



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“ESTUDIO DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE
UNA CEPA BACTERIANA CONTRA
MICROORGANISMOS AISLADOS DE HOJAS
DE PLÁTANO CON SIGNOS DE INFECCIÓN”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

QFB. ESTEPHANIE ELIZABETH LUNA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. JESUS MUÑOZ ROJAS

CODIRECTOR DE TESIS:

D.C ABDELALI DADDAOUA



Puebla, Pue. a 3 de abril 2025.

**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 **Estephane Elizabeth Luna Pérez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Estudio del potencial inhibitorio de una cepa bacteriana contra microorganismos aislados de hojas de plátano con signos de infección”

A nuestro juicio, la alumna **Estephane Elizabeth Luna Pérez** 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. Verónica Quintero Hernández


D.C. Paulina Estrada de los Santos


D.C. María del Rocío Bustillos Cristales


D.C. Antonino Baez Rogelio

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

DEDICATORIA

*A quien desde niña me mostró que la ciencia es magia hecha realidad:
al Químico Martín Luna, mi padre.*

*Gracias por inspirarme a seguir este camino,
por tu apoyo incondicional y por tus enseñanzas.*

*Este logro académico es también tuyo.
¡Gracias, papi!*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, expreso mi más sincero agradecimiento al Dr. Jesús Muñoz Rojas, mi asesor, por su invaluable guía, paciencia y enseñanzas durante estos años. Su visión, consejos y constante apoyo han sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional.

Asimismo, extiendo mi gratitud al Dr. Abdelali Daddaoua, mi codirector, por su excelente orientación durante la redacción de la tesis. Sus aportes y su atención al detalle fueron esenciales para este proyecto.

A mi comité tutorial, conformado por la Dra. Verónica Quintero Hernández, el Dr. Antonino Báez Rogelio, la Dra. Paulina Estrada de los Santos y la Dra. Rocío Bustillos Cristales, les agradezco profundamente sus valiosas observaciones, recomendaciones y el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo de tesis. Sus aportaciones enriquecieron significativamente este proyecto.

De manera especial, quiero reconocer a la Dra. Dolores Castañeda por su asesoramiento experto en cromatografía de gases, técnica que fue clave para el cumplimiento del último objetivo de esta investigación.

A los amigos y compañeros que hice en el camino y me ayudaron cuando lo necesité: Lex, Alejandra, Julieta, ¡Gracias!

Al Maestro en Ciencias Yamil Hernández Urquiera por su apoyo incondicional.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada, la cual hizo posible mis estudios de maestría y el desarrollo de este proyecto en el Instituto de Ciencias Microbiológicas de la BUAP. Su respaldo económico fue indispensable para alcanzar esta meta académica.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 El género <i>Pseudomonas</i> como PGPB y agente de control biológico.....	15
2.2 <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	17
2.3 Hongos fitopatógenos en cultivos de plátano.....	18
2.4 Control de hongos fitopatógenos en el cultivo de plátano.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Identificación molecular de la bacteria de estudio.....	24
6.1.1 Extracción de ADN.....	24
6.1.2 PCR y purificación de genes <i>housekeeping</i>	24
6.2 Construcción de árbol filogenético concatenado.....	25
6.3 Generación de oligonucleótidos para amplificación del gen <i>phzF</i> ,.....	25
6.4 Aislamiento de microorganismos de hoja de plátano con signos de infección.....	26
6.5 Identificación molecular de microorganismos inhibidos por la cepa rizosférica.....	27
6.6 Búsqueda del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	27
6.7 Pruebas de antibiosis de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> EMM2 contra los microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada.....	28
6.7.1 Inhibición simultánea.....	28
6.7.2 Inhibición doble capa.....	28
6.7.3 Cultivo dual.....	29

6.8 Pruebas de patogenicidad en hojas de plátano con los hongos aislados.....	30
6.9 Extracción y purificación parcial de la sustancia inhibitoria.....	31
6.9.1 Curva de producción de la sustancia inhibitoria.....	31
6.9.2 Extracción de sustancia inhibitoria.....	31
6.10 Determinación de tamaño aproximado de las moléculas y su estabilidad térmica.....	32
6.11 Cromatografía de capa fina en papel filtro de la sustancia inhibitoria y doble capa.....	33
6.12 Purificación parcial por cromatografía de capa fina de la sustancia inhibitoria.....	34
6.13 Caracterización parcial por cromatografía de gases acoplada a masas (GS/MS) de las sustancias inhibitorias.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Identificación molecular de bacteria de estudio.....	35
7.2 Amplificación del gen <i>phzF</i>	36
7.3 Aislamiento de microorganismos de hoja de plátano con signos de infección.....	37
7.4 Caracterización molecular de hongos y bacterias aisladas de la hoja de plátano infectada.....	37
7.5 Búsqueda del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	39
7.6 Pruebas de antibiosis de <i>Pseudomonas chlororapis</i> EMM2 contra los microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada.....	40
7.6.1 Antibiosis por doble capa de microorganismos aislados de la hoja de plátano con signos de infección.....	40
7.6.2 Detección de antibiosis mediante inhibición simultánea de microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada.....	41
7.6.3 Inhibición por cultivo dual para detección de inhibición micelial en hongos estudiados.....	43
7.7 Pruebas de patogenicidad.....	46
7.8 Extracción y purificación de sustancia inhibitoria.....	47

