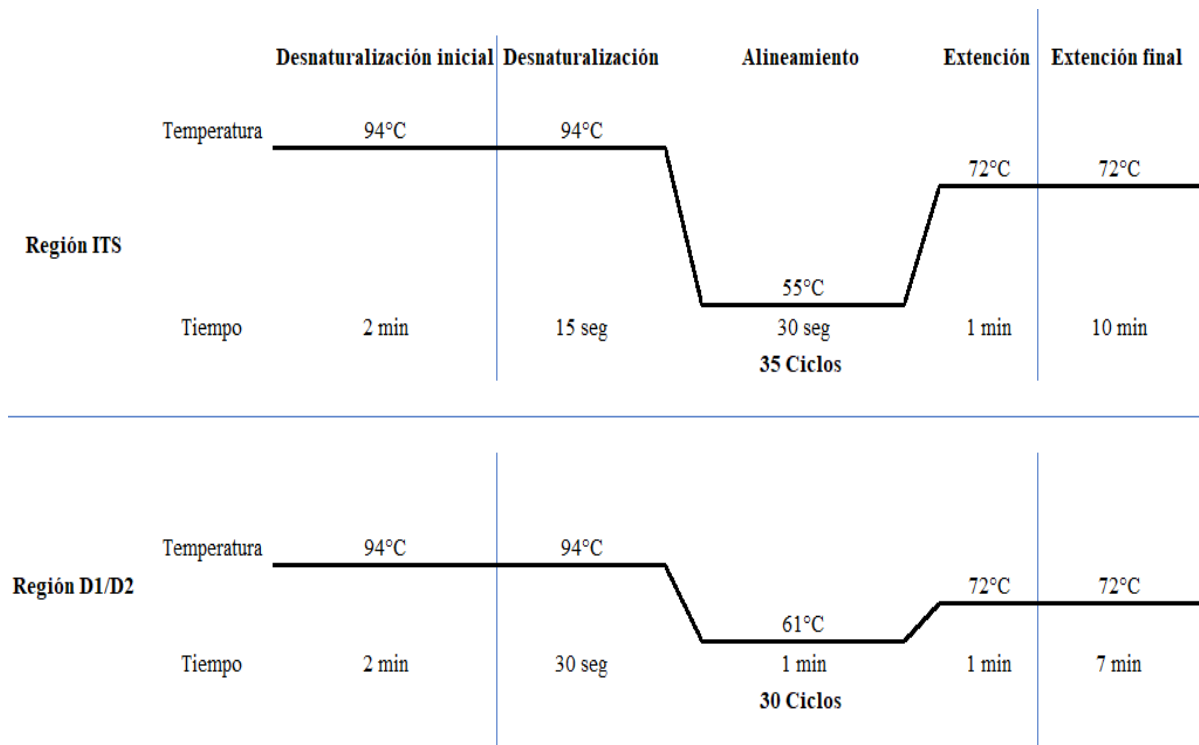


Figura 5. Condiciones de reacción para PCR de las regiones ITS, D1/D2 (Fuente: elaboración propia).

Separación electroforética de los productos de la PCR.

Los resultados de la PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% a 90 V durante 25 minutos y luego se tiñeron con bromuro de etidio durante 10 minutos. El gel se enjuagó con agua durante 10 min y se observó con luz ultravioleta. Se colocó un marcador de peso molecular de 100pb marca 5'BIO.

Purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron nuevamente amplificados obteniendo un volumen final de 50 μ L para posteriormente ser corroborado por medio de una electroforesis y los productos de PCR fueron purificados mediante el uso del kit ZYMON RESEARCH DNA

Clean & Concentrator-5, el procedimiento se encuentra en el anexo III. Se midió su concentración y calidad mediante un equipo nanodrop (NanoPhotometer™).

Finalmente, los productos de PCR se mandaron secuenciar a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Korea).

Las secuencias obtenidas se encuentran en el anexo II. Para analizar las secuencias de ambos fragmentos se utilizaron secuencias de la base de datos NCBI, se alinearon los fragmentos utilizando el programa BioEdit ver. 7.2 y se construyeron árboles filogenéticos para cada uno de los fragmentos utilizando el programa MEGA ver. 7.0, con el método de máxima verosimilitud (ML) con un Bootstrap de 1000 repeticiones, ambos árboles filogenéticos fueron analizados con respecto al aislado UAP202201 si se encuentra relacionado filogenéticamente con la especie *stolonifer* (Hartanti et al., 2020; Kang et al., 2018; Liou et al., 2007).

Pruebas de evaluación *in vitro* de la producción compuestos orgánicos volátiles.

Ensayo doble placa.

El efecto antifúngico ejercido por los producidos por cepas de *Burkholderia* sensu lato previamente seleccionadas se evaluó por un ensayo de confrontación entre ambos microorganismos. Se realizó una suspensión de células bacterianas (10^7 UFC/mL) y se rociaron 100 μ L en las placas de medio mínimo con las fuentes de carbono seleccionadas a diferentes concentraciones (fructosa, glicerol, xilosa) posteriormente fue distribuido con ayuda de un asa de Driglasky, se incubaron las placas por aproximadamente 12h y posteriormente de una placa con un cultivo previo de 72h se realizó un corte de 0,5cm de diámetro de *R. stolonifer* en el centro de la placa de PDA (Chen et al., 2020; Garbeva et al., 2014; Liu et al., 2020; Wu et al., 2020).

A continuación, se colocaron dos placas de cultivo frente a frente y se sellaron inmediatamente con doble capa de Parafilm®, se envolvió con plástico adherente y se incubaron a 26°C. El diámetro de la colonia se midió a 24, 48, 72, 96h y en algunos ensayos se extendió el tiempo de exposición hasta 10 días (Parra González et al., 2009; Yamada et al., 2018).

El efecto antagonista se evaluó calculando el porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula (Chen et al., 2022):

$$I (\%) = (1 - (T - D) / (C - D)) \times 100$$

donde I (%) es el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, C es el diámetro micelial del control, T es el diámetro micelial del tratamiento y D es el diámetro inicial del micelio. El experimento se realizó en repeticiones de tres por tratamiento.

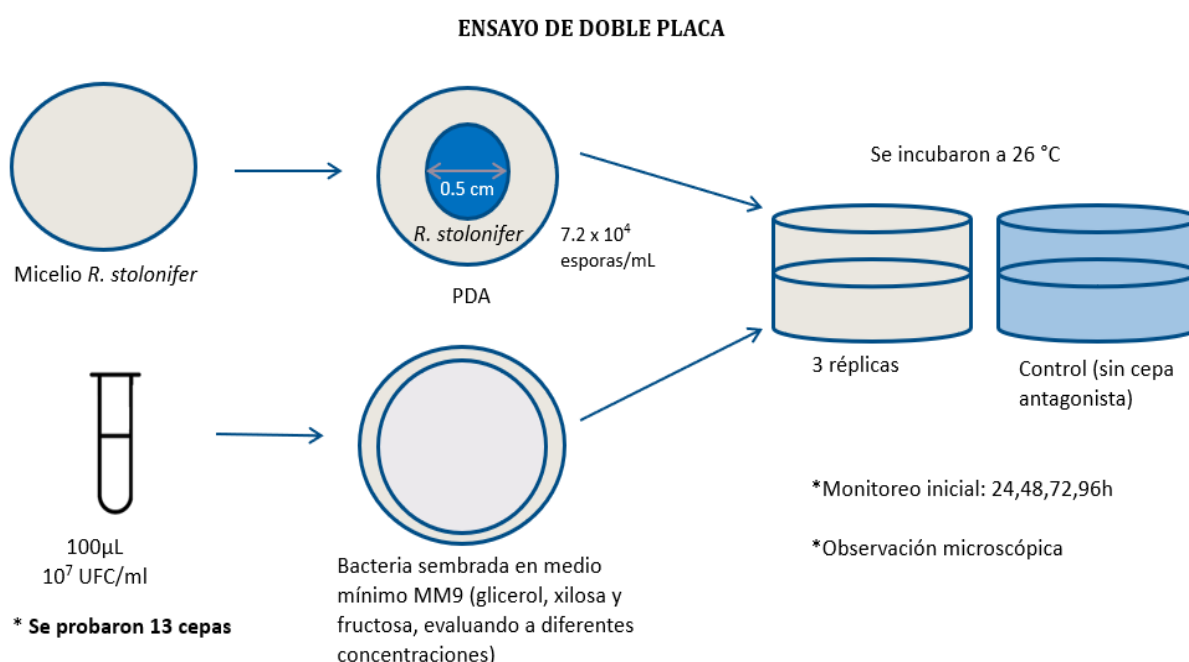


Figura 6. Metodología ensayo en doble de COVs producidos por 13 cepas del grupo *Burkholderia* sensu lato vs *Rhizopus stolonifer*. (Fuente: elaboración propia).

Ensayo de germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Se realizó una suspensión de células bacterianas (10⁸ UFC/mL) y se rociaron 100 µL en las placas de medio mínimo con las fuentes de carbono seleccionadas (fructosa 3%, xilosa 3%, glicerol 7.5%) en placas con división (fructosa 3% y glicerol 7.5%, xilosa 3% y glicerol 7.5%, fructosa 3% y xilosa 3%) posteriormente fue distribuido con ayuda de un asa de Driglasky, se incubaron las placas y posteriormente de una placa con un cultivo previo de 72h se realizó un raspado con portaobjetos estéril y se transfirió a un tubo

falcón de 50 mL que contenía 10mL de una solución agua estéril 0.05% Tween 80 se mezcló con ayuda de un agitador vórtex y se realizó una dilución para obtener una suspensión de esporas 10^3 esporas/mL se colocó 50 μ L en el centro de la placa de PDA (Di Francesco et al., 2020; Xie et al., 2020).

A continuación, se colocaron dos placas de cultivo frente a frente y se sellaron inmediatamente con doble capa de Parafilm® se envolvió con plástico adherente y se incubaron a 26°C. El diámetro de la colonia se midió a 24, 48, 72 hasta 96. Se realizaron los cálculos estadísticos y el porcentaje de inhibición (Wu et al., 2020).

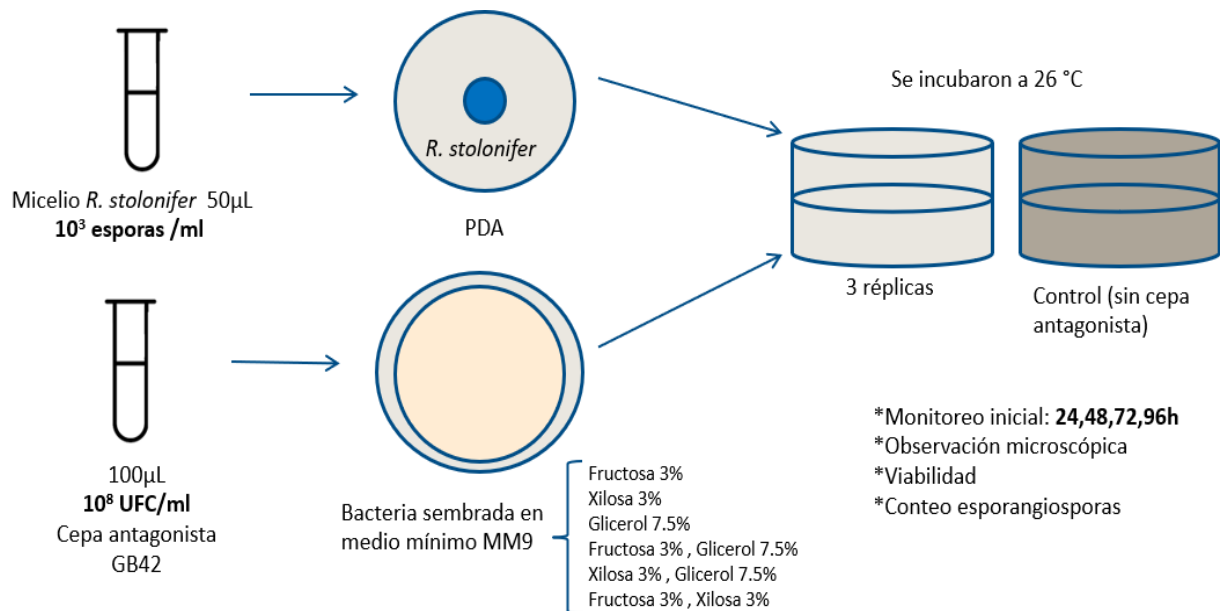


Figura 7. Metodología ensayo en doble placa para determinar germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer* después de la exposición a los COVs. (Fuente: elaboración propia).

Detección e identificación de compuestos orgánicos volátiles.

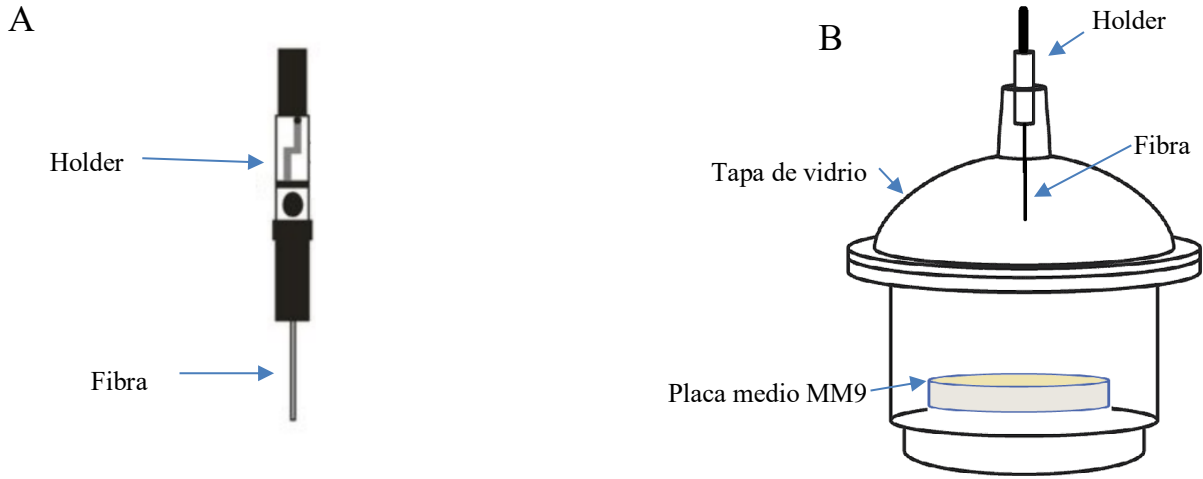
Microextracción en fase sólida (SPME).

La detección se realizó mediante el método de microextracción en fase sólida (SPME) (Anexo IV) este consiste en dos etapas: la primera es la adsorción de COVs que se realizó en dos experimentos, el primero con una placa con el medio MM9 con fuente de carbono fructosa al 3% y el segundo con el mismo medio inoculado con 100µL de una suspensión bacteriana con 10^7 UFC mL⁻¹ dentro de un dispositivo herméticamente cerrado. Se incubó a 26°C durante un periodo de 96 h en el que dos fibras fibra gris 50/30 µm divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) y fibra rosa 65 µm polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) fueron expuestas y pre-acondicionadas a una temperatura de 250°C durante 30min. Ambas fibras se expusieron durante periodos de 2, 4,12 h para la adsorción de los compuestos volátiles. Las fibras con los COVs retenidos se analizaron por cromatografía de gases, con la desorción de los COVs en el puerto de inyección del cromatógrafo a 250°C por 5 min como se muestra en la figura 8.

La separación y detección de los compuestos se realizó en el instrumento Agilent serie 7200 cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (GC Q-ToF-MS) con una columna capilar (RTX-5MS 5% Difenil/95% Dimetil polisiloxano) (30m, 0.25mmID, 0.25µm), usando como gas portador Helio 99% con un flujo de 1mL/min. El programa de inició en 40°C durante 5min, luego se elevó a 250°C a una velocidad de 4°C/min donde se mantuvo durante 5 min. Split 20:1, flujo de split 20mL/min (Groenhagen et al., 2013; Liu et al., 2020).

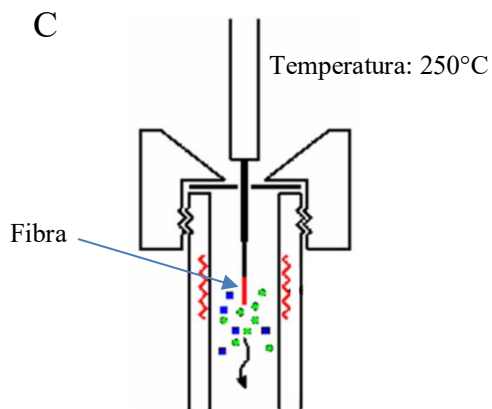
(SPME) Micro extracción en fase sólida.

Adsorción.



- 50/30 μm divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano
- 65 μm polidimetilsiloxano/divinilbenceno

Desorción Térmica.



Puerto de inyección de un cromatógrafo

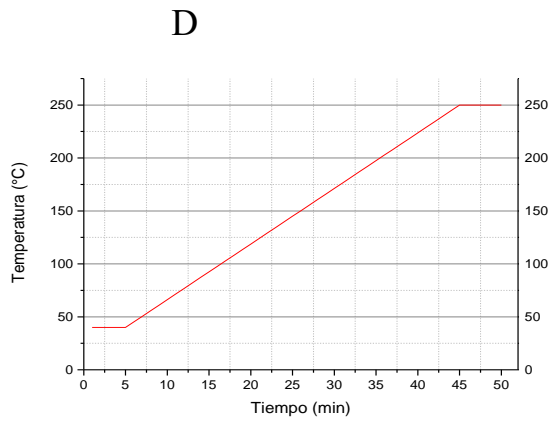


Figura 8. Esquema de las etapas de SPME- GC Q-ToF-MS para identificación COVs. A) Fibras para SPME para la adsorción de COVs; B) Dispositivo para adsorción de COVs; C) Proceso de desorción térmica; D) Programa de temperatura del horno GC Q-ToF-MS.

Ensayo de actividad antagonista *in vitro* de los antifúngicos sintetizados químicamente.

Los compuestos puros que se identificaron como producidos por la cepa GB42 mediante S GC Q-ToF-MS, se sometieron a prueba para determinar su capacidad antifúngica a diferentes concentraciones mediante un ensayo de doble placa en la placa de Petri superior, se colocaron 0,5mm de micelio de *R. stolonifer* en la placa de Petri superior y las alícuotas estándar puras de 5, 25, 50 μ L en papel de filtro, después las placas se colocaron cara a cara y se sellaron con una triple capa de Parafilm[®], se envolvieron con film transparente y se incubaron a 26°C. Se calculó el porcentaje de inhibición después de 96h, para el control el compuesto puro se sustituyó por agua (Chen et al., 2022; Gao et al., 2017; Zhang et al., 2020).

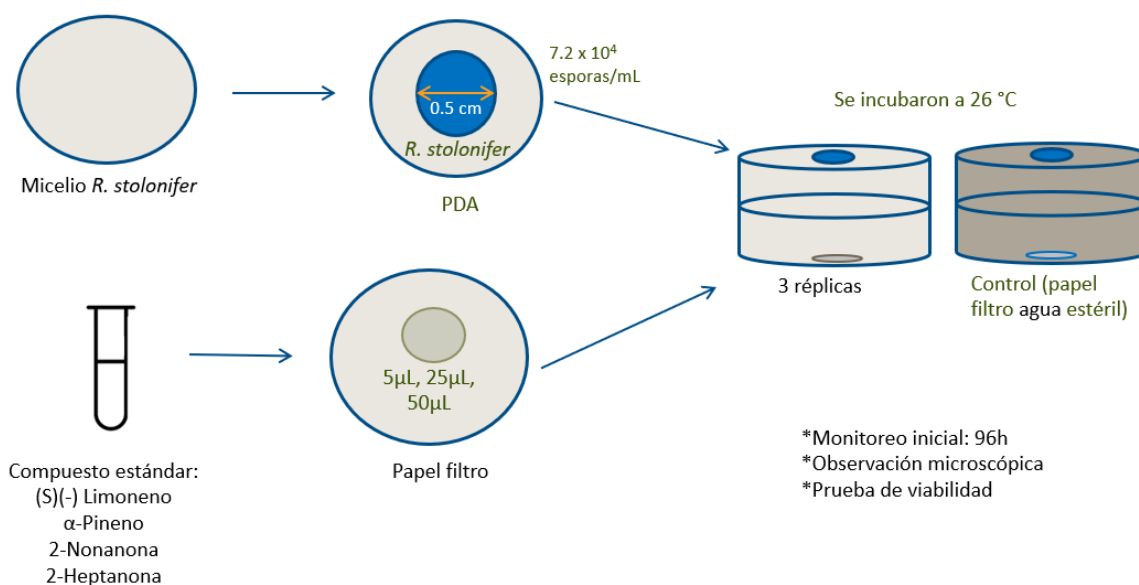


Figura 9. Metodología actividad antagonista *in vitro* de antifúngicos sintetizados (Fuente: elaboración propia).

Inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42).

Se realizó una suspensión de células bacterianas (10^8 UFC/mL) y se rociaron 100 μ L en las placas de medio mínimo con la fuente de carbono seleccionada (fructosa 3%) posteriormente fue distribuido con ayuda de un asa de Driglasky, se incubaron las placas y posteriormente de una placa con un cultivo previo de 72 h se realizó un raspado con portaobjetos estéril y se transfirió a un tubo falcón de 50 mL que contenía 10 mL de una

solución agua estéril 0.05% Tween 80 se mezcló con ayuda de un vortex y se realizó una dilución para obtener una suspensión de esporas 10^3 esporas/mL se colocó 20 μ L en el centro de la placa de PDA(Di Francesco et al., 2020).

Para cuantificación de esporas después de 96 h de exposición a los COVs el micelio transfirió a un tubo falcón de 50 mL que contenía 10mL de una solución agua estéril 0.05% Tween 80 se mezcló y posteriormente se observó en cámara de Neubauer con un microscopio óptico con objetivo 40X y realizamos observación microscópica se tomaron muestras de las estructuras del hongo fitopatógeno durante 96 horas de crecimiento, tanto de control como de tratamiento, las muestras se colocaron sobre el crecimiento activo con un pedazo de cinta adhesiva antes de colocarlas en un portaobjetos con una gota decolorante de lactofenol azul de algodón.

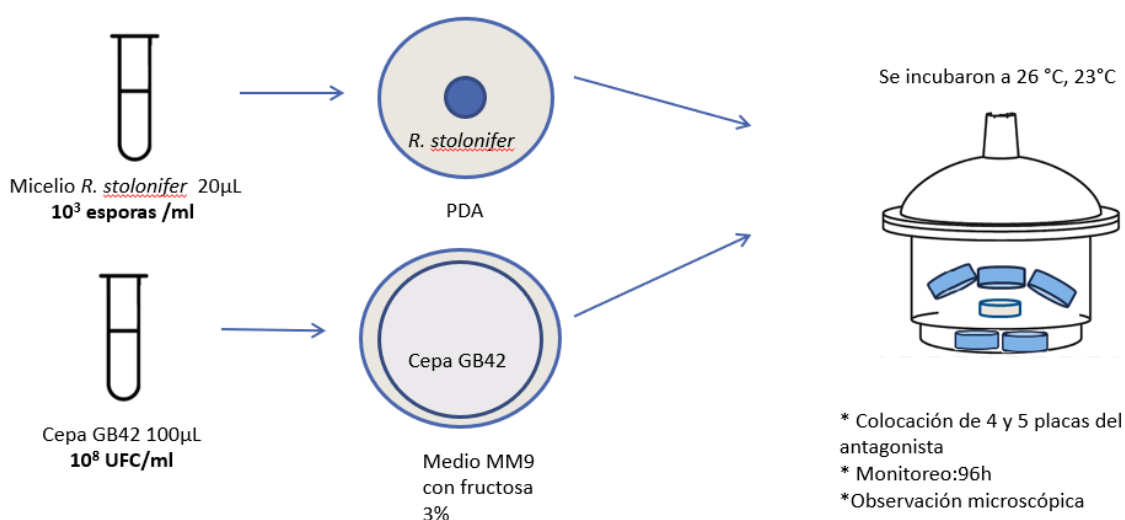


Figura 10. Metodología inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42). (Fuente: elaboración propia)

Análisis estadístico.

Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el programa GraphPad Prism[®]8.0 mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías; las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p \leq 0,05$.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aislamiento de hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

El hongo fitopatógeno fue aislado a partir de un tomate infectado con los rasgos característicos causados por la infección por *R. stolonifer*, posteriormente se sembró en medio PDA un solo esporangio y se realizó la purificación mediante diluciones seriadas a partir del cultivo de una sola colonia con un crecimiento de 72h se realizó su identificación. Las colonias son grandes después de 72h de crecimiento son de aspecto algodonoso color blanco con pequeños puntos negros que corresponden a los esporangios y dan una coloración general gris oscuro (Antonio et al., 2020).

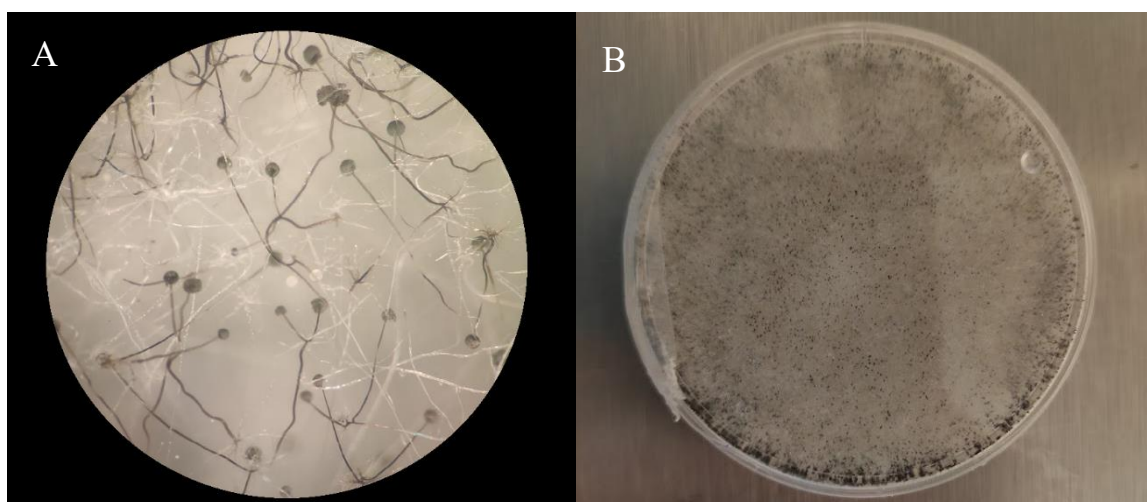


Figura 11. Cultivo axénico *Rhizopus stolonifer* en medio PDA; A) observación morfológica con microscopio estereoscópico 4X; B) Cultivo a las 72h.

Identificación microscópica del hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

Previamente al análisis, se cultivaron las muestras durante un período de 48 horas. Para la tinción, se empleó azul de algodón.

A continuación, se procedió a examinar la muestra bajo el microscopio. Durante el análisis, se identificaron varias características distintivas. En particular, se observaron esporangióforos largos y aéreos que no mostraban ramificaciones y que medían más de 3181 μm , esto es una característica típica de la especie *R. stolonifer*. En la parte inferior de estos esporangióforos, se apreciaron los rizoides. Además, se identificaron esporangios esféricos de color negro, con dimensiones que oscilaban entre 120 y 280 μm . Estos esporangios albergaban esporas de forma globosa, elipsoidal y angular, con

superficies lisas o con estrías distintivas, que medían entre 6 y 11.5 μm de largo y entre 5.5 y 10 μm de ancho.

Finalmente, se logró observar la presencia de columnelas con dimensiones que variaban entre 100 y 170 μm de largo y entre 95 y 150 μm de ancho. Estas observaciones concuerdan con estudios previos (Alfaro Gutiérrez, 2011; Liou et al., 2007) como se ilustra en la Figura 12.

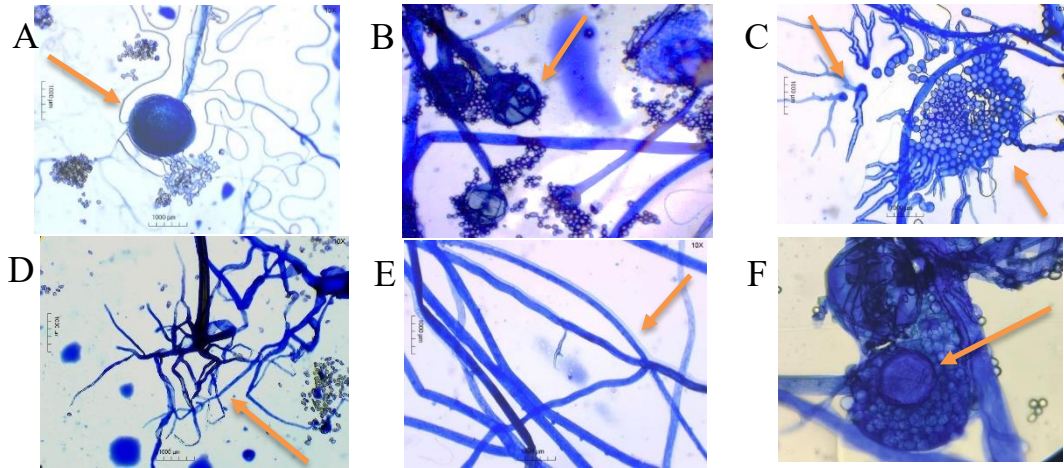
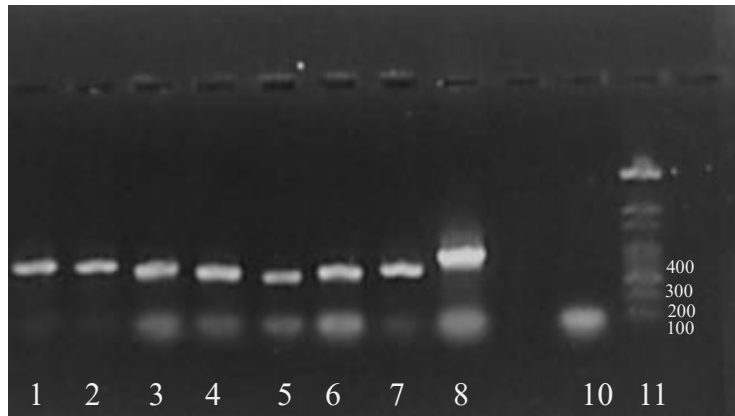


Figura 12. Morfología de *Rhizopus stolonifer*. A) esporangio, B) esporangios y esporas C) esporangiosporas, D) rizoides, E) esporangióforo, F) columnela (Cámara Moticom objetivo 10X).

Identificación molecular de *Rhizopus stolonifer*.

La secuencia de varios marcadores genéticos ubicados en el gen ribosómico del ARNr, en particular las regiones D1 y D2, así como también la región espaciadora transcrita 1 (ITS1) y la región espaciadora transcrita 2 (ITS2) se utilizan ampliamente para la tipificación de hongos mediante estas regiones se realizó la identificación molecular, se hizo la amplificación mediante PCR y los fragmentos se observan en la figura 13 ambos fragmentos se mandaron secuenciar para su posterior análisis filogenético.



Carril 1,2: Región ITS *R. stolonifer* (400pb)
 Carril 7,8: Región D1/D2 *R. stolonifer*. (600pb)
 Carril 3-6: *Sarocladium*.
 Carril 10: Control negativo
 Carril 11: MPM (100 pb)

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR amplificación de regiones ITS, D1/D2.

Después de obtener las secuencias, se llevaron a cabo comparaciones con los datos de secuencias similares disponibles en el GenBank utilizando la herramienta BLASTn. Este análisis permitió confirmar la identificación a nivel de especie utilizando ambos cebadores y se logró una coincidencia del 99% con la cepa en cuestión las secuencias de los cebadores utilizados fueron eficientes al obtener fragmentos útiles para la identificación sin embargo los fragmentos obtenidos para ambas regiones fueron menores a lo reportado por Kang y colaboradores (2018) en los que obtuvieron un fragmento de 978 bp para la región ITS y 650 pb región D1/D2 esto debido a la presencia de gaps en las secuencias.

Para el aislado UAP20221 según el análisis filogenético (figura 14A,B) en ambas regiones se confirmó que se encontraba estrechamente relacionado *R. stolonifer* ya que se encuentra dentro de los subclados para dicha especie y no en los clados pertenecientes a las especies *R. azygosporus*, *R. microporus*, *R. delemar*, *R. oryzae*, *R. schipperae*, *R. caespitosus*, *R. homothallicus*, *R. sexuales*, así como un valor de bootstrap mayor al 90% de acuerdo estos resultados y el análisis microscópico la identificación se realizó hasta especie.