7.8.1 Curva de producción de las sustancia inhibitoria.....	47
7.8.2 Extracción de sustancia inhibitoria.....	48
7.9 Determinación de tamaño aproximado de las moléculas y su estabilidad térmica.....	49
7.10 Cromatografía en capa fina (TLC) con papel filtro y comprobación de actividad inhibitoria por la metodología de doble capa.....	49
7.11 Purificación por TLC.....	50
7.12 Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de la/s sustancia/s inhibitoria parcialmente purificada por TLC.....	51
8 DISCUSIÓN.....	53
9 CONCLUSIONES.....	57
10 REFERENCIAS.....	58
11 ANEXOS.....	68
12 PUBLICACIONES.....	70

GLOSARIO DE ABREVIACIONES

°C	Grados Celcius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTP	Trifosfatos de desoxinucleótidos
g	Gramos
GS/MS	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
ICM	Inhibición Crecimiento Micelial
ITS	Región Espaciadora Transcrita Interna
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	milimetro
mV	Milivoltio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
TLC	Cromatografía en Capa Fina
UA	Unidades Arbitrarias
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
µL	Microlitros
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La rizósfera se considera como un ecosistema complejo que alberga diversos microorganismos, incluidas las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, Plant Growth-Promoting Bacteria, por sus siglas en inglés), las cuales confieren múltiples beneficios a las plantas, siendo uno de ellos la producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria, que pueden contribuir al control de fitopatógenos. En este estudio, se caracterizó una cepa bacteriana aislada de la rizósfera de *Zea mays* (maíz rojo autóctono) y se evaluó su capacidad para el biocontrol de diversos microorganismos fitopatógenos.

Previo a los ensayos de antagonismo, la bacteria fue identificada mediante análisis filogenético basado en la secuenciación de los genes 16S ARNr, *rpoB* y *gyrB*, lo que permitió su clasificación dentro del género *Pseudomonas* y su identificación como *Pseudomonas chlororaphis*. Paralelamente, se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos a partir de hojas de plátano (*Musa* spp.) con signos de infección. Se obtuvieron un total de 36 aislamientos microbianos, de los cuales 18 correspondieron a hongos y 28 a bacterias.

Para evaluar el potencial inhibitorio de *P. chlororaphis* EMM2, se realizaron ensayos de antibiosis frente a la mayoría de los microorganismos aislados, observándose una amplia capacidad inhibitoria de la cepa bacteriana. La caracterización de los hongos se llevó a cabo mediante el análisis de sus características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas. Adicionalmente, la amplificación y secuenciación de la región ITS, usando los cebadores ITS1 e ITS4, reveló que todos los hongos aislados presentaban una estrecha relación filogenética con el género *Fusarium*.

Para la extracción de los compuestos bioactivos producidos por *P. chlororaphis* EMM2, se empleó cloroformo como solvente, evaluándose la actividad inhibitoria de cada una de las fases obtenidas. Se evidenció la formación de halos de inhibición en la fase orgánica y en la interfase, lo que sugiere la presencia de metabolitos con actividad antimicrobiana. Cabe destacar que la producción y extracción de estas sustancias inhibitorias solo se logró cuando la bacteria fue cultivada en medio GYP (anexo 1), en el cual el glicerol actúa como fuente de carbono principal.

Estos hallazgos resaltan el gran potencial de *P. chlororaphis* EMM2 como un agente biocontrolador contra fitopatógenos, abriendo nuevas perspectivas para su aplicación en estrategias de manejo integrado de enfermedades en cultivos de gran importancia agrícola.

ABSTRACT

The rhizosphere is considered a complex ecosystem that harbors various microorganism, including plant growth-promoting bacteria (PGPB), which confer multiple benefits to plants. One of these benefits is the production of secondary metabolites with inhibitory activity, which can contribute to the control of phytopathogens. In this study, a bacterial strain isolated from the rhizosphere of *Zea mays* (native red maize) was characterized, and its potential for biocontrol of various phytopathogenic microorganisms was evaluated.

Prior to antagonism assays, the bacterial strain was identified through phylogenetic analysis based on the sequencing of the 16S rRNA, *rpoB*, and *gyrB* genes, allowing its classification within the genus *Pseudomonas* and its identification as *Pseudomonas chlororaphis*. Simultaneously, microbial isolation was performed from banana (*Musa* spp.) leaves showing signs of infection. A total of 36 microbial isolates were obtained, comprising 18 fungal and 28 bacterial strains.

To assess the inhibitory potential of *P. chlororaphis* EMM2, antibiosis assays were conducted against most of the isolated microorganisms, revealing a broad inhibitory capacity of the bacterial strain. Fungal characterization was performed based on their macroscopic and microscopic morphological features. Additionally, amplification and sequencing of the ITS region using the ITS1 and ITS4 primers revealed that all isolated fungi had a close phylogenetic relationship with the *Fusarium* genus.

For the extraction of bioactive compounds produced by *P. chlororaphis* EMM2, chloroform was used as a solvent, and the inhibitory activity of each obtained phase was evaluated. The formation of inhibition halos was observed in the organic phase and at the interface, suggesting the presence of metabolites with antifungal activity. Notably, the production and extraction of these inhibitory substances were only achieved when the bacterium was cultured in GYP medium, where glycerol served as the primary carbon source.

These findings highlight the significant potential of *P. chlororaphis* EMM2 as a biocontrol agent against phytopathogens, opening new perspectives for its application in integrated disease management strategies in agriculturally important crops.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos como controladores de enfermedades en cultivos (bactericidas y fungicidas) ha afectado gravemente al medio ambiente debido a su naturaleza química (1). Los agroquímicos se pueden clasificar en fertilizantes y pesticidas, ambos compuestos alteran la microbiota del suelo, contaminan mantos acuíferos cercanos a los suelos donde fueron aplicados debido a la lixiviación de éstos, contribuyen con el efecto invernadero al vaporizarse y causan una desertificación de los suelos volviéndolos infértiles, entre otros efectos (1,2).