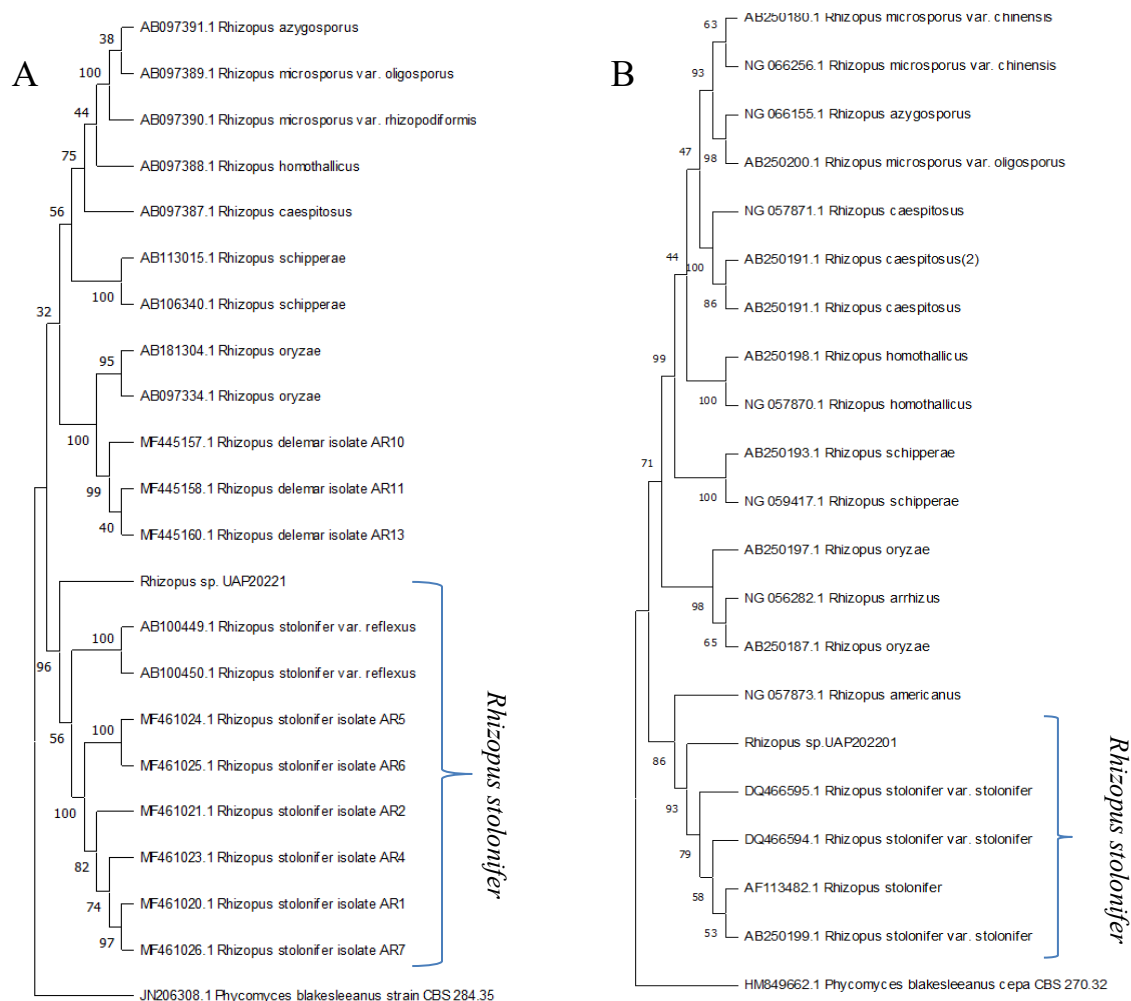


Figura 14. A) Árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML) que muestra las relaciones de aislamiento identificado basados en secuencias que amplifican el fragmento ITS del gen rDNA 18S con un Bootstrap de 1000 repeticiones. B) Árbol filogenético de la región D1/D2 utilizando el método máxima verosimilitud (ML) y el modelo Tamura-Nei con un Bootstrap de 1000 repeticiones.

Pruebas de evaluación *in vitro* de la producción compuestos orgánicos volátiles.

Ensayo doble placa.

Se llevó a cabo un ensayo de doble placa, se enfrentaron simultáneamente 13 cepas pertenecientes al grupo de *Burkholderia* sensu lato y el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*. Este ensayo se desarrolló a una temperatura de incubación de 26 °C durante un período de 4 días, con monitoreo cada 24 horas; Se registraron las medidas del diámetro de crecimiento del hongo, expresadas como porcentaje de crecimiento, y se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de inhibición.

Las 13 cepas bacterianas probadas obtuvieron desde un 0.10% hasta un 57.27% de porcentaje de inhibición y varía con respecto como fuentes de carbono y concentración utilizada fructosa, xilosa y glicerol estas fuentes de carbono fueron seleccionadas de acuerdo con la posible ruta metabólica de los VOCs reportados por Groenhagen *et al.*, 2013 y Tenorio-Salgado *et al.*, 2013 así como también experimentos realizados para la biosíntesis de otros metabolitos secundarios producidos por cepas pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato reportado por Yamada *et al.*, 2018 y Parra *et al.*, 2009.

A partir de los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición después de 96h de exposición a los compuestos orgánicos volátiles de las 13 cepas evaluadas seleccionamos las tres cepas que mostraron una mayor inhibición en los diferentes tratamientos evaluados como se muestra en la tabla 4, la cepa GA02 β en la que obtuvo hasta un 56.06% (fructosa) y un 40.06% (glicerol) de porcentaje de inhibición, la cepa D336 obtuvo 60.28% (glicerol) y la cepa GB42 obtuvo un 48.91%, 42.21% en xilosa y glicerol respectivamente.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición a las 96h de exposición de COVs producidos por 13 cepas con potencial antifúngico evaluadas pertenecientes al género *Burkholderia* sensu lato

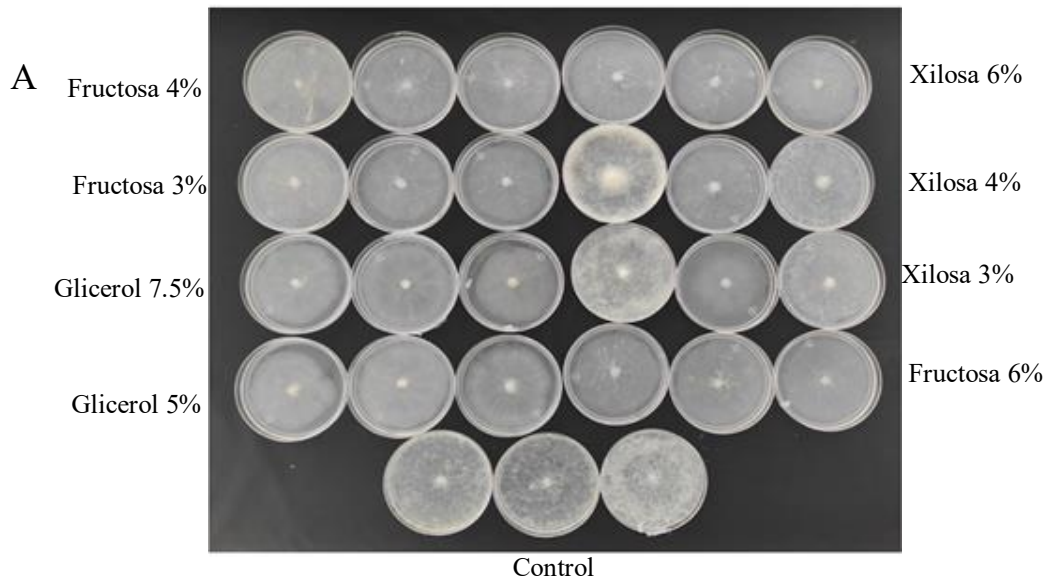
Porcentaje de inhibición (96h de exposición)			
Cepa	Fructosa	Xilosa	Glicerol
	2%	2%	3%
GA01	8.77	0.59	1.14
GA10	28.89	4.61	6.80
GB99	10.80	0.0	5.02
GB94	1.48	0.0	0.0
D416	5.53	21.11	5.76
GB42	16.40	48.91	42.21
GB137	26.46	34.39	0.0
UAP7070 *	N.D	N.D	4.63
D336	29.26	50.30	60.28
GB33	0.0	0.0	0
GA29	10.95	0.0	1.01
GA06	6.71	0.0	0.11
GA02 β	56.06	2.47	40.06

*ND: No determinado.

Pruebas de evaluación *in vitro* de la producción compuestos orgánicos volátiles.

Posteriormente se realizó pruebas de evaluación *in vitro* de la producción compuestos orgánicos volátiles contra *R. stolonifer* mediante ensayo en doble placa con las cepas que obtuvieron mayor porcentaje de inhibición mostrado en la tabla 4 fueron cepa GB42, D336 y GA02 β en el implementamos el aumentamos de tiempo en exposición a 10 días y la concentración de la fuente de carbono xilosa (3%, 4%, 6%), fructosa (3%, 4%,6%), glicerol (5%, 7.5%) con el fin de evaluar la variación del porcentaje de inhibición posterior a las 94 horas y basándonos en la concentración de la fuente de carbono como estrategia para aumentar la producción de COVs (Parra González et al., 2009; Yamada et al., 2018).

En este ensayo se obtuvo como resultado que las tres cepas pueden producir compuestos orgánicos volátiles que tienen la capacidad de suprimir el crecimiento del hongo fitopatógeno. Se empleó una estrategia que implicó el uso de diferentes concentraciones de tres fuentes de carbono obtenidas después de un período de exposición de diez días. En particular, se observó que la cepa D336, cuando se cultivó en presencia de fructosa (1% y 2%) y glicerol (5% y 7.5%) como fuentes de carbono, exhibió un menor crecimiento micelial aéreo. El efecto inhibitorio osciló en un rango que varió entre 16.88% y 55.89% (figura 15B). En este ensayo también se pudo observar la presencia de exopolisacáridos en el crecimiento de la bacteria, aunque podemos destacar que de acuerdo con los resultados no tuvo una influencia negativa en la producción de COVs que originan la inhibición. Esto en contraste con los resultados reportados por García Nieto en 2020 para esta misma cepa, donde la inhibición máxima fue de tan solo el 13.8% utilizando medio de cultivo NB a las 96 horas.



Día 10

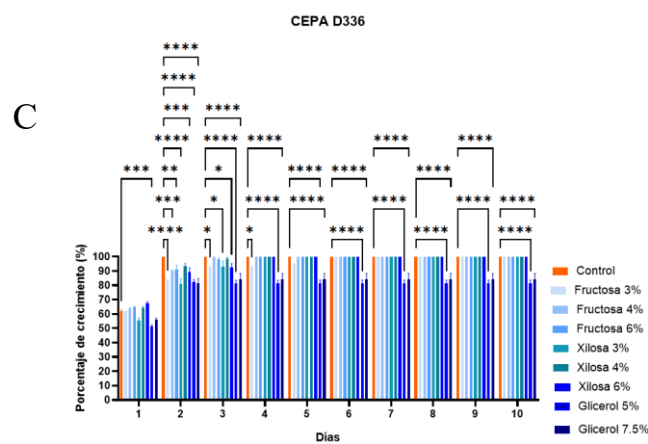
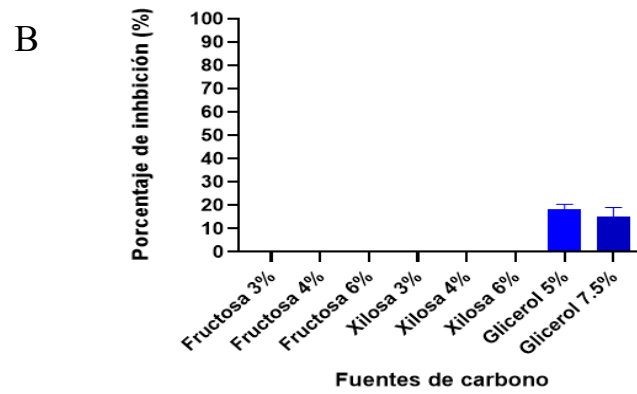


Figura 15. A) Crecimiento micelial aéreo de *Rhizopus stolonifer* expuesto a COVs producidos por cepa D336 a los 10 d después de la inoculación; B) Porcentaje de inhibición; C) Porcentaje de crecimiento micelial, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p \leq 0,05$.

Con respecto a la cepa GA02 β , es importante mencionar que GarcíaNieto (2020) previamente reportó una inhibición del 6.28% utilizando la misma metodología. Sin embargo, en este estudio se observó que el crecimiento micelial fue aún menor en los tratamientos en los que se utilizó el glicerol (5%) como fuente de carbono. Este efecto inhibitorio osciló alrededor de 7,59%, y es importante destacar que se obtuvo una diferencia significativa en comparación con el grupo de control, como se ilustra en la Figura 17.

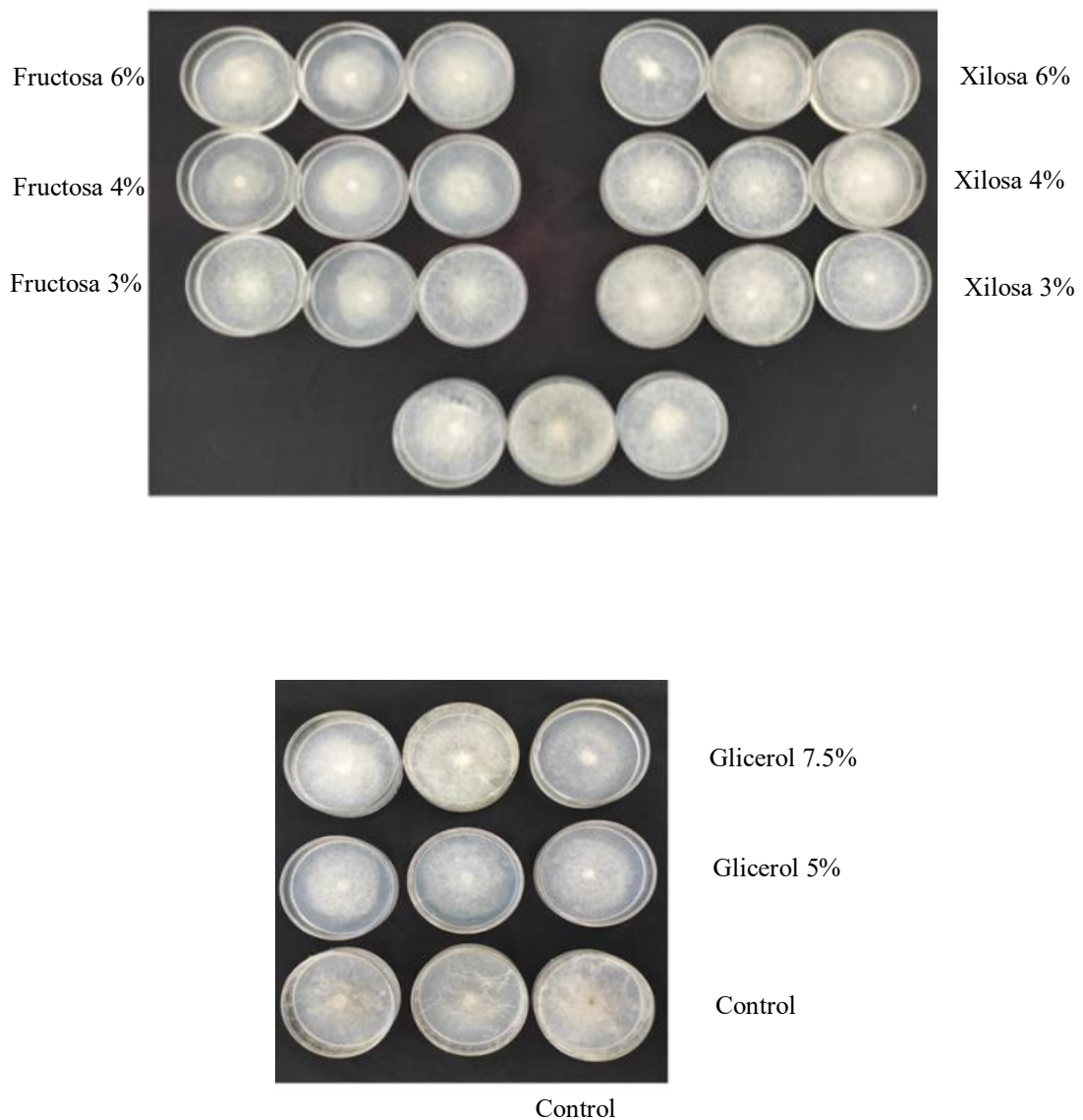


Figura 16. Crecimiento micelial aéreo de *Rhizopus stolonifer* expuesto a COVs producidos por cepa GA02 β a los 10 d después de la inoculación.

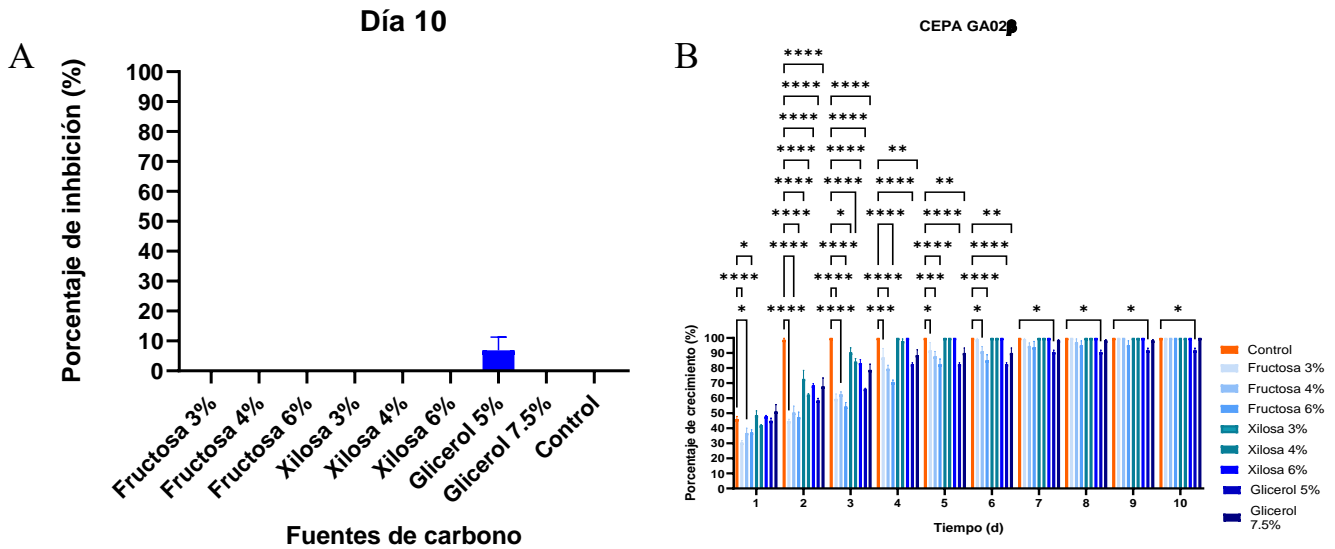


Figura 17. A) Porcentaje de inhibición crecimiento micelial aéreo de *Rhizopus stolonifer* expuesto a COVs producidos por cepa GA02β a los 10 d después de la inoculación B) Porcentaje de crecimiento micelial, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p \leq 0,05$.

El análisis reveló que la cepa GB42 experimentó un menor crecimiento micelial en todos los tratamientos, pero los que obtuvieron un mayor porcentaje de inhibición y un menor crecimiento micelial aéreo fueron con fructosa (3%), glicerol (7.5%) y xilosa (3%). Así mismo, se observó un crecimiento por debajo de la placa como se muestra en la figura 18B, que afectó la parte posterior de la placa. Por otra parte, a partir del quinto día no se mostraron diferencias en el crecimiento micelial aéreo, lo que resultó en un efecto inhibitorio del 90.95% (fructosa 3%), 89,89% (glicerol 7,5%), 83,03% (xilosa 3%)., Estos resultados superaron en hasta un 30% el porcentaje de inhibición informado por Wu *et al.*, 2020, que había alcanzado un máximo de 56.33% después de 96 horas de exposición. También se han reportado el uso de diversos aceites esenciales para inhibir el crecimiento micelial de este microorganismo Alizadeh-Salteh y colaboradores (2010) reportaron que el aceite esencial de Zataria obtuvo un 6% más que el reportado en este trabajo cabe destacar que este resultado fue reportado después de 7 días de exposición y mediante una metodología similar.

Para evaluar la significancia de estas diferencias, se realizó un análisis estadístico que reveló que existe una diferencia significativa entre los tratamientos con fructosa y xilosa a los diez días posteriores a la exposición. Esto sugiere que el efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las bacterias varía en función de la composición del medio de cultivo y la fuente de carbono utilizada.

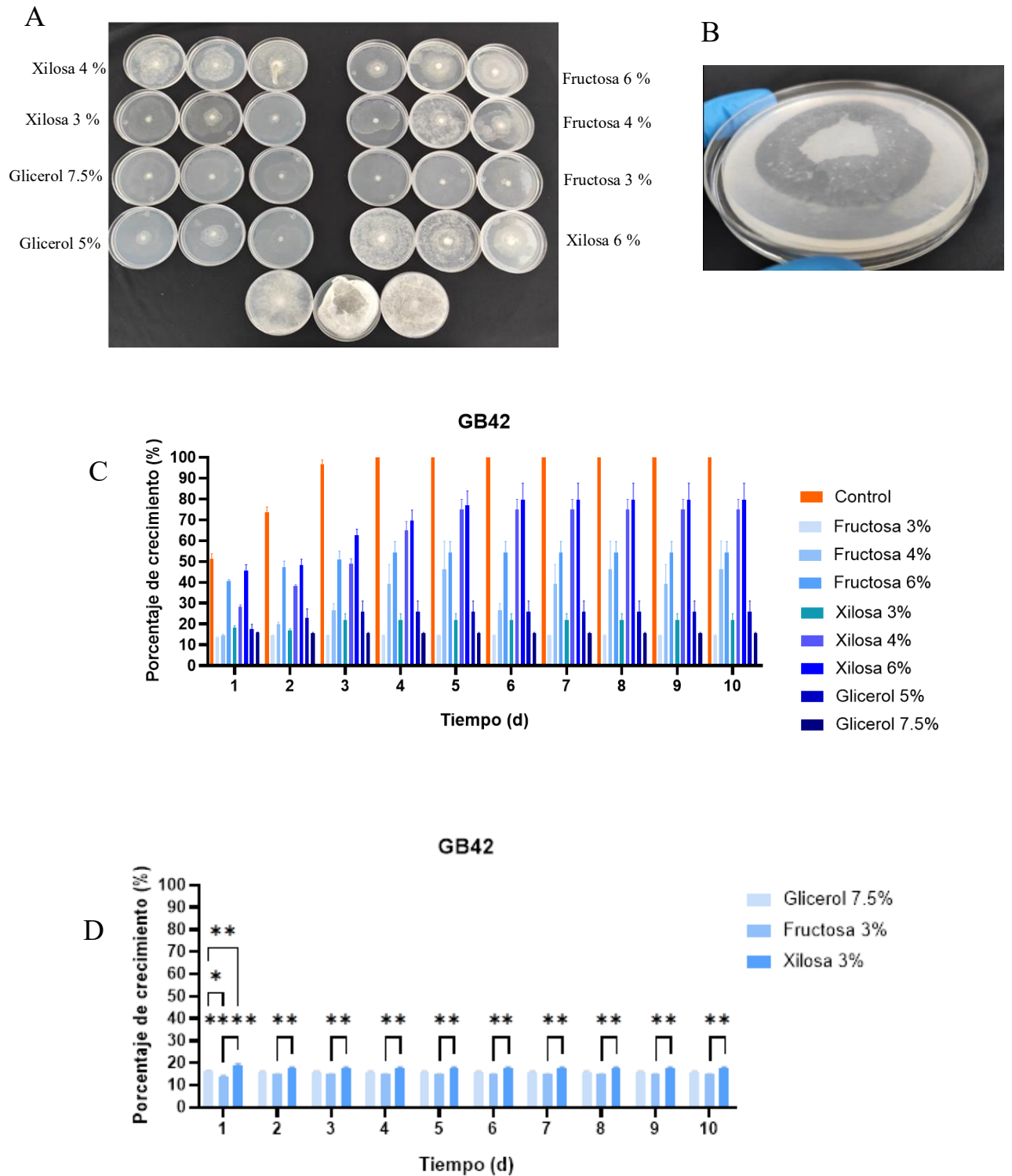


Figura 18. A) Crecimiento micelial aéreo de *Rhizopus stolonifer* expuesto a COVs producidos por la cepa GB42 a los 10 días de la inoculación; B) Observación del crecimiento microaerófilo; C) Porcentaje de crecimiento micelial, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p \leq 0,05$. D) Porcentaje de crecimiento con los tratamientos fructosa 3%, xilosa 3% y glicerol 7.5%.

A partir de los resultados obtenidos de las tres cepas antagonistas D336, GA02 β , GB42 identificamos de acuerdo con el crecimiento micelial aéreo y el porcentaje de inhibición obtenido (figura 19) que la cepa con mayor actividad antagónica fue la cepa GB42 obtuvo mayor inhibición en todos los tratamientos realizados.

Estas cepas según el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (Cervantes Álvarez, 2016) y su aislamiento pertenecen a géneros y especies distintas entre ellas el aislado D336 pertenece al conjunto *Burkholderia cepacea* fue aislada de la rizosfera del chile canario; la cepa GA02 β , *Burkholderia gladioli* aislada de la rizosfera de la leguminosa ambas cepas según su relación filogenética pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato mientras que cepa GB42 a diferencia de las anteriores pertenece al género *Paraburkholderia panacisoli* fue aislada de la rizosfera del helecho, este género no se han reportado como patógeno para el ser humano ni para las plantas a diferencia de algunas especies pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato (Coenye et al., 2001; Serret-López et al., 2021) algunas de sus características beneficiosas que incluyen la fijación de nitrógeno ya reportada en esta cepa al ser portadora del gen *nifH* y así mismo ha demostrado tener mecanismos para el crecimiento vegetal (Merino Espinoza, 2020) también este género tiene propiedades de biodegradación de la cafeína (Huo et al., 2020). Mientras que la especie *P. panacisoli* ha sido reportada como positiva mediante índice de perfil analítico (API) a la fermentación de glucosa, hidrólisis de esculina y la asimilación de 22 compuestos a diferencia de las especies de *B. gladioli* y *B. cepacia* en los que se solo se han reportado 9 compuestos según la base de datos Bac Dive (ver anexo V).

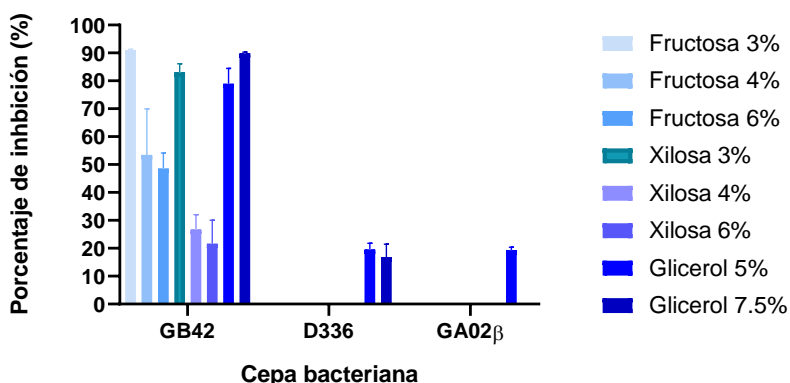


Figura 19. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* expuesto a COVs producidos por las cepas GB42, D336, GA02 β a los 10 días de la inoculación.

Para determinar los efectos de las bacterias sobre el crecimiento del micelio del hongo fitopatógeno se realizó la observación microscópica de los ensayos de la cepa GB42 con los diferentes tratamientos realizados pudimos identificar esporangios con deformaciones y disminución en su tamaño (figura 20C,D), esporangióforos más delgados y con ramificaciones cortas que los observados en el control (Figura 19A,B), la ausencia de esporangiosporas (Figura 20E) está implicada en la disminución y desarrollo con deformaciones de los esporangios y por lo tanto defectos en la formación de la columnela. Al igual que en nuestro estudio se ha documentado que mediante la fumigación de COVs como 2,3-butanodiona producidos por bacterias puede causar daños en conidios e hifas en hongos como *Aspergillus flavus* (Ling et al., 2023).

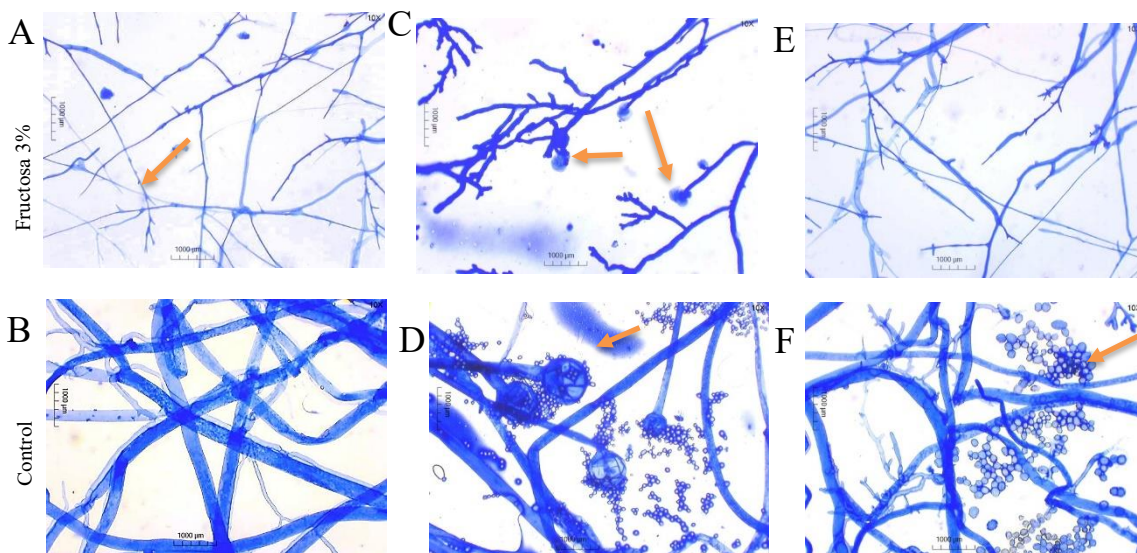


Figura 20. Cambios morfológicos evaluados en ensayos de doble placa tras 10 días de exposición a COVs producidos por cepas bacterianas GB42 sobre micelio de *R. stolonifer*, con tinción azul de lactofenol-algodón; A,B) Esporangióforos; C,D) Esporangio; E) Esporangiosporas, F) Crecimiento micelial con ausencia de esporangiosporas (Cámara Moticam 10X).

Ensayo de germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Para evaluar el efecto antifúngico sobre la germinación de esporas de la cepa antagonista GB42 se utilizaron combinaciones de fuentes de carbono (fructosa 3%, xilosa 3%, glicerol 7.5%) que obtuvieron mayor porcentaje de inhibición en las pruebas anteriormente de evaluación *in vitro* e implementamos colocar dos fuentes de carbono simultáneamente en el mismo sistema pero no en el mismo medio de cultivo para evitar

represión catabólica este experimento se realizó con en el fin de aumentar la concentración de los metabolitos producidos por la bacteria así como también la diversidad de los metabolitos aun desconocidos que generan el efecto fungicida y fungistático las combinaciones fueron: fructosa 3% y xilosa 3%; xilosa 3% y glicerol 3%; fructosa 3% y glicerol 7.5%.

En este ensayo hay que destacar que se observa una notable inhibición de media a alta con respecto al control como podemos observar en la figura 21A. Se obtuvo como resultado que la mayoría de los tratamientos tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento aéreo, presentando una alta actividad antagónica los tratamientos con fructosa al 3% y xilosa 3% con un porcentaje de inhibición de 75.75% y 72.76% respectivamente, para los tratamientos en los que se colocaron dos fuentes de carbonos se obtuvo hasta un 69.81% con respecto al control (Tabla 5).

Los tratamientos con mejores resultados se evaluaron mediante un análisis estadístico y se podría aseverar que si existen diferencias significativas entre estos tratamientos (figura 21B). De acuerdo a estos resultados podemos mencionar que el catabolismo de estos carbohidratos simples puede variar según el carbohidrato que se metabolice así como la preferencia de la bacteria por un carbohidrato, este proceso está relacionado con la adaptación al nicho ecológico y se metaboliza a través de las siguientes vías glucolíticas: Embden-Meyerhof, la vía de Entner-Doudoroff y la vía de las pentosas fosfato, esto para obtener piruvato y posteriormente oxidarlo para adquirir acetyl CoA ambos precursores para la producción de algunos metabolitos secundarios como son algunos antibióticos y los terpenos por ejemplo: el metabolismo de la xilosa comienza con la conversión de xilosa en xilulosa, que luego se fosforila para formar xilulosa-5-fosfato y posteriormente convertirse en ribulosa-5-fosfato e incorporarse a la fase no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (Chin et al., 2022). Además, hay una variedad de mecanismos que pueden influir en la síntesis de enzimas catabólicas, en los que la presencia de una o varias fuentes de carbono puede provocar fluctuaciones en las concentraciones de proteínas reguladoras, lo que puede conducir a rutas de catabolismo alternativas (Brückner & Titgemeyer, 2002).