Además de su impacto ambiental, los agroquímicos representan un riesgo significativo para la salud humana. Diversas investigaciones han evidenciado que la exposición directa a estos compuestos puede generar alteraciones dermatológicas, endocrinas, respiratorias, reproductivas y neurológicas, e incluso incrementar el riesgo de desarrollar cáncer (3). Asimismo, su impacto no se limita al contacto directo, sino que también se ha probado que los pesticidas pueden afectar a los consumidores de manera indirecta a través de la ingesta de alimentos con residuos de estos productos, dado que la mayoría de los cultivos tratados con agroquímicos presentan trazas detectables en sus tejidos (4).

En este contexto, el biocontrol surge como una alternativa prometedora para reducir el uso de pesticidas. Esta estrategia se basa en la utilización de organismos benéficos para combatir microorganismos fitopatógenos, ofreciendo como principales ventajas su seguridad para el consumidor y su bajo impacto ambiental (5). Dentro de los organismos con capacidad para controlar enfermedades en cultivos se incluyen algas, insectos, hongos, levaduras, fagos y bacterias (6).

Las bacterias se encuentran entre los agentes de control biológico (BCA) más estudiados, debido a su capacidad para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria frente a otros microorganismos (7). Una fuente importante de BCA bacterianos es la rizósfera que corresponde a la zona que rodea las raíces de las plantas y que está influenciada por los exudados radiculares. Dentro de este grupo, bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp. y *Streptomyces* spp. destacan por su amplio estudio y eficacia en el control biológico de fitopatógenos (7,8).

En este contexto, los mecanismos mediante los cuales una bacteria puede adaptarse a su entorno e influir en el control de fitopatógenos clasifican en dos categorías: directos e indirectos (9) (Figura 1): Los mecanismos directos implican

una interacción directa con el fitopatógeno, y pueden dividirse en tres estrategias principales: antibiosis, competencia y micoparasitismo.

La antibiosis se basa en la producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria, entre los que se incluyen: bacteriocinas, antibióticos, lipopéptidos, surfactantes, compuestos volátiles orgánicos y enzimas líticas (Figura 2). Otro mecanismo empleado en el control biológico es la competencia por nutrientes, en la cual el agente biocontrolador despliega estrategias como la formación de biopelículas, el aumento de su movilidad y el aprovechamiento de nutrientes no biodisponibles para otros microorganismos. Finalmente, el micoparasitismo que es una forma de simbiosis antagónica que se fundamenta en la producción de enzimas capaces de degradar las estructuras del hongo parasitado (10,11,12).

Por otra parte, los mecanismos indirectos se basan en la estimulación de la resistencia sistémica inducida (ISR), un proceso promovido por bacterias PGPB. Estas bacterias estimulan el sistema de defensa de las plantas contra fitopatógenos al inducir la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa en las plantas incluyendo la síntesis del ácido jasmónico (JA), etileno y proteínas relacionadas con la patogénesis. Como resultado, las plantas obtienen una mayor resistencia frente a bacterias, hongos y virus fitopatógenos (13,14).

Además de inducir la respuesta de resistencia sistémica adquirida (ISR), los agentes de biocontrol pueden promover la protección e las plantas contra patógenos al activar el sistema inmunológico. Este fenómeno se debe a que las plantas son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP) y a la N-acil-homoserina lactonas, compuestos que desencadenan la estimulación del sistema inmune de la planta, dando lugar a su activación (15,9).

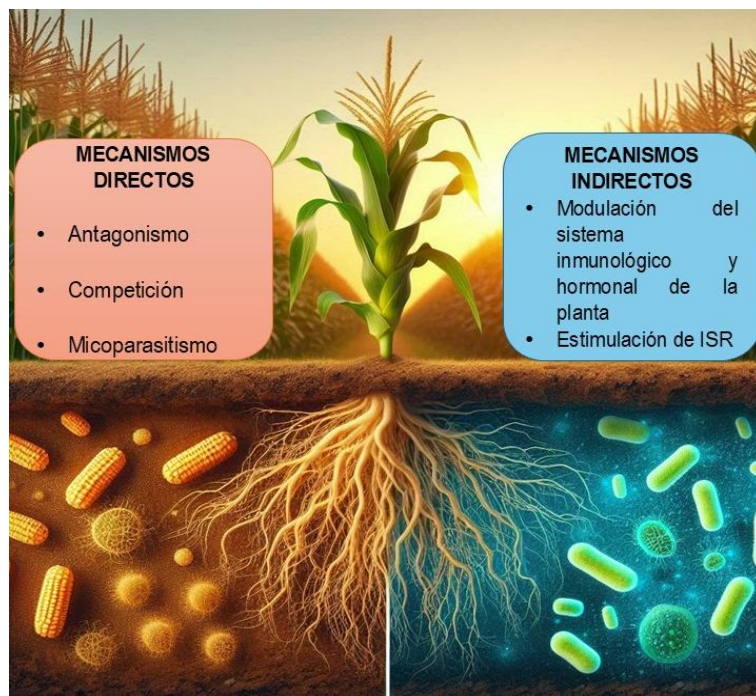


Figura 1. Mecanismos directos e indirectos de biocontrol por agentes de control biológico. Los mecanismos directos se basan en un contacto con otro microorganismo por medio de antagonismo, competición o micoparasitismo, con la finalidad de inhibirlo. Por otro lado, los mecanismos indirectos estimulan los sistemas inmunológicos, hormonales y la resistencia sistémica inducida para que la planta pueda erradicar al fitopatógeno.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son aquellas que se encuentran usualmente en la rizósfera de las plantas y que promueven el crecimiento de la planta mientras la protege de estrés abiótico o biótico. Por ello, las bacterias utilizadas para el biocontrol forman a su vez parte del grupo PGPB. Además de proteger contra fitopatógenos, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen fitohormonas como las auxinas y citoquininas que estimulan el crecimiento vegetal (16), además facilitan la asimilación de nutrientes como el fósforo, potasio, zinc, hierro y nitrógeno. Dentro de los mecanismos empleados para la captación de estos compuestos se encuentran: la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización del fósforo y la producción de sideróforos (17).