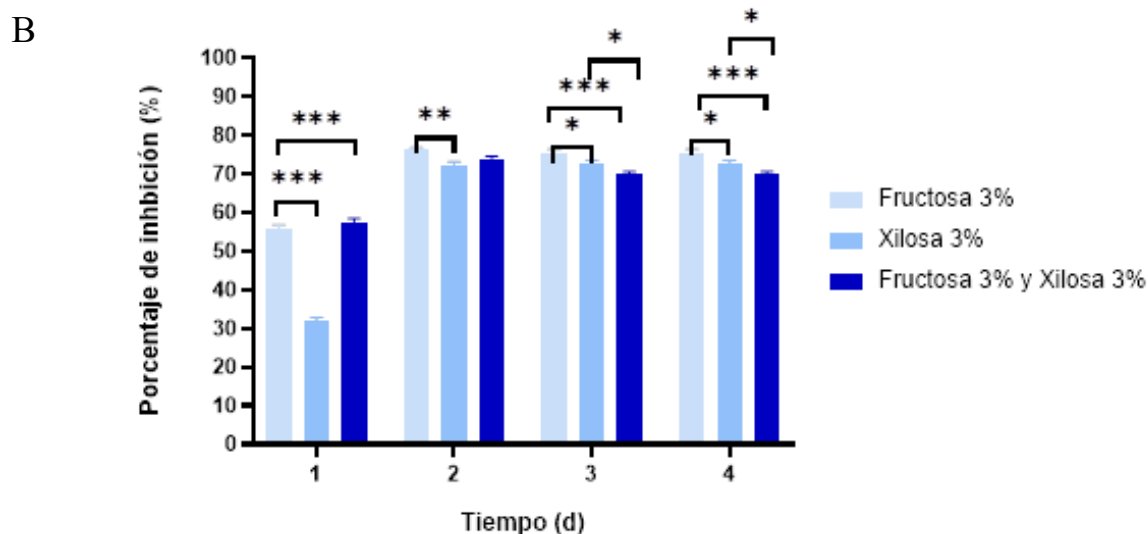
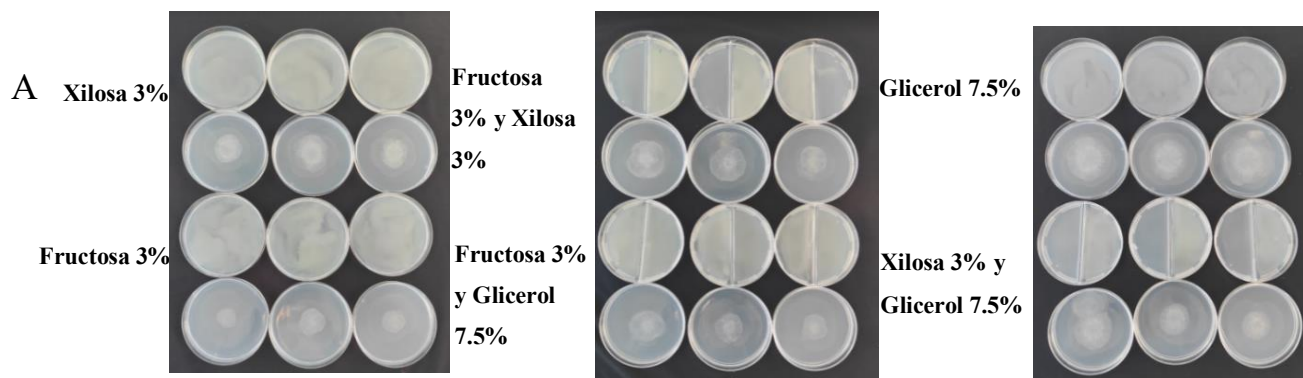


Figura 21. A) Crecimiento micelial aéreo de *Rhizopus stolonifer* expuesto a COVs producidos por cepa GB42 a los 96h después de la inoculación; C) Análisis estadístico entre los tratamientos con mayor porcentaje de inhibición después de 96h, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p \leq 0,05$.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas *Rhizopus stolonifer* expuesto a los COVs producidos por la GB42.

Tiempo (días)	Fructosa 3%	Xilosa 3%	Glicerol 7.5%	Fructosa 3%, Glicerol 7.5%	Xilosa 3%, Glicerol 7.5%	Fructosa 3%, Xilosa 3%
1d	55.96	32.17	26.71	52.16	36.68	57.55
2d	76.23	72.36	57.31	70.62	69.25	73.90
3d	75.52	72.76	51.54	65.92	68.01	69.81
4d	75.52	72.76	51.54	65.92	68.01	69.81

Por otra parte, se ha reportado que los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias pueden inhibir la formación de estructuras reproductivas y la germinación de esporangiosporas según lo reportado (Ling et al., 2023) por lo que se realizó su cuantificación después de 96 h de exposición a los COVs en el que utilizamos una cámara de Neubauer y un microscopio óptico (objetivo 40X) se observó la ausencia de esporangiosporas a diferencia del control mostrado en la figura 22A y la observación microscópica con la tinción de azul de lactofenol se mostraron hifas son más delgadas y rotas, esporangióforos reducidos en tamaño y con deformaciones con respecto al control (figura 22B).

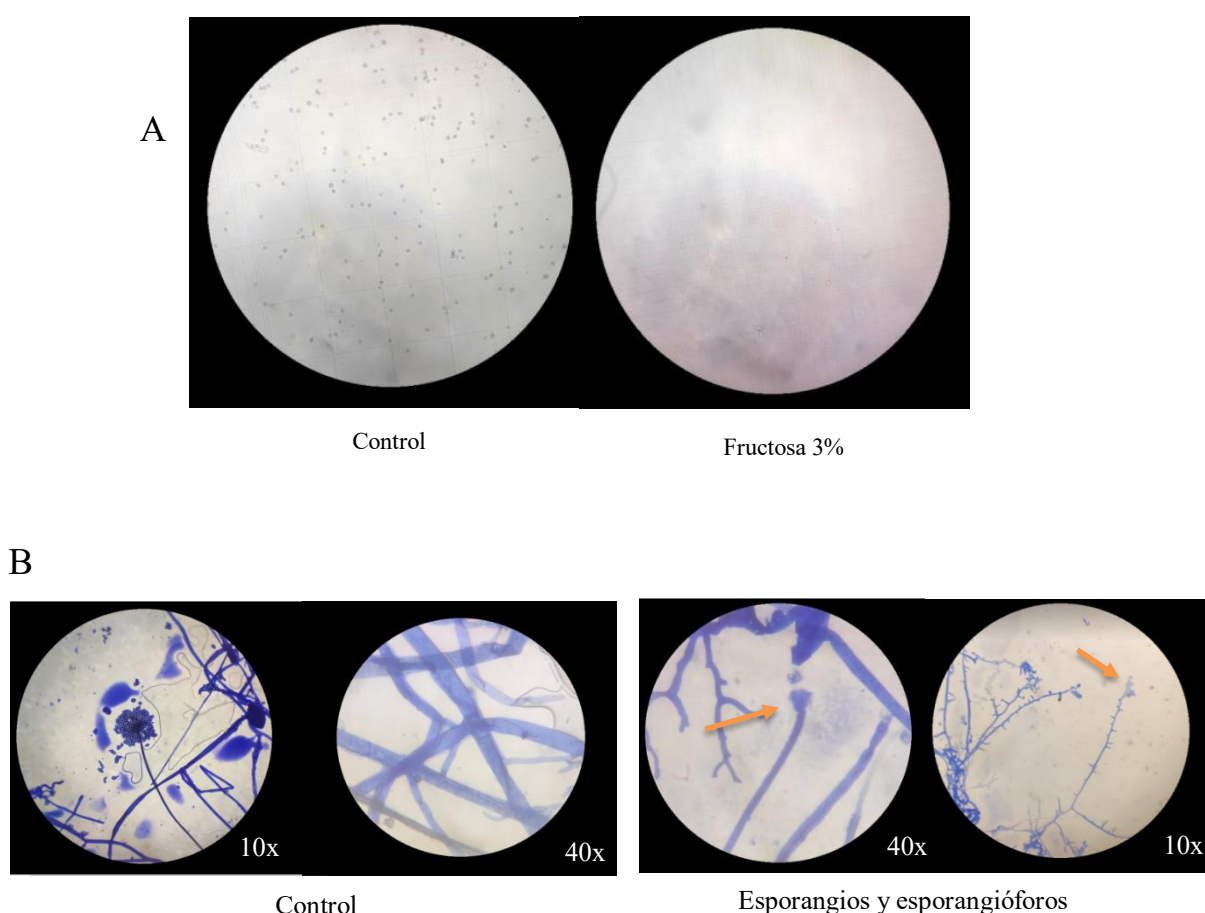


Figura 22. A) Observación microscópica en cámara de newbauer de la cuantificación de esporas (40X) B) Cambios morfológicos sobre micelio *Rhizopus stolonifer*.

En la correlación entre la evaluación realizada con el compuesto quitosano en la que se reportan alteraciones en las hifas, pero no en la formación de esporangiosporas (Bautista-Baños et al., 2012) y la evaluación realizada con compuestos orgánicos volátiles como 3-metil-1-butanol en los que se ha reportado la inhibición de esporas es posible mencionar

que la naturaleza química puede afectar el mecanismos de acción de estos compuestos se podrían considerar como factores para el daño estructural (Delgado et al., 2021).

Detección e identificación de compuestos orgánicos volátiles.

Identificación de compuestos orgánicos volátiles mediante estándar.

La adsorción y detección de los compuestos orgánicos volátiles producidos por la cepa GB42 utilizando como fuente de carbono fructosa al 3% se realizó mediante SPME- GC Q-ToF-MS. Las fibras para SPME utilizadas fueron la DVB/CAR/PDMS (gris) y PDMS/DVB (rosa) ambas fibras fueron colocadas diariamente durante periodos de 2,4,12 h durante 96 horas de crecimiento de la bacteria para su posterior detección y análisis de los picos cromatográficos en ambas fibras durante 96 horas de crecimiento de la bacteria. Para identificar las moléculas activas dentro de las mezclas complejas de volátiles emitidos por la cepa GB42 se realizó la recopilación de los compuestos reportados producidos por bacterias y con actividad antifúngica (Calvo et al., 2020; Chen et al., 2022; Gao et al., 2017; Groenhagen et al., 2013; Lin et al., 2021; Liu et al., 2018; Rodríguez-Cisneros et al., 2023; Tenorio-Salgado et al., 2013; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2022; Zhang et al., 2020). Con la ayuda de la biblioteca de espectros de masas en tándem del NIST se realizó la búsqueda de masas, discriminando los picos producidos por el medio de cultivo, con los iones más abundantes de cada compuesto se obtuvo el cromatograma de ion extraído como otra herramienta de búsqueda de compuestos desconocidos (figura 23). Mediante estas herramientas se identificaron catorce compuestos se muestran en la tabla 6. De estos compuestos se contó con cuatro estándares para corroborar inequívocamente la identificación por tiempo de retención y comparación de espectro, pues se analizaron en las mismas condiciones para verificar idéntico tiempo de retención y el patrón de fragmentación del espectro de masas como se muestra en la figura 24 C, D, E, F. Así se corroboró la identidad de cuatro compuestos: 2-Heptanona, 2-Nonanona, α -Pineno, (s)(-)-Limoneno, los compuestos pertenecen a los terpenos, también conocidos como isoprenoides o terpenoides, con más de 30.000 estructuras distintas, muchos de ellos con actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (Ge et al., 2022; Gutiérrez-del-Río et al., 2021; Kamran et al., 2022; Konuk & Ergüden, 2020; Yang et al., 2020).

La identificación de compuestos con los que no se contaba con el estándar se realizó mediante la detección de picos, y el programa de búsqueda de espectros de masas del

Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) por medio de comparación del patrón de fragmentación del espectro de masas.

Las investigaciones actuales han demostrado que las bacterias producen y emiten una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles como cetonas, terpenos, alcoholes, compuestos que contienen azufre, ácidos y ésteres. De los compuestos identificados, el disulfuro de carbono puede inhibir al hongo hasta un 100% contra *Fusarium solani* y 66.7% *Moniliophthora perniciosa* (Chaves-López et al., 2015). La cetona 2-pentanona produjo una inhibición débil contra *Cladosporium inversicolor* (Huang et al., 2021). El aldehído 2-decenal está implicado en la inhibición de *Monilinia laxa*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* (Balsells-Llauradó et al., 2022; Camacho-Coronel et al., 2020; Quintana-Rodríguez et al., 2018) y el terpeno 3-careno puede inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* en un 36 % (Ayed et al., 2021; Hwang et al., 2021). Los compuestos como 5-metil-2-hexanol y 1,2,3-trimetil ciclohexano son producidos por bacterias como *Asaia bogorensis* y *Streptomyces sp.* respectivamente también se ha descrito en ciertas plantas, flores, árboles frutales, sin embargo, no han sido reportados como compuestos antifúngicos (Antolak et al., 2019; Liu et al., 2022). Los compuestos dihidrocarvona, hexilciclopentano, 1-ciclohex-3-en-1-il-2,2-dimetilpropan-1-ona, (E)-undec-5-en-3-ine no se ha reportado que tengan actividad antifúngica y que sean producidos por bacterias.

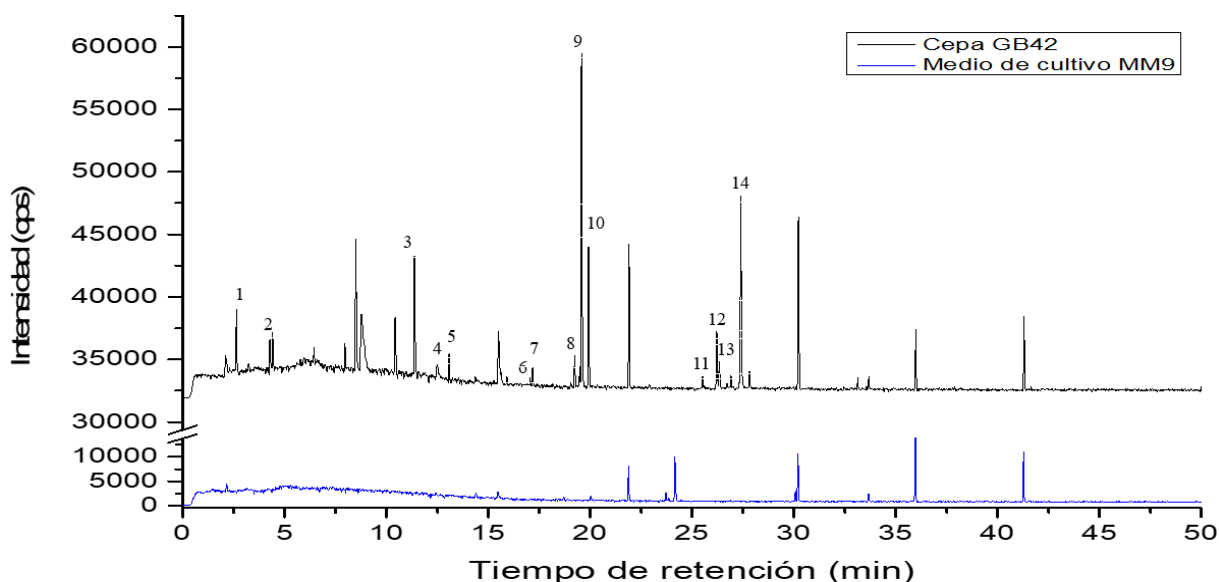


Figura 23. Cromatograma de los compuestos producidos por cepa GB42 en medio MM9 fructosa 3% a las 96h de incubación. (1) disulfuro de carbono; (2) 2-pentanona; (3) 2-heptanona; (4) 5-metil-2-hexanol; (5) α -pineno; (6) (S) (-) limoneno; (7) 2-decenal; (8) 2-decenal; (9) 2-nonanona; (10) 1,2,3-trimetil ciclohexano; (11) 3-careno; (12) dihidrocarvona; (13) 1-ciclohex-3-en-1-il-2,2-dimetilpropan-1-ona; (14) (E)-undec-5-en-3-ine.

Tabla 6. Lista de 14 compuestos orgánicos volátiles identificados mediante análisis SPME- GC Q-ToF-MS.

No.	Tiempo de retención	Fragmentos más característicos	Nombre del compuesto	Formula mínima	M/Z	(M+H) +
1	2.64	51.0,75.9, 77.9	Disulfuro de carbono	CS ₂	75.9	77
2	4.2	58,71,86.1	2-pentanona	C ₅ H ₁₀ O	86.1	87.1
3	11.36	58,71,85.1,99.1,114.1	2-heptanona *	C ₇ H ₁₄ O	114.1	115.1
4	11.87	55.1,70.1,83.1	5-metil-2-hexanol	C ₇ H ₁₆ O	116.2	117.2
5	13.07	51,65,77,93.1,105.1,119.1,134.1	α-pineno*	C ₁₀ H ₁₆	136.1	137.1
6	17.03	53,65,67.1,79.1,91.1,93.1,107.1,121.1,136.1	(S) (-) Limoneno *	C ₁₀ H ₁₆	136.1	137.1
7	17.17	55.1,57.1,65,67.1,70.1,72.1,79.1,83.1,93.1,97.1	2-decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	154.2	155.2
8	19.48	55.1,67.1,69.1,83.1,97.1,111.1	Hexilciclopentano	C ₁₁ H ₂₂	154.1	155.1
9	19.58	58,67.1,71,85.1,99.1, 142.1	2-nonanona *	C ₉ H ₁₈ O	142.1	143.2
10	19.98	55.1,67.1,69.1,83.1,97.1	1,2,3-trimetil ciclohexano	C ₉ H ₁₈	126.1	127.1
11	25.53	51,67.1,77,91.1,93.1,105.1,119.1,136.1	3-caren	C ₁₀ H ₁₆	136.1	137.1
12	26.33	55.1,67.1,81.1,95.1,109.1	Dihidrocarvona	C ₁₀ H ₁₆ O	152.1	153.1
13	26.71	57.1,67.1 79.1, 85.1 109.1	1-ciclohex-3-en-1-il-2,2-dimetilpropan-1-ona	C ₁₁ H ₁₈ O	166.1	167.1
14	27.38	67.1,77,79.1,91.1,93,1	(E)-undec-5-en-3-ine	C ₁₁ H ₁₈	150.1	151.1

*Compuestos verificados por estándar.

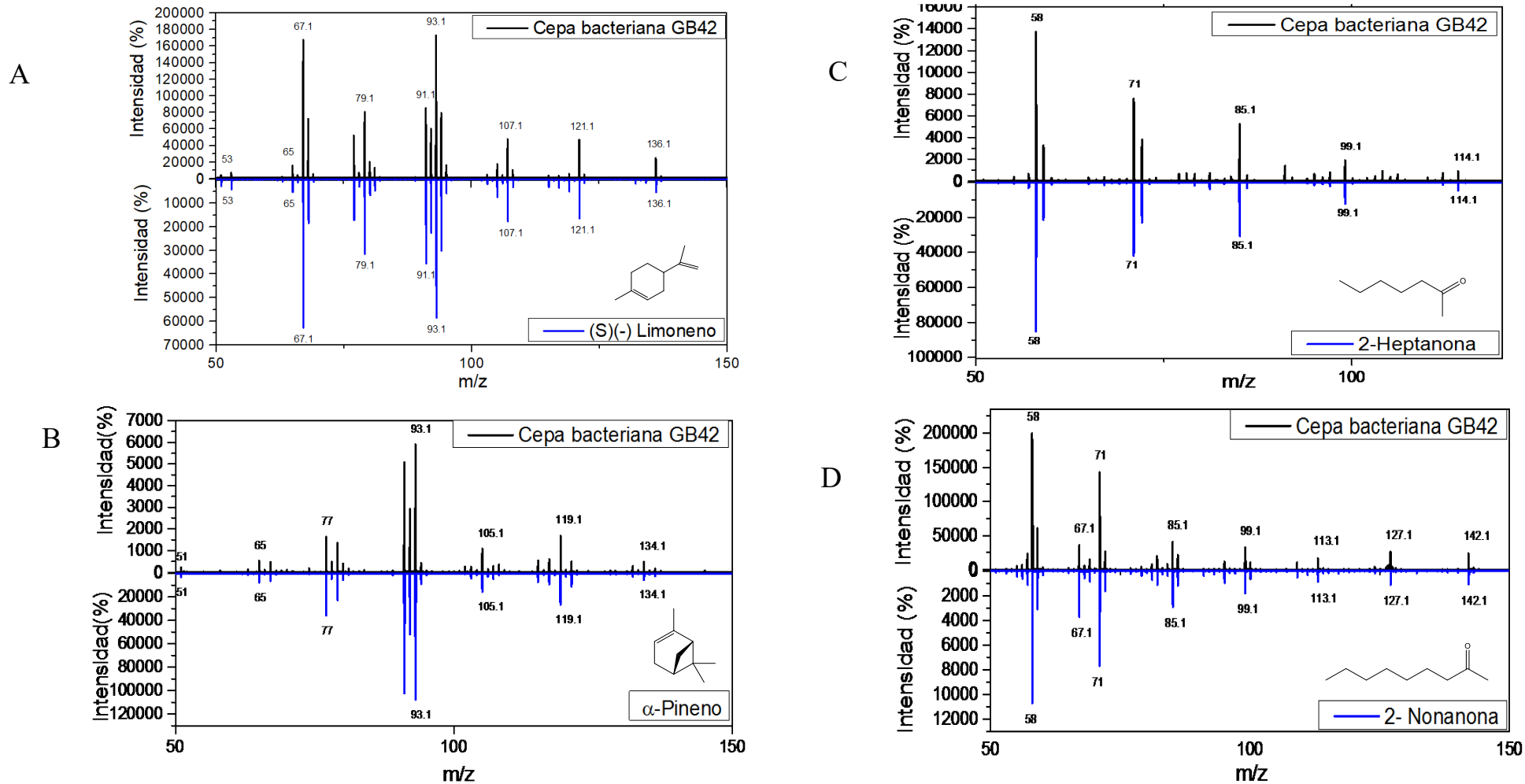


Figura 24. Patrón de fragmentación compuestos orgánicos volátiles verificados por estándar. A) Espectro de masas de (S) (-) limoneno; B) Espectro de masas de α -pineno; C) Espectro de masas de 2-heptanona; D) Espectro de masas de 2-nonanona.

Los terpenos pueden ser producidos por bacterias mediante dos rutas la vía del mevalonato (MVA) y la vía del fosfato de metileritritol (MEP) (Kang et al., 2014; Ren et al., 2020; Sarria et al., 2014; Yan et al., 2020).

En la figura 25 se muestra la ruta de biosíntesis de terpenos para la bacteria *Paraburkholderia phymatum* en este diagrama se observa la vía específica del microorganismo en color verde, indicando las enzimas mapeadas en la base de datos enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG). Este esquema revela la preponderancia de genes codificantes para enzimas de la vía del fosfato de metileritritol (MEP), confirmando la prevalencia en la cepa estudiada, como también se evidencia en el caso de la cepa *Paraburkholderia panacisoli* GB42 mencionada en este trabajo de tesis. Se observa una entrada directa al catabolismo de fuentes de carbono como fructosa y xilosa a través de la ruta de la glucólisis hacia la vía del MEP, presente en la mayoría de las bacterias según informes previos. Sin embargo, contrastando con esta tendencia, el catabolismo del glicerol sigue la vía del mevalonato (MVA), utilizando la formación de acetil coenzima A. Esta vía, documentada en arqueas, algunas bacterias, levaduras, hongos y células animales para la producción de terpenos, destaca una excepción notable en el contexto de las bacterias estudiadas (Boronat & Rodríguez-Concepción, 2015; Tetali, 2019). Estos hallazgos no solo respaldan nuestros resultados, sino que también revelan la diversidad metabólica dentro del proceso de biosíntesis de terpenos en estas bacterias.

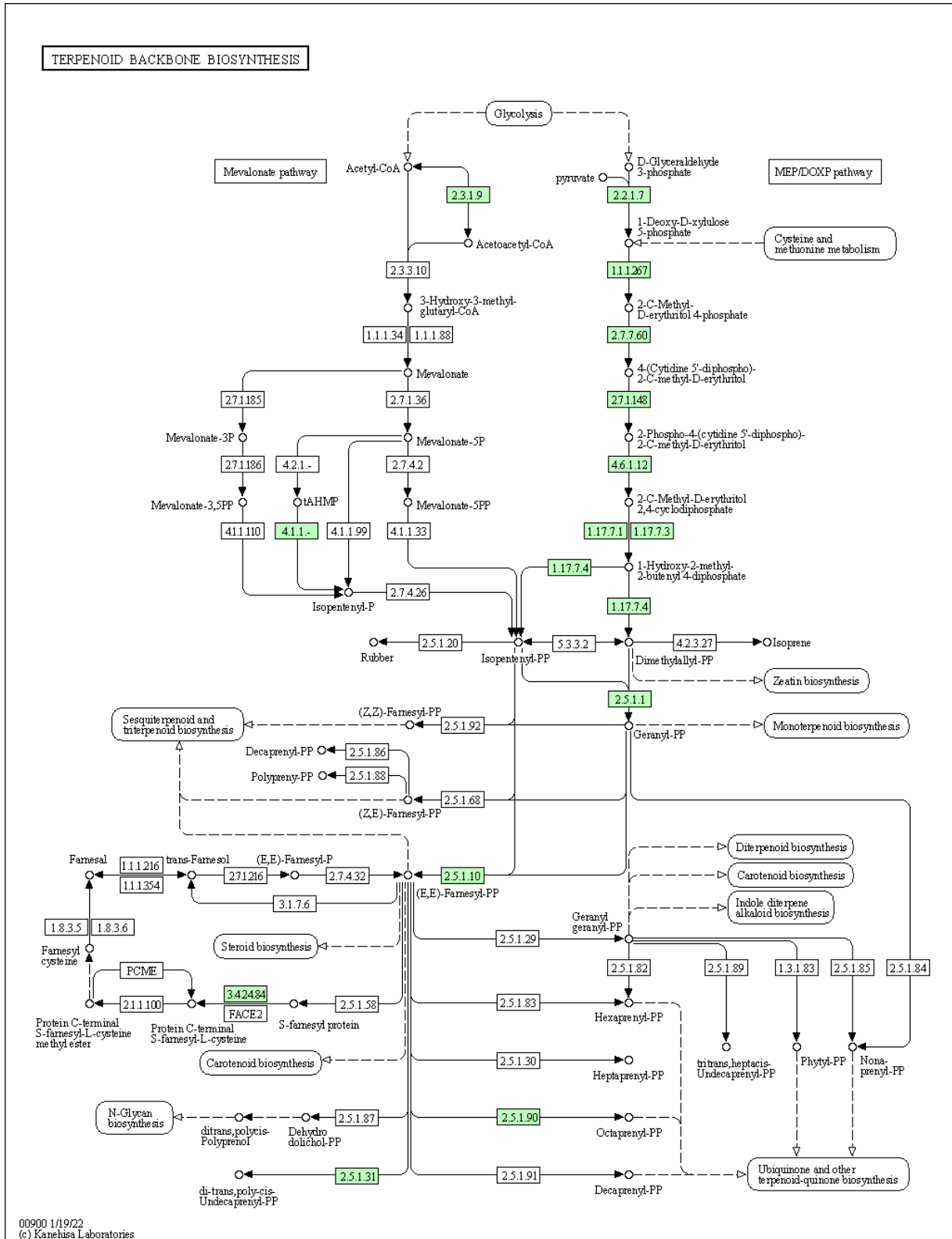


Figura 25. Biosíntesis de terpenos de la bacteria *Paraburkholderia phymatum* (KEGG).

Ensayo de actividad antagonista *in vitro* de los antifúngicos sintetizados químicamente.

Para probar la eficiencia los compuestos identificados y disponibles como reactivos se probaron mediante una concentración baja (5 μL), media (25 μL), alta (50 μL) contra *R. stolonifer* para evaluar el efecto inhibitorio, aplicándolos de manera individual, como se muestra en la figura 26.

En nuestros resultados se puede observar que el compuesto que obtuvo mayor inhibición fue el 2-nonanona con la concentración baja obtuvo hasta un 98.7%, seguido del 2-heptanona que a una concentración media obtuvo hasta un 100% de inhibición ambos compuestos obtuvieron mayor eficiencia que lo reportado por la literatura bajo la misma técnica de doble placa, pero con una concentración mayor a la utilizada en este estudio 80 μL y tras 10 días de exposición Zhang *et al.*, 2020 reporto una inhibición de 1.65% para 2-nonanona y 0.41% 2-heptanona (Nazareth *et al.*, 2023). Mientras el compuesto (S) (-) limoneno obtuvo una inhibición de hasta un 83.3% a una concentración media siendo superior a lo reportado con un 28.84% este compuesto fue obtenido a partir de cascara de naranja-lima (Rezende *et al.*, 2020).

El compuesto que obtuvo una menor eficiencia fue terpeno α -pineno también reportado por Tenorio-Salgado y colaboradores (2013) con actividad antifúngica en este trabajo obtuvimos un 19.33% de inhibición a una concentración alta con respecto al control todos los compuestos tienen capacidad antifúngica a diferentes porcentajes según la concentración utilizada.

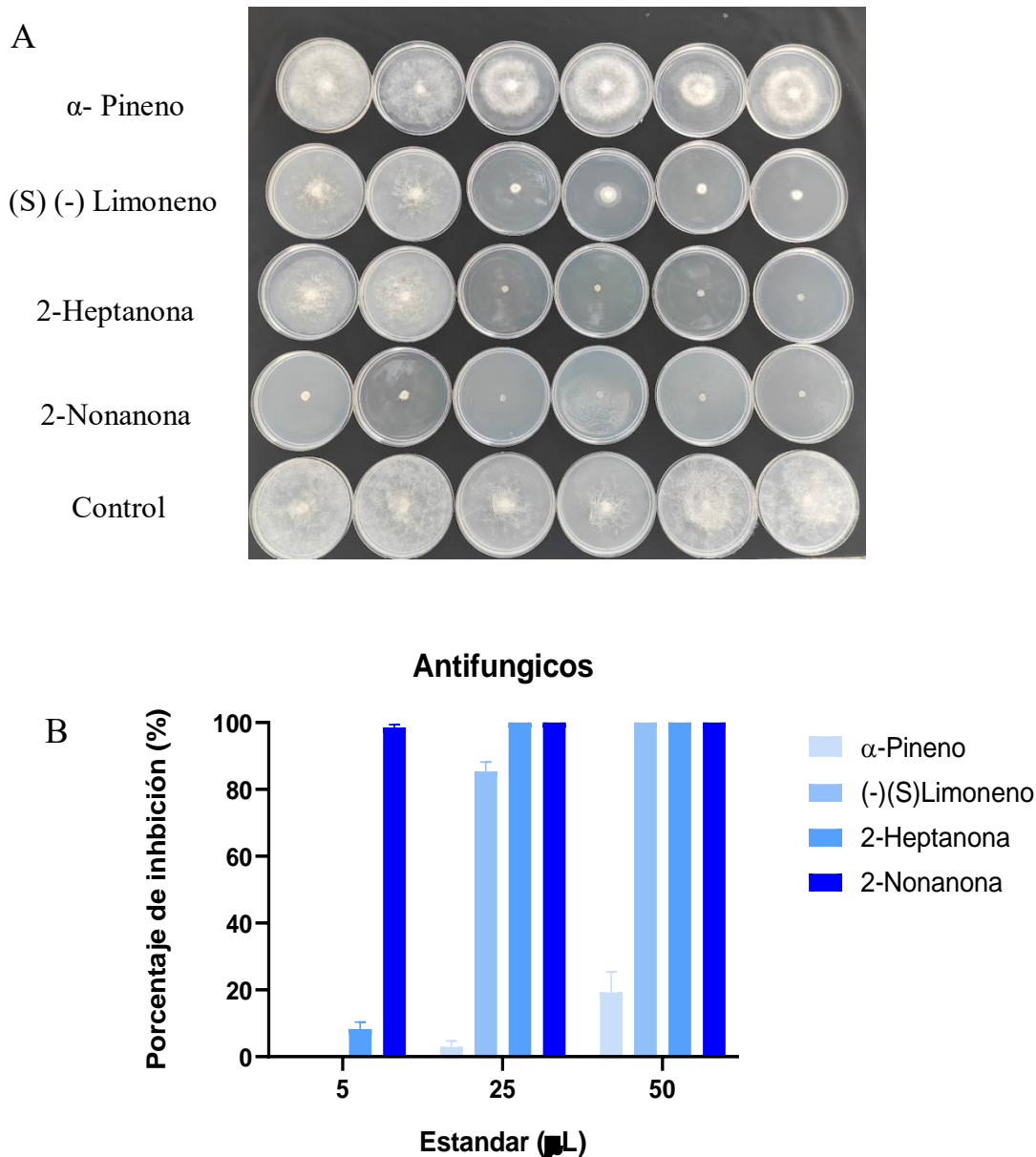


Figura 26. Inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* producidos por los compuestos α pineno, (S) (-) limoneno, 2-heptanona 2-nonanona. A) Crecimiento de micelio aéreo *R. stolonifer* de COVs después de 96h; B) Porcentaje de inhibición del micelio vegetativo. Los valores representaron el promedio de 2 réplicas \pm error estándar.

Los compuestos como α -pineno, (S)(-)limoneno, 2-heptanona, 2-nonanona, tienen efectos antifúngicos debido a que pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular fúngica por la presencia de anillos aromáticos y su hidrofobicidad así pueden afectar la función de las enzimas y proteínas fúngicas, inhiben el crecimiento micelial y la

germinación de esporangiosporas del hongo. Los compuestos actúan como un inhibidor de la síntesis de ergosterol en la membrana celular de los hongos (Cai et al., 2019; Konuk & Ergüden, 2020; Neri et al., 2007; Yan et al., 2020; Zhang et al., 2020). En esta investigación los experimentos demostraron que los COVs liberados por la cepa GB42 inhibieron la formación de esporas, con 2-heptanona y α -pineno se observaron deformaciones en los esporangios (figura 27). Con el compuesto (S)(-) Limoneno (25 μ L) se observó la presencia de esporangiosporas fragmentadas, aunque el esporangio tiene un tamaño similar al del control.

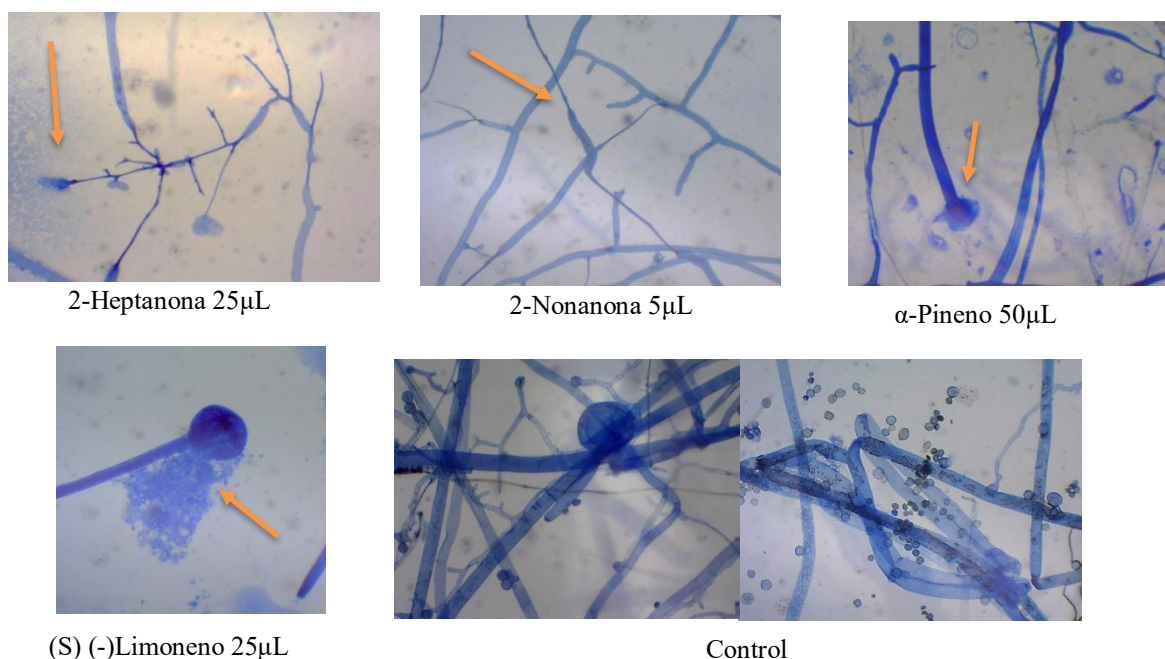


Figura 27. Cambios morfológicos en la estructura de *R. stolonifer* después de la exposición a los compuestos químicamente sintetizados. Las flechas naranjas muestran el daño estructural después de 96h post-exposición.