Una modalidad de aplicación de bacterias como agentes de biocontrol es mediante inoculantes microbianos, los cuales están compuestos por microorganismos benéficos como bacterias, hongos o algas, y su aplicación protege a los cultivos frente a fitopatógenos potenciales (18). Los inoculantes microbianos pueden ser aplicados en el suelo, en las semillas o sobre el follaje. Los microorganismos que componen los inoculantes pueden colonizar la rizósfera con facilidad, adherirse a las superficies vegetales, e incluso pueden introducirse en las plantas (19).

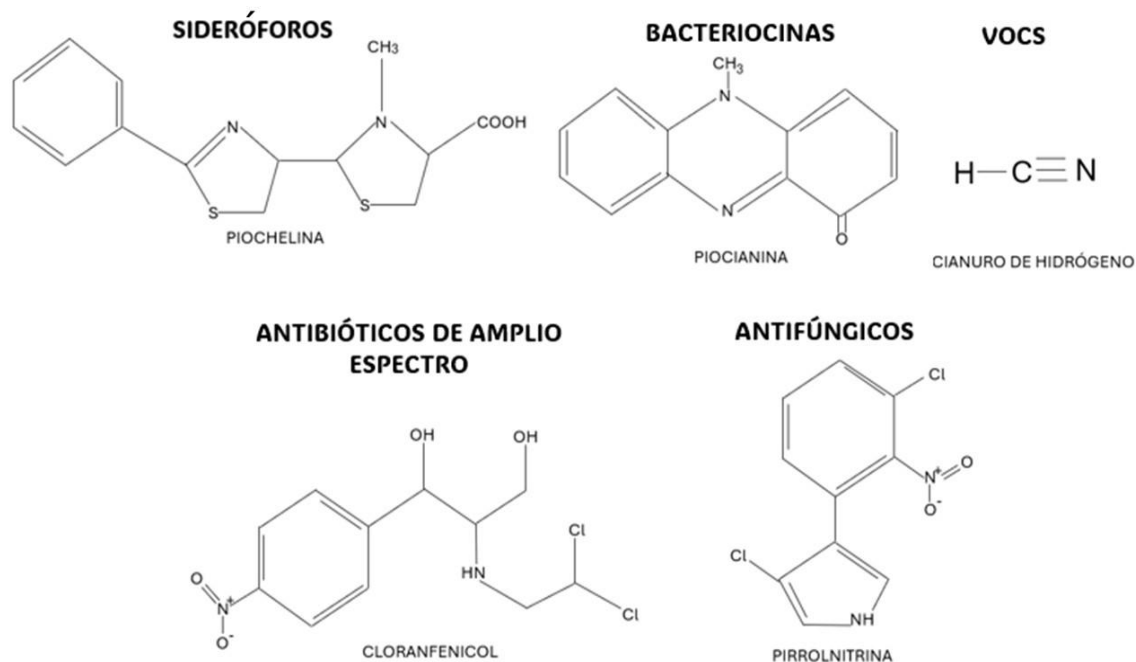


Figura 2. Metabolitos secundarios producidos por bacterias con actividad antimicrobiana. Los sideróforos, bacteriocinas, compuestos orgánicos volátiles (VOCS), antibióticos de amplio espectro y antifúngicos, son compuestos antimicrobianos producidos por diversos géneros bacterianos como el género *Pseudomonas* y *Streptomyces*.

En este proyecto se llevó a cabo la búsqueda de sustancias inhibitorias contra fitopatógenos de la hoja de plátano. Se realizaron ensayos de antagonismo para evaluar el potencial de una bacteria aislada de la rizósfera de maíz rojo autóctono contra hongos fitopatógenos aislados de la hoja del plátano. Posteriormente se identificó la bacteria mediante la secuenciación de los genes *housekeeping* 16S ADNr, *gyrB* y *rpoB*. Adicionalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad para evaluar el daño causado por los fitopatógenos a la hoja de plátano. Finalmente, se procedió a la purificación parcial de la sustancia inhibitoria producida por la bacteria rizosférica.

2. ANTECEDENTES

2.1 El género *Pseudomonas* como PGPB y agente de control biológico

Las bacterias del género *Pseudomonas* son Gram-negativas, aerobias facultativas, quimioheterótrofas y móviles gracias a un flagelo polar que poseen. Estas bacterias son muy diversas y comprenden más de 250 especies, además son ubicuas siendo encontradas principalmente en el suelo y ambientes marinos, usualmente se encuentran asociadas con plantas y animales (20,24). Debido a

su adaptabilidad metabólica, asociación a raíces, a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos y a la capacidad de promover el crecimiento vegetal, son de las bacterias biocontroladoras más estudiadas (21).

Asimismo, *Pseudomonas* tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno y la producción de sideróforos (22).

Entre las fitohormonas producidas se encuentra el ácido indol acético (AIA), una auxina que estimula el crecimiento vegetal e incrementa la longitud de las raíces, también regula el metabolismo y la división celular de la planta (23). Otra molécula producida por estas bacterias es la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC), la cual está involucrada en la penúltima reacción de biosíntesis de etileno; una hormona vegetal clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (24).

La solubilización de fósforo es muy importante ya que es uno de los minerales más requeridos para el crecimiento de la planta, y es el segundo nutriente después de nitrógeno más limitado (25). El fósforo suele encontrarse en dos formas: como compuesto orgánico o inorgánico, siendo este último el más común. Las bacterias solubilizadoras de fosfato logran hacer biodisponible a este mineral para su utilización por parte de la planta, mediante la acción de enzimas extracelulares y la secreción de compuestos disolventes de minerales (26).

Asimismo, algunas especies y cepas de *Pseudomonas* tienen la capacidad de fijar nitrógeno, esta capacidad es altamente relevante ya que el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de la planta, pero la forma molecular en la que se encuentra es inaccesible para la planta, por ello es necesario que el nitrógeno atmosférico (N_2) se convierta en nitratos o nitritos para poder ser asimilado por las células vegetales (27). Finalmente, la producción de sideróforos por parte de bacterias del género *Pseudomonas* contribuye a prevenir la colonización por parte de fitopatógenos. (28,21).

En el suelo, el hierro se encuentra principalmente en forma de hidróxidos férricos insolubles, lo que limita su disponibilidad para muchos microorganismos. Sin embargo, los microorganismos productores de sideróforos pueden solubilizar el hierro, ya que estos compuestos se unen al metal, facilitando su asimilación. De este modo, los microorganismos obtienen una ventaja competitiva frente a los fitopatógenos y contribuyen al crecimiento de la planta (28).

Además de promover el crecimiento vegetal debido a los mecanismos ya mencionados anteriormente, el género *Pseudomonas* se considera un agente biocontrolador ampliamente estudiado debido a la su amplia producción de sustancias antimicrobianas, dentro de estos compuestos se encuentran: el 2,4-

diacetilfloroglucitol (DAPG), pirrolnitrina, pioluteorina, fenazinas, 2-hexil-5-propil resorcitol (HPR), VOCs y biosurfactantes (29,20).

El DAPG es un compuesto fenólico con actividad antibiótica de amplio espectro, fue aislado de cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, capaz de inhibir una amplia variedad de fitopatógenos incluyendo bacterias, hongos, oomicetos y nematodos (30,31). Otro compuesto antimicrobiano producido por el género *Pseudomonas* es la pirrolnitrina, la cual es derivada del fenilpirrol que tiene como precursor directo al L-triptófano. Este compuesto tiene una actividad de amplio espectro contra fitopatógenos fúngicos como *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expamsum*, entre otros (32).

La pioluteorina es un antimicrobiano producido exclusivamente por *Pseudomonas*, ya que no ha sido reportado en otro género. Estructuralmente, se compone de un anillo de resorcitol y una fracción de pirrol diclorado. Se ha demostrado que inhibe a bacterias y hongos patógenos como *Pythium ultimum*, el cual es un oomiceto que provoca marchitez y pudrición de raíz en plantas como maíz, papa, soya y trigo (33,34).

Las fenazinas son compuestos heterocíclicos con nitrógeno, y tienen la capacidad de inhibir una amplia gama de microorganismos como hongos, oomicetos, parásitos y bacterias (35). Hay diversos géneros bacterianos que producen este metabolito antimicrobiano, siendo uno de ellos *Pseudomonas*. Hay más de 100 fenazinas descritas hasta la fecha, una de ellas es la fenazina ácido carboxílico (PCA), y debido a su amplio poder de inhibición contra hongos fitopatógenos actualmente es usada como biofungicida (35,36).

El 2-hexil-5-propilresorcitol (HPR) es un compuesto estructuralmente parecido al DAPG pero con una ruta biosintética diferente, y es conocido por su potencial para inhibir hongos fitopatógenos como *Rosellinia necatrix* que afecta la raíz del aguacate (37).

Por otro lado, los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) son metabolitos secundarios producidos por diversos microorganismos, siendo uno de ellos las bacterias del género *Pseudomonas*. Los VOCs son compuestos de bajo peso molecular, bajo punto de ebullición y polaridad débil. Estas características les permiten recorrer distancias más largas en comparación con otros antimicrobianos, son eficaces contra parásitos, hongos, insectos y bacterias (38,39).

Pseudomonas produce dos tipos de biosurfactantes: los ramnolípidos y los lipopéptidos no ribosomales. Estos son compuestos tensioactivos con propiedades antimicrobianas debido a que desestabilizan las membranas biológicas ocasionando una lisis celular, y son eficaces principalmente contra hongos y oomicetos (40). Gracias a su capacidad para promover el crecimiento

vegetal y de controlar e inhibir a microorganismos fitopatógenos, *Pseudomonas* es uno de los géneros más prometedores en la biotecnología agrícola.

2.2 *Pseudomonas chlororaphis*

La bacteria *Pseudomonas chlororaphis* pertenece al grupo de *Pseudomonas fluorescens*, el cual es el grupo principal de bacterias PGPB del género *Pseudomonas*. Dentro de *P. chlororaphis* se encuentran las subespecies: *P. aureofaciens*, *P. aurantiaca* y *P. piscium*. Las cepas del grupo *P. fluorescens* se caracterizan por tener propiedades biocontroladoras, tal como la promoción del crecimiento vegetal, la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y el antagonismo contra fitopatógenos (41,42).

Tabla 1. Compuestos antimicrobianos producidos por *Pseudomonas chlororaphis*. Los compuestos marcados con color verde se clasifican como antifúngicos, los marcados con color azul como antibióticos, con color gris como VOCs y los marcados con color rojo como sideróforos.