Inhibición de la germinación de esporas en dispositivo (cepa GB42).

Considerando que los compuestos al ser volátiles pueden difundirse con facilidad y su concentración puede diluir o aumentar de acuerdo con el espacio que lo contenga para estos experimentos se utilizó un desecador que tenía un volumen aproximado 2178.32cm³ (figura 28). En este espacio se realizaron diversos experimentos para conocer cuál es el número de placas con medio MM9 inoculadas con la cepa GB42 utilizando como fuente de carbono fructosa 3% necesarias lo que representaría la concentración de COVs para

inhibir 20 μL de una suspensión de esporas con una concentración de 10^3 esporas/mL inoculadas en medio PDA en un volumen previamente determinado para inhibir el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno se necesitaron cinco placas inoculadas con $100\mu\text{L}$ (10^8 UFC/mL).



Figura 28. Dispositivo para experimentación de COVs.

El grupo *Burkholderia* sensu lato ha contribuido en la producción de un gran número de compuestos (metabolitos secundarios) para el biocontrol, Rodríguez-Cisneros y colaboradores (2023) reportaron una lista 84 compuestos que han sido reportados como antibacterianos y antifúngicos contra diversos microorganismos que pueden provocar daños en las plantas, alimentos e incluso seres humanos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum orbiculare*, *Cylindrocarpon destructans*, *Diaporthe citri*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* y bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae*.

Estos compuestos pueden tener diferentes métodos de acción como inhibidores del transporte de electrones, la biosíntesis de proteínas y RNA polimerasa, también degrada la pared celular.

10. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación revelan que los 13 aislados bacterianos pertenecientes al grupo *Burkholderia* sensu lato tienen la capacidad de inhibir el crecimiento, la formación de esporangiosporas y la supervivencia del hongo *Rhizopus stolonifer*, debido al efecto fungistático y fungicida que emiten. La cepa GB42 es la más efectiva en términos de inhibición emite ocho compuestos previamente reportados y seis novedosos.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar *in situ* el efecto de los volátiles producidos por la cepa GB42 perteneciente al grupo *Burkholderia* sensu lato en el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate variedad Cherry (*Solanum Lycopersicum* Var. *Cerasiforme*).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los cuatro compuestos antifúngicos identificados utilizando estándares de referencia.
- Evaluar el efecto de fumigación del fruto mediante análisis metabolómico del sabor volátil del fruto del tomate, entre otras propiedades organolépticas de importancia comercial.
- Secuenciar el genoma completo de la cepa GB42 y llevar a cabo un análisis bioinformático para identificar genes relacionados con los compuestos antifúngicos reportados.
- Comprobar que la cepa GB42 no es patógena para el ser humano y no presenta capacidad de adquirir ni expresar genes de patogenicidad.

12. REFERENCIAS.

- Agricultura, O. D. L. N. U. P. L. A. Y. L. (2019). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*”. *Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. <https://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>
- Alfaro Gutiérrez, I. C. (2011). *Cambios morfológicos y fisiológicos inducidos en Rhizopus stolonifer (Ehrenb.: Fr.) Vuill. Por efecto del quitosano, oligoquitosano y aceites esenciales*
- Antolak, H., Jeleń, H., Otlewska, A., & Kręgiel, D. J. F. R. I. (2019). Volatile compounds associated with growth of *Asaia bogorensis* and *Asaia lannensis*-unusual spoilage bacteria of functional beverages. *121*, 379-386.
- Antonio, M.-B., AYVAR-SERNA, S., DÍAZ-NÁJERA, J. F., & Carolina, N.-S. J. F. D. E. S. G. (2020). Antibiosis in vitro de *Trichoderma spp.*, contra *Rhizopus stolonifer* en fresa. *7*(1), 77-82.
- Ayed, A., Kalai-Grami, L., Ben Slimene, I., Chaouachi, M., Mankai, H., Karkouch, I., Technology. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces sp.* strain S97 against *Botrytis cinerea*. *31*(12), 1330-1348.
- Bach, E., Passaglia, L. M. P., Jiao, J., & Gross, H. J. C. R. I. M. (2022). *Burkholderia* in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. *48*(2), 121-160.
- Bach, E., Sant'Anna, F. H., dos Santos Seger, G. D., & Passaglia, L. M. P. J. G. (2022). Pangenome inventory of *Burkholderia sensu lato*, *Burkholderia sensu stricto*, and the *Burkholderia cepacia* complex reveals the uniqueness of *Burkholderia catarinensis*. *114*(1), 398-408.
- Balsells-Llauradó, M., Echeverria, G., Torres, R., Vall-llaura, N., Teixidó, N., Usall, J. J. P. B., & Technology. (2022). Emission of volatile organic compounds during nectarine-*Monilinia laxa* interaction and its relationship with fruit susceptibility to brown rot. *192*, 111997.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., & Barrera-Necha, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (soft rot). In *Postharvest decay* (pp. 1-44). Elsevier.

- Bautista-Baños, S., Ramos-García, M. d. L., Hernández-López, M., Córdova-Albores, L., López-Mora, L., Gutiérrez-Martínez, P., technology. (2012). Use of scanning and transmission electron microscopy to identify morphological and cellular damage on phytopathogenic fungi due to natural products application. *I*, 401-405.
- Blancard, D. (2011). *Enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa Libros.
- Boronat, A., & Rodríguez-Concepción, M. J. B. O. I. (2015). Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. 3-18.
- Brückner, R., & Titgemeyer, F. J. F. m. l. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *209*(2), 141-148.
- Cai, R., Hu, M., Zhang, Y., Niu, C., Yue, T., Yuan, Y., & Wang, Z. J. L. (2019). Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*. *106*, 50-56.
- Caicedo, Y. C., Ortiz, T. R. B., & Mancilla, A. Á. J. I. R. D. I. D. I. T. (2010). Emisiones de compuestos orgánicos volátiles de origen biogénico y su contribución a la dinámica atmosférica. *5*(1), 77-86.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., Venturini, M. E. J. P. B., & Technology. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *166*, 111208.
- Camacho-Coronel, X., Molina-Torres, J., & Heil, M. J. F. I. P. S. (2020). Sequestration of exogenous volatiles by plant cuticular waxes as a mechanism of passive associational resistance: a proof of concept. *11*, 121.
- Camacho Téllez, G. E., & Nieto Gómez, K. V. (2017). Evaluación de la capacidad antifúngica del extracto de champa sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en mora (*Rubus glaucus*).

- Cervantes Álvarez, I. (2016). *Diversidad y filogenia de Burkholderia sp. aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla].
- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., . . . Paparella, A. J. J. O. A. M. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *119*(2), 487-499.
- Chen, J.-H., Xiang, W., Cao, K.-X., Lu, X., Yao, S.-C., Hung, D., . . . Li, L.-B. J. M. (2020). Characterization of volatile organic compounds emitted from endophytic *Burkholderia cenocepacia* ETR-B22 by SPME-GC-MS and their inhibitory activity against various plant fungal pathogens. *25*(17), 3765.
- Chen, J., Wei, X., Lu, X., Ming, R., Huang, D., Yao, Y., . . . Huang, R. J. L. (2022). *Burkholderia cenocepacia* ETR-B22 volatile organic compounds suppress postharvest grey mould infection and maintain aroma quality of tomato fruit. *165*, 113715.
- Chin, J. H.-C., Samian, M. R., & Normi, Y. M. J. H. (2022). Characterization of polyhydroxyalkanoate production capacity, composition and weight synthesized by *Burkholderia cepacia* JC-1 from various carbon sources. *8*(3).
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R., & LiPuma, J. J. J. O. C. M. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *39*(10), 3427-3436.
- Delgado, N., Olivera, M., Cádiz, F., Bravo, G., Montenegro, I., Madrid, A., . . . Besoain, X. J. A. (2021). Volatile Organic Compounds (VOCs) produced by *Gluconobacter cerinus* and *Hanseniaspora osmophila* displaying control effect against table grape-rot pathogens. *10*(6), 663.
- Di Francesco, A., Di Foggia, M., & Baraldi, E. J. F. M. (2020). *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *87*, 103395.
- dos SANTOS, S. R. M., dos SANTOS, K. B., & de CASTRO, D. R. J. R. S. S. (2019). Estudo dos estágios de vida do fungo *Rhizopus stolonifer*: iniciação a prática laboratorial dentro da *Engenharia*. *1*(2), 130-140.

- Elshafie, H., Bufo, S., Racioppi, R., & Camele, I. J. I. J. O. D. D. (2013). Biochemical characterization of volatile secondary metabolites produced by *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola*. *5*(1), 181.
- Elshafie, H. S., & Camele, I. J. M. (2021). An overview of metabolic activity, beneficial and pathogenic aspects of *Burkholderia* sp. *11*(5), 321.
- Fang, Y., & Gu, Y. J. F. I. I. (2021). Regulation of plant immunity by nuclear membrane-associated mechanisms. *12*, 771065.
- FAOSTAT. (2023). *Datos sobre alimentación y agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. FAO. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- FIRA. (2019). *Panorama agroalimentario, tomate rojo*. Retrieved 2019 from <https://www.inforural.com.mx/wpcontent/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Tomate-rojo-2019.pdf>
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. J. B. C. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *105*, 27-39.
- Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., & De Boer, W. J. F. M. E. (2014). Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *87*(3), 639-649.
- García Nieto, D. A. (2020). *Estudio del efecto antagónico de idiolitos bacterianos contra rhizopus stolonifer en tomate (Solanum lycopersicum L.)*
- Ge, J., Liu, Z., Zhong, Z., Wang, L., Zhuo, X., Li, J., . . . Bai, R. J. B. C. (2022). Natural terpenoids with anti-inflammatory activities: Potential leads for anti-inflammatory drug discovery. *124*, 105817.
- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., & Weisskopf, L. J. J. O. C. E. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *39*, 892-906.

- Gutiérrez-del-Río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., Fernández-Calleja, L., Pérez-Valero, Á., Tuñón-Granda, M., . . . Lombó, F. J. A. (2021). Terpenoids and polyphenols as natural antioxidant agents in food preservation. *10*(8), 1264.
- Hartanti, A. T., Raharjo, A., & Gunawan, A. W. J. H. J. O. B. (2020). *Rhizopus* rotting on agricultural products in Jakarta. *27*(1), 37-37.
- Hernández-López, M., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R., & Abarca-Franco, A. J. R. M. D. F. (2019). Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*. *37*(1), 22-28.
- Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. *59*, 432-441.
- Huang, C., Zhang, L., Johansen, P. G., Petersen, M. A., Arneborg, N., & Jespersen, L. J. F. i. M. (2021). *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. *12*, 662785.
- Huo, Y., Chokkalingam, M., Kang, J.-P., Ahn, J.-C., & Yang, D.-C. J. A. O. M. (2020). *Paraburkholderia panacisoli* sp. nov., a potentially antagonistic bacterium against the root rot fungal pathogen *Cylindrocarpon destructans*, isolated from ginseng cultivation soil. *202*, 1341-1347.
- Hwang, H.-S., Han, J.-Y., & Choi, Y.-E. J. F. (2021). Enhanced emission of monoterpene 3-carene in *Pinus densiflora* infected by pine wood nematode and characterization of 3-carene synthase. *12*(5), 514.
- Islas Jiménez, C. G. (2021). *Estudio de efecto antagónico de una cepa bacteriana contra Fusarium oxysporum en jitomate Solanum lycopersicum L*
- Jiménez-Gómez, I. (2018). *Búsqueda y evaluación de antifúngicos producidos por el género Burkholderia dirigidos contra hongos patógenos en cultivo de café [Maestría Benemerita Universidad Autónoma de Puebla]*.

- Kai, M., Effmert, U., & Piechulla, B. J. F. I. M. (2016). Bacterial-plant-interactions: approaches to unravel the biological function of bacterial volatiles in the rhizosphere. *7*, 108.
- Kamran, S., Sinniah, A., Abdulghani, M. A., & Alshawsh, M. A. J. C. (2022). Therapeutic potential of certain terpenoids as anticancer agents: a scoping review. *14*(5), 1100.
- Kang, M.-J., Choi, Y.-S., & Kim, S. J. B. S. L. (2018). A Comparison of the Ability of Fungal Internal Transcribed Spacers and D1/D2 Domain Regions to Accurately Identify *Candida glabrata* Clinical Isolates Using Sequence Analysis. *24*(4), 430-434.
- Kang, M.-K., Eom, J.-H., Kim, Y., Um, Y., & Woo, H. M. J. B. L. (2014). Biosynthesis of pinene from glucose using metabolically-engineered *Corynebacterium glutamicum*. *36*, 2069-2077.
- Kong, W.-L., Rui, L., Ni, H., & Wu, X.-Q. J. F. I. M. (2020). Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 against *Colletotrichum gloeosporioides* in *Liriodendron chinense* × *tulipifera*. *11*, 1114.
- Konuk, H. B., & Ergüden, B. J. F. M. (2020). Phenolic–OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. *65*, 775-783.
- Lin, Y.-T., Lee, C.-C., Leu, W.-M., Wu, J.-J., Huang, Y.-C., & Meng, M. J. M. (2021). Fungicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Burkholderia gladioli* strain BBB-01. *26*(3), 745.
- Ling, L., Wang, Y., Cheng, W., Jiang, K., Luo, H., Pang, M., . . . Biotechnology. (2023). Research progress of volatile organic compounds produced by plant endophytic bacteria in control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *39*(6), 149.
- Liou, G.-Y., Chen, S.-R., Wei, Y.-H., Lee, F.-L., Fu, H.-M., Yuan, G.-F., & Stalpers, J. A. J. M. R. (2007). Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *111*(2), 196-203.

- Liu, A., Zhang, P., Bai, B., Bai, F., Jin, T., & Ren, J. J. P. D. (2020). Volatile organic compounds of endophytic *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 promote disease resistance in poplar. *104*(6), 1610-1620.
- Liu, C., Yin, X., Wang, Q., Peng, Y., Ma, Y., Liu, P., . . . Agriculture. (2018). Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. *98*(15), 5756-5763.
- Liu, J., Clarke, J.-A., McCann, S., Hillier, N. K., & Tahlan, K. J. M. S. (2022). Analysis of *Streptomyces* volatilomes using global molecular networking reveals the presence of metabolites with diverse biological activities. *10*(4), e00552-00522.
- Mahovic, M., Sargent, S., BARTZ, J. L., & LON KAN, E. J. U. O. F. I. E. P. H. (2009). E. Identificación y control postcosecha de las enfermedades del tomate en la Florida.
- Mayienga, S. C., F. (2021). Serie de documentos de trabajo estadísticos de la FAO. 33. 978-92-5-134803-1
- Merino Espinoza, I. U. (2020). *Evaluación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de un cepario obtenido de suelo rizosférico de diferentes regiones del estado de Puebla*
- Nazareth, T. d. M., Calpe, J., Luz, C., Mañes, J., & Meca, G. J. F. (2023). Manufacture of a potential antifungal ingredient using lactic acid bacteria from dry-cured sausages. *12*(7), 1427.
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S., & Bertolini, P. J. P. D. (2007). Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monilinia laxa* in stone fruit. *91*(1), 30-35.
- Parra González, E., Centeno Briceño, S., & Araque Calderón, Y. J. R. D. I. S. V. D. M. (2009). Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays L.*) bajo diferentes condiciones de cultivo. *29*(2), 103-109.
- Plascencia-Tenorio, R. I., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L. F., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G., & Angoa-Pérez, M. V. J. R. X. (2012).

Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. 8(3), 103-110.

Popiel, S., & Sankowska, M. J. J. O. C. A. (2011). Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid-phase microextraction with gas chromatography. 1218(47), 8457-8479.

Quintana-Rodriguez, E., Rivera-Macias, L. E., Adame-Alvarez, R. M., Torres, J. M., & Heil, M. J. F. E. (2018). Shared weapons in fungus-fungus and fungus-plant interactions. Volatile organic compounds of plant or fungal origin exert direct antifungal activity in vitro. 33, 115-121.

Ren, Y., Liu, S., Jin, G., Yang, X., & Zhou, Y. J. J. B. A. (2020). Microbial production of limonene and its derivatives: Achievements and perspectives. 44, 107628.

Rezende, J. L., Fernandes, C. C., Costa, A. O. M., Santos, L. S., Vicente Neto, F., Sperandio, E. M., . . . Technology. (2020). Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. 40, 405-409.