COMPUESTO	EFEECTO
Ácido fenazina-1-carboxílico (PCA)	Altera el funcionamiento mitocondrial, limitando la producción de energía celular, lo que conlleva a una muerte micelial (44).
Fenazina-1-carboxamida (PCN)	Genera especies reactivas de oxígeno en la célula, causando un estrés oxidativo que afecta la viabilidad celular (45).
Pirrolnitrina (PRN)	Ataca a la membrana celular, afecta el transporte de electrones, impide la síntesis de proteínas, ARN y ADN (46).
2-hexil,5-propil resorcitol (HPR)	Afecta el crecimiento de las hifas al ocasionar un daño irreversible en el ADN, de esta forma evita una colonización del hongo (47).
2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG)	Ocasiona una disfunción del potencial de membrana, altera la homeostasis celular y produce estrés oxidativo (48).
2,3-butanediol	Induce la resistencia sistémica inducida (ISR), aumentando las defensas de la planta para inhibir el crecimiento de fitopatógenos (49).
Cianuro de hidrógeno	Es un inhibidor de enzima citocromo C oxidasa, desestabilizando la cadena transportadora de electrones llevando a una muerte celular (50).
Pioverdina	Agente quelante de hierro que permite disponer de este mineral a la bacteria productora para su supervivencia y priva de este nutriente a fitopatógenos, limitando su proliferación (51).

Los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas chlororaphis* son de gran interés biotecnológico debido a su alto potencial para inhibir a fitopatógenos (Tabla 1), los compuestos producidos se pueden clasificar en: antibióticos, antifúngicos, sideróforos y VOCs (43,41).

Además de la producción de compuestos antimicrobianos, *Pseudomonas chlororaphis* tiene la capacidad de sintetizar fitohormonas y enzimas que promueven el crecimiento vegetal. Un ejemplo de ello, es la producción del ácido indol-3-acético (AIA), una fitohormona que promueve el crecimiento de raíces y favorece el desarrollo de frutos. También se ha reportado la producción de la enzima ACC desaminasa por parte de esta bacteria. La ACC desaminasa reduce los niveles de etileno, una fitohormona responsable del proceso de maduración vegetal; al disminuir los niveles de etileno esta enzima previene la senescencia vegetal y promueve su crecimiento (52,53).

Debido a las características mencionadas anteriormente, *P. chlororaphis* es una de las bacterias con mayor potencial biocontrolador y, actualmente, algunos de sus metabolitos secundarios, como el 2,4-diacetilfenoxiacético (PCA), ya están siendo aplicados para el control de ciertos fitopatógenos (54).

2.3 Hongos fitopatógenos en cultivos de plátano

El plátano (*Musa* sp.) es uno de los frutos consumidos por el ser humano con mayor importancia a nivel global debido a que es rico en minerales tales como el calcio, magnesio potasio, hierro, entre otros. Además, tiene un alto contenido de carbohidratos y vitaminas, por ello es uno de los frutos con mayor aporte nutricional (55).

El plátano es el cuarto fruto más importante a nivel mundial, se cultiva en más de 120 países y se producen alrededor de 100 millones de toneladas anualmente, y más de 400 millones de personas dependen de los plátanos como alimento básico o como fuente de ingresos. En México es la fruta tropical más cultivada, y se producen anualmente aproximadamente 2 millones de toneladas, debido a su nivel de producción y consumo, este fruto es de alta importancia económica y social (56, 57).

Como todo cultivo, el plátano no está exento de enfermedades que pueden ser devastadoras para la planta. Los fitopatógenos que afectan a estos cultivos son principalmente de origen fúngico, siendo los más relevantes: sigatoka negra por *Mycosphaerella fijiensis*, sigatoka amarilla por *Mycosphaerella musicola*, peca del plátano por *Phylloticta musarum*, mancha foliar eumusae por *Mycosphaerella eumusae* y marchitez por *Fusarium* (58,59).

El género *Mycosphaerella* está asociado con tres enfermedades que afectan drásticamente el cultivo de plátano y pueden ocasionar pérdidas en la cosecha entre el 11 y 80% (59). Una de estas enfermedades es la sigatoka negra,

la cual es una enfermedad pantropical, es decir, esta distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, el agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet (58). Esta enfermedad afecta las hojas de las plantas, cuando el hongo penetra a la hoja impide la fotosíntesis, produciendo como resultado rayas color café en la cara inferior de las hojas, las cuales pueden fusionarse dando lugar a manchas necróticas, lo que eventualmente conduce a la muerte del tejido foliar. Si la enfermedad no es controlada, puede ocasionar la pérdida total de la cosecha (60).

Otra enfermedad causada por el género *Mycosphaerella* es la sigatoka amarilla, que al igual de sigatoka negra es patropical, el hongo causal es *M. musicola*, infecta a hojas jóvenes ocasionando una decoloración de la hoja que puede derivar en una mancha necrótica y puede afectar más del 50% del área foliar. Esta enfermedad puede llevar a la pérdida de más de la mitad de la cosecha (61).

Por último, la mancha foliar eumusae es una enfermedad ocasionada por *Mycosphaerella eumusae*, y se encuentra ampliamente distribuida en la India, Sri Lanka, Malasia, Tailandia, Vietnam y Nigeria (62). Debido a sus síntomas que incluyen manchas amarillas y necróticas en las hojas, puede ser confundida con la sigatoka negra o la sigatoka amarilla, para una identificación adecuada es necesario realizar una identificación molecular del hongo (62, 60).

La peca del plátano es una enfermedad causada por el hongo *Guignardia musae*, conocido como *Phylloticta musarum* (etapa anamorfa del hongo). Esta enfermedad está distribuida en el sudeste y este de Asia. Las lesiones que ocasiona este hongo se pueden observar en las hojas y en el fruto de la planta de plátano, las lesiones son pequeñas manchas oscuras en forma de pecas, es por ello el nombre de la enfermedad (63,58).

El género *Fusarium* es de gran importancia agrícola debido al impacto en cultivo de diversos frutos y cereales como el maíz, trigo, algodón y plátano, entre otros. Además de infectar el tejido vegetal, este hongo produce micotoxinas que pueden tener efectos adversos en los consumidores (64). Entre las especies fitopatógenas más representativas se encuentran *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum* (65). La marchitez ocasionada por *Fusarium* es la enfermedad más relevante en términos económicos para el cultivo de plátano, ya que puede provocar pérdidas significativas en la cosecha. El agente causal de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc), este hongo ingresa a la planta por medio de la raíz hasta llegar al xilema. Los síntomas iniciales de esta enfermedad incluyen la pérdida de color en hojas y la curvatura de pecíolos, si no es tratada a tiempo, puede progresar hasta la necrosis de las hojas y el pseudotallo, causando la muerte de la planta (66).

De todas las enfermedades mencionadas anteriormente, solo la mancha foliar de *eumusae*, la marchitez por *Fusarium* y la Sigatoka negra ocasionan un impacto significativo en los cultivos de plátano en la República Mexicana. Estas enfermedades representan una amenaza constante para la producción, afectando tanto el rendimiento como la calidad de los frutos (67).

2.4 Control de hongos fitopatógenos en el cultivo de plátano

Cuando un cultivo de plátano presenta una infección ocasionada por un hongo, de primera instancia se utilizan fungicidas de origen químico para erradicar la enfermedad. Sin embargo, debido a los múltiples defectos adversos de estos compuestos se han buscado estrategias para eliminar a los fitopatógenos (68).

Una de las alternativas para disminuir el uso de estos fungicidas es el empleo de microorganismos que tienen la capacidad de eliminar a los fitopatógenos, tal como el uso de *Trichoderma*, un hongo que puede producir más de 100 metabolitos secundarios con capacidad antifúngica como los peptabioles, policétidos y terpenos (69). Algunas bacterias del género *Bacillus* también pueden ser utilizadas para erradicar a hongos fitopatógenos ya que pueden inhibirlos al competir por espacio y nutrientes, o bien, al producir metabolitos con acción fungicida como fengicida e iturina de *Bacillus subtilis* (70). También es posible aplicar únicamente los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos para el control de fitopatógenos, tal es el caso del compuesto fenazina ácido carboxílico o PCA, el cual es un compuesto producido por *Pseudomonas chlororaphis*, que en el año 2011 fue certificado como biopesticida por el Ministerio de Agricultura en China (71).

Por lo tanto, el estudio y búsqueda de microorganismos con capacidad biocontroladora, es fundamental para alcanzar una agronomía sustentable que no represente un riesgo para el medio ambiente ni para el consumidor. En este sentido es primordial seguir impulsando la investigación en microbiología agrícola para el desarrollo de compuestos de gran interés agronómico.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de pesticidas de origen químico presenta múltiples desventajas tanto ambientalmente como para la salud humana. Una alternativa prometedora para reducir su impacto es el biocontrol, una estrategia basada en microorganismos benéficos que pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos (72).

En este contexto, estudios preliminares han identificado una cepa rizosférica de maíz rojo con un alto potencial para la producción de sustancias inhibitorias, lo que la convierte en una candidata prometedora para el biocontrol (73).

Igualmente, las enfermedades en cultivos representan un desafío significativo para la producción de alimentos. Un caso relevante se observa en Coahuayana, Michoacán, donde la infección en hojas de plátano ha afectado gravemente la productividad. Para diseñar estrategias de control efectivas, es fundamental identificar los patógenos responsables y comprender su dinámica en el ecosistema agrícola. Asimismo, las cepas microbianas con capacidad inhibitoria contra fitopatógenos juegan un papel clave en el desarrollo de soluciones sostenibles, permitiendo la implementación de estrategias de biocontrol que reduzcan la dependencia de agroquímicos y favorezcan una agricultura más sustentable.

4. HIPÓTESIS

Una cepa rizosférica de maíz con alta capacidad inhibitoria tendrá el potencial de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos aislados de hojas de plátano infectadas, contribuyendo así al desarrollo de estrategias de biocontrol más eficientes y sostenibles.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Explorar el potencial antagónico de una cepa rizosférica de maíz rojo contra microorganismos aislados de hojas de plátano con signos de infección para plantear una estrategia de biocontrol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente a la bacteria rizosférica en base a los genes 16S ADNr, *gyrB* y *rpoB*. Además, realizar un árbol filogenético concatenado en base a los tres genes housekeeping.
- Aislar microorganismos a partir de hojas de plátano con signos de infección.
- Realizar ensayos de antibiosis para probar el poder inhibitorio de la bacteria rizosférica en contra de los microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada.
- Identificar los hongos aislados de hojas de plátano con base a su morfología macroscópica, microscópica y mediante secuenciación de regiones ITS.
- Llevar a cabo la caracterización molecular de bacterias aisladas de hoja de plátano infectada.
- Realizar ensayos de patogenicidad de los hongos en hojas de plátano.
- Llevar a cabo la extracción y purificación parcial de las sustancias inhibitorias producidas por la bacteria inhibitoria de patógenos.