Rodríguez-Cisneros, M., Morales-Ruíz, L. M., Salazar-Gómez, A., Rojas-Rojas, F. U., & Estrada-de Los Santos, P. J. M. (2023). Compilation of the antimicrobial compounds produced by *Burkholderia* Sensu Stricto. 28(4), 1646.

Romoli, R., Papaleo, M., De Pascale, D., Tutino, M. L., Michaud, L., LoGiudice, A., . . . Bartolucci, G. J. M. (2014). GC-MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. TB41. 10, 42-51.

SAGARPA. (2017). Planeacion Agrícola Nacional (2017-2030). <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>

Sánchez Montero, J. M. J. M. D. I. R. A. N. D. F. (2009). Compuestos orgánicos volátiles en el medio ambiente.

- Sarria, S., Wong, B., Martín, H. G., Keasling, J. D., & Peralta-Yahya, P. J. A. S. B. (2014). Microbial synthesis of pinene. *3*(7), 466-475.
- Serret-López, M., Aranda-Ocampo, S., Espinosa-Victoria, D., Ortiz-Martínez, L. E., & Ramírez-Razo, K. J. R. M. D. F. (2021). Caracterización polifásica de *Burkholderia gladioli* aislada de cebolla y evaluación de su patogenicidad potencial para otros cultivos. *39*(1), 21-40.
- SIAP. (2022). *Panorama Agroalimentario* (2022). <https://online.pubhtml5.com/aheiy/gryd/#p=8>
- Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., & Perez-Rueda, E. J. B. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *4*(4), 236-243.
- Tetali, S. D. J. P. (2019). Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *249*, 1-8.
- Vega Aguilar, S. (2015). *Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género Burkholderia, en tres regiones del Estado de Puebla*
- Velázquez-del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sánchez, M. G., & Amora-Lazcano, E. J. R. M. D. F. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb.(Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *26*(1), 49-55.
- Wu, F., Tong, X., Zhang, L., Mei, L., Guo, Y., Wang, Y. J. B. S., & Technology. (2020). Suppression of *Rhizopus* fruit rot by volatile organic compounds produced by *Paenibacillus polymyxa* CF05. *30*(12), 1351-1364.
- Xie, S., Liu, J., Gu, S., Chen, X., Jiang, H., & Ding, T. J. A. O. M. (2020). Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. *70*(1), 1-10.

- Xu, T., Shi, L., Zhang, Y., Wang, K., Yang, Z., & Ke, S. J. E. J. O. M. C. (2019). Synthesis and biological evaluation of marine alkaloid-oriented β -carboline analogues. *168*, 293-300.
- Yamada, M., Yukita, A., Hanazumi, Y., Yamahata, Y., Moriya, H., Miyazaki, M., . . . Shimoi, H. J. F. S. (2018). Poly (3-hydroxybutyrate) production using mannitol as a sole carbon source by *Burkholderia sp.* AIU M5M02 isolated from a marine environment. *84*, 405-412.
- Yan, Q., Simmons, T. R., Cordell, W. T., Lozada, N. J. H., Breckner, C. J., Chen, X., . . . Pflieger, B. F. J. M. E. (2020). Metabolic engineering of β -oxidation to leverage thioesterases for production of 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone. *61*, 335-343.
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. J. N. P. C. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *15*(3), 1934578X20903555.
- Zhang, D., Qiang, R., Zhao, J., Zhang, J., Cheng, J., Zhao, D., . . . Zhu, J. J. F. I. M. (2022). Mechanism of a volatile organic compound (6-methyl-2-heptanone) emitted from *Bacillus subtilis* ZD01 against *Alternaria solani* in potato. *12*, 808337.
- Zhang, X., Gao, Z., Zhang, X., Bai, W., Zhang, L., Pei, H., & Zhang, Y. J. B. C. (2020). Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *141*, 104135.

13. ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo

MM9 modificado	
Compuesto	Cantidad
Agua	1L
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	1.0 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 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ 6H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ 2H 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

LB (Modificado)	
Compuesto	Cantidad
Agua	1 L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	7.5 g

PDA	
Compuesto	Cantidad
Agua	1 L
Infusión de papa	200 g
Dextrosa	20 g
Agar bacteriológico	15 g

NB	
Compuesto	Cantidad
Agua	1 L
Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Agar bacteriológico	15 g

PCAT	
Compuesto	Cantidad
Agua	1 L
MgSO ₄	0.1 g
Ácido azelaico	2.0 g
K ₂ HPO ₄	4.0 g
KH ₂ PO ₄	4.0 g
Extracto de levadura	0.2 g
Agar bacteriológico	15 g

Extracto de malta	
Compuesto	Cantidad
Agua	100 mL
Extracto de malta	0.5 g
Extracto de levadura	0.5 g
Glucosa	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Agar bacteriológico	15 g

ANEXO II. Secuencias *Rhizopus stolonifer*.

D1/D2

>*Rhizopus sp.* UAP202201

AATAACAATGATTTCCCTAGYWACGGCGAGTGAAGAGGAAAGAGCTCAAAG
TTGGAACCTGTTTGGCCTAGCTAAACTGGATTGTAAACTGTAGAAGTGTTTTC
CAGGCAATCCGAATTGAAAAGTCCTTTGGAACAGGGCATCATAGAGGGTGAG
AATCCCGTCTTTGATTTCGAGATAATTTTGTCTTTATGCGATACACTTTCAAAGA
GTCAGGTTGTTTGGGAATGCAGCCTAAATTGGGTGGTAAATCTCACCTAAAG
CTAAATATTGGCGAGAAACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATG
AAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGGA
ACCGTTTGGAGCCAGATTGGCTTGTCTGTAATCATTCTAGGCTTCGTGCCTGG
ATGCACTTGCAGGCTTGATGCCTGCCAACGACAATTTTGTTTGGGTGTAAAA
ACTATTGGAAATGTGGCCAATATTTATTTATTGGTGTATAGTCCTTTAGAAAA
TAGCCTGGATGGGATTGAGGAACGCAGTGAATGCTTCTTTAGGGAGGCAAAG
TCATTTATAGGGATTTTCGGATCAGACTGTAGCATTGTTGCAAGACTTGATGTT
TAAACCTATTTATGCTCTTTTATTCACTTAGGTTGTTGGCTTAATGACTCTAAAT
GAC

ITS

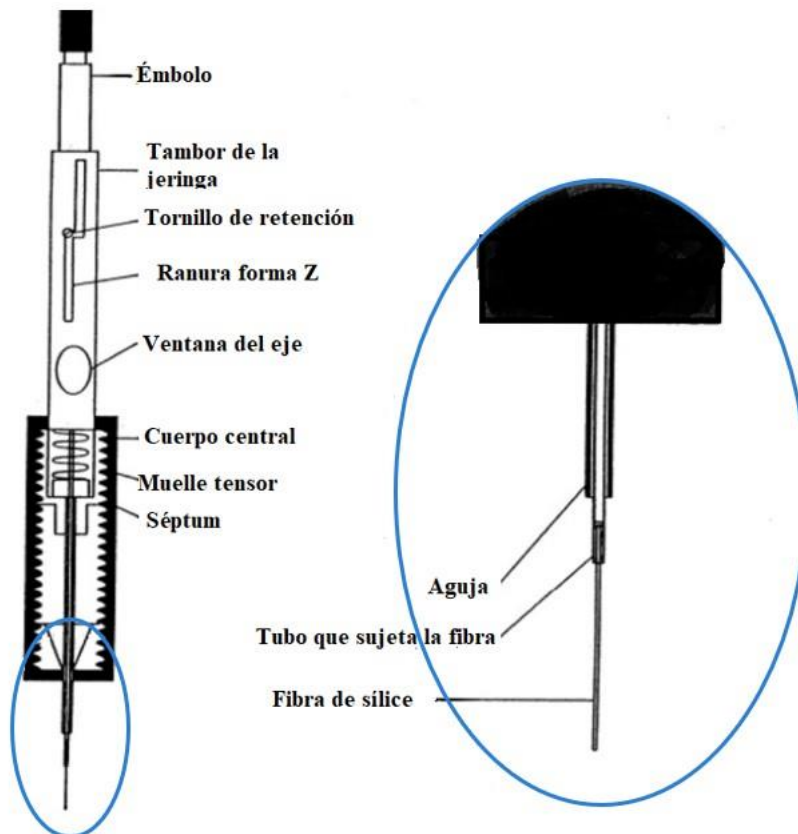
> *Rhizopus sp.* UAP202201

TCCGCCGACCATCTACTTATATGTATGAATGGGGCATAATTCTTTATGGATTATA
ACCATTTATTAACCTTTACCGTGAAAATATGGCGGTTATATAACGGTGATCGAT
TTAGGCTACATGGGTAGGTCTTTATCGGATATGATCCAAGCCAATCATTACTTT
AGGGTAATGGTGCCCAACCAAAAAGAAATAATATACCTTGAAATTCAGTTAATA
ATTTTTTTTTGTAATGAAAAAAGAAAAAACA ACTTTTAACAACGGA
TCTTTGGGTTCTCGCATCGATAAAAAACGTACCAAAGTGCGATAACTAGTGTG
AATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACCAACTTGCACTCTAAGG
TTTTCTTGGATTACACTTGCTTCATTATCATAAAAACCCCATCTGGATTA

ANEXO III. Procedimiento purificación de los productos de PCR.

1. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, añada de 2 a 7 volúmenes de DNA Binding a cada volumen de muestra de ADN. Mezclar brevemente con un vórtex.
2. Transfiera la mezcla a una columna Zymo-Spin™ suministrada³ en un tubo de recolección.
3. Centrifugar durante 30 segundos. Desechar el flujo.
4. Añadir 200 µL de tampón de lavado de ADN a la columna. Centrifugar durante 30 segundos. Repita este paso de lavado.
5. Añadir ≥ 6 µL de tampón de elución de ADN⁴ o agua⁵ directamente a la matriz de la columna e incube a temperatura ambiente durante un minuto. Transfiera la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y centrifugar durante 30 segundos para eluir el ADN. El ADN ultrapuro ya está listo para su uso.

ANEXO IV. Dispositivo Microextracción en fase sólida (SPME)(Popiel & Sankowska, 2011)



ANEXO V. Tabla de asimilación de compuestos reportados en la base de datos BAC DIVE

<i>Paraburkholderia panocisoli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
3-hidrobenczoato	D- glucosa	D-glucosa
3-hidroxibutirato	D- manitol	D-manitol
4-hidroxibenczoato	D- manosa	D-manosa
D-manitol	Decanoato	Decanoato
D-sorbitol	Gelatina*	Gluconato
Escualina*	Gluconato	L-arabinosa
Glucosa °	L- arabinosa	malato
Hexanoato	Malato	N-acetilglucosamina
Itaconato	N- acetilglucosamina	
L-alanina		
L-fucosa		
L-histidina		
L-prolina		
L-ramnosa		
lactato		
Malato		
melibiosa		
N-acetil-D glucosamina		
2-deshidro-D-gluconato de potasio		
5-deshidro-D-gluconato de potasio		
gluconato de potasio		
Sacarosa		
Tirosina*		

Compuestos metabolizados por *hidrolisis, °fermentación.

ANEXO VI. Investigaciones realizadas o trabajos y publicaciones presentadas.



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología
y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.**

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A

Cecilia Pérez González y colaboradores

Por haber obtenido el **3er. Lugar** en la categoría poster virtual en el XI Congreso REDBIO 2022 con el trabajo titulado:
VOLÁTILES BACTERIANOS QUE INHIBEN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Rhizopus stolonifer* PATÓGENO DE HORTALIZAS Y FRUTOS MADUROS
Mérida Yucatán, 14 de octubre del 2022

Antonia Gtz. M.

Dra. Antonia Gutiérrez Mora
Presidenta Congreso REDBIO



Dr. Sergio Casas Flores
Secretario Congreso REDBIO

VOLATILES BACTERIANOS QUE INHIBEN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE *Rhizopus stolonifer*, PATÓGENO DE HORTALIZAS Y FRUTOS MADUROS.

Cecilia Pérez-González¹, Lidia Esmeralda García-Díaz², Ricardo Carreño López¹, Lucía Soto Urzua¹, Vianey Marín-Cevada¹.

¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ²Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio, Cd. Universitaria, Puebla, Puebla.
vianey.marin@correo.buap.mx

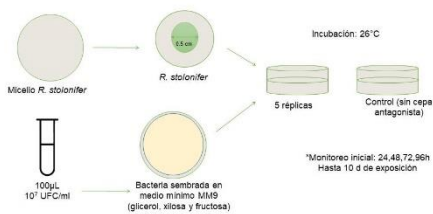
Introducción.

Rhizopus stolonifer uno de los principales agentes causales de la pudrición de numerosas frutas y hortalizas postcosechadas. Perjudica a los productos envasados en pocos días mediante hidrólisis por su habilidad de destrucción de tejidos. En este trabajo se evaluó el efecto antagonístico de los compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por bacterias género *Burkholderia sensu lato* contra *R. stolonifer*.

Métodos.

La actividad antagonística de los COV producidos por 14 cepas bacterianas pertenecientes al género *Burkholderia sensu lato* se determinó mediante un sistema de doble placa utilizando diferentes fuentes de carbono (fig.1). Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de dos vías. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p \leq 0,05$.

Ensayo de doble placa



$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Crecimiento micelial control} - \text{Crecimiento micelial con tratamiento antagonico}}{\text{Crecimiento micelial control}} \times 100$$

Fig. 1 Método de ensayo doble placa para evaluar a los compuestos volátiles producidos por cepas género *Burkholderia sensu lato* contra *R. stolonifer*.

Resultados.

Se observaron los efectos antagonísticos de las cepas con diferente fuente de carbono en el medio (fig. 2). Las cepas GA02 β y D336 mostraron el mayor porcentaje de inhibición micelial, 53,25% con fructosa (2%); y 57,27% con glicerol (3%), respectivamente (tabla 1).

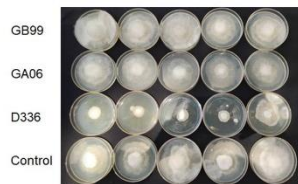


Fig. 2. Crecimiento micelial de *R. stolonifer* expuesto a compuestos volátiles producidos por cepas género *Burkholderia sensu lato* a las 96 h después de la inoculación.

Cepas	Fuente de carbono	Inhibición micelial (%)
GB42	Xilosa (2%)	46,46 \pm 3,80
	Glicerol (3%)	40,10 \pm 2,45
D336	Fructosa (1%)	20,59 \pm 1,30
	Glicerol (3%)	57,27 \pm 1,50
GA02 β	Fructosa (2%)	53,25 \pm 2,80
	Glicerol (3%)	38,06 \pm 2,08

Tabla 1. Porcentaje de inhibición a las 96h después de exposición de COVs producidos por cepas pertenecientes al género *Burkholderia sensu lato*.

Solo la cepa GB42 presentó una actividad antagonística y fungicida después de 10 d de exposición. Se obtuvo un porcentaje de inhibición de 85,23% y 84,02% utilizando como fuente de carbono glicerol (5%) y fructosa (3%) (fig.3A) y se observó crecimiento microaerofílico de *R. stolonifer*, pero al realizar la prueba de viabilidad no se observó crecimiento después de las 72h. (fig.3B). El efecto antagonístico de cepa GB42 contra *R. stolonifer* mostró diferencias significativas con respecto al control (Fig. 4A) y se observó daño estructural en *R. stolonifer* (fig.4B).

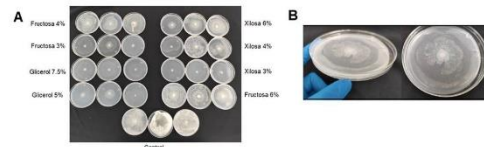


Fig. 3. (A) Crecimiento micelial de *R. stolonifer* expuesto a compuestos volátiles producidos por cepa GB42 a los 10 d después de la inoculación (B) Crecimiento micelial en condiciones microaerofílicas.

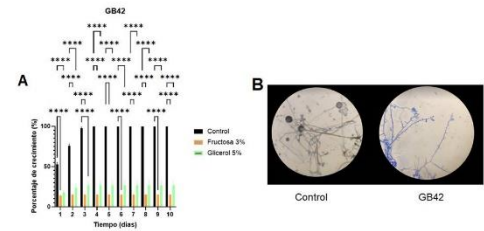


Fig.4. Porcentaje de crecimiento de la cepa GB42 utilizando como fuentes de carbono glicerol y fructosa. (B) Alteraciones morfológicas en el micelio de *R. stolonifer* observada al microscopio con el objetivo de 10x.

Conclusiones.

Las cepas de *Burkholderia sensu lato* producen COV que inhiben el crecimiento *Rhizopus stolonifer* en medio mínimo y su efecto antagonístico depende de la fuente de carbono utilizada.

Agradecimientos.

Agradecemos a la VIEP por el financiamiento otorgado. Pérez-González, agradece la beca CONACYT de estudios de posgrado.

Referencias.

Camacho Téllez, 2017. Tesis de Ingeniería, Universidad de La Salle, Fac. Ing. Quím.
Tenorio-Salgado et al., 2013. Bioeng. 4(4), 236-243.
Wu et al., 2020. Biocontrol Sci Technol. 30(12), 1351-1364.