6. METODOLOGÍA

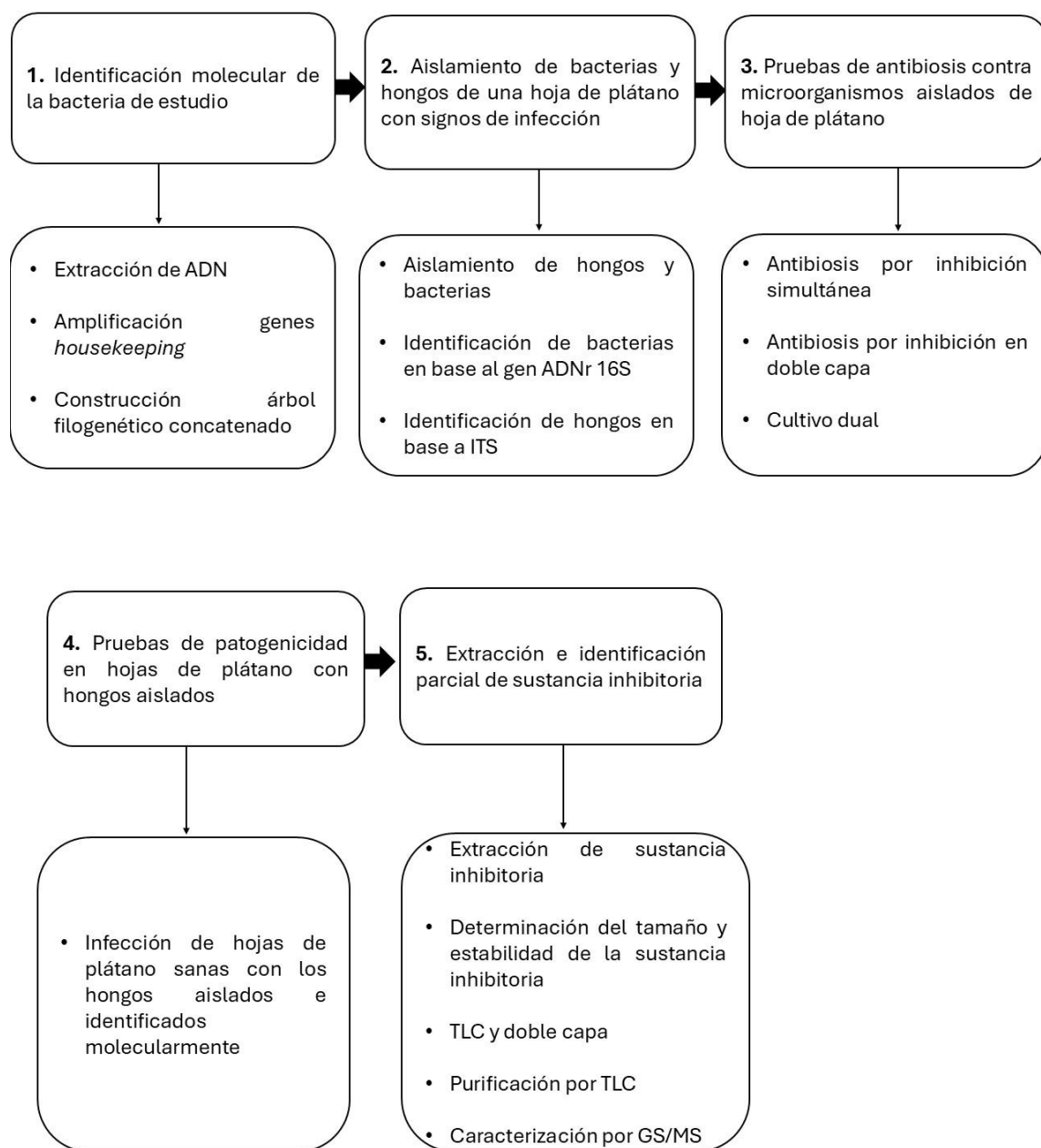


Figura 3. Esquema de la metodología de trabajo.

6.1 Identificación molecular de la bacteria de estudio

6.1.1 Extracción de ADN

La bacteria de estudio fue aislada en el año 2008 a partir de la rizósfera del maíz rojo autóctono, conocido como “Rojo Criollo”, por parte del grupo de Ecología y Supervivencia de Microorganismos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La bacteria se dejó crecer durante 48 horas en medio Luria-Bertani (Anexo 2) líquido a 30 °C con una agitación de 200 x rpm. Posteriormente, se centrifugaron 3 mL del cultivo a 10,000 x rpm y se desechó el sobrenadante para separar el concentrado celular. Finalmente, la extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial “Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit” de Zymo Research de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

El producto de la extracción fue teñido con el intercalante GelRed (Biotium), y se separó en un gel de electroforesis de agarosa al 1% en TAE (40mM Tris, 20mM Acetato, 1mM EDTA) para confirmar la obtención y la calidad del ADN.

6.1.2 PCR y purificación de genes *housekeeping*

Se llevó a cabo la amplificación de los genes ADNr 16S (codifica para un componente de la subunidad menor ribosomal), *rpoB* (codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa) y *gyrB* (codifica para la subunidad B de la girasa), por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (74) (Anexo 1). Para la reacción se usó el reactivo Master Mix (Thermo scientific), el cual está compuesto por la DNA polimerasa DreamTaq, dNTPs, (1.6mM), MgCl₂ (3mM) y buffer DreamTaq Green 2X. Se usaron 25 μ L de Master Mix, 1 μ L del oligonucleótido sentido (10pmol), 1 μ L del oligonucleótido antisentido (10pmol), 1 μ L del DNA y 22 μ L de agua libre de nucleasas.

Las condiciones de PCR del gen 16S ADNr fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 52°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Las condiciones de PCR para los genes *rpoB* y *gyrB* constaron de una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, alineamiento a 60°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Para confirmar la amplificación de los genes, se realizó un gel de electroforesis, usando GelRed para la tinción y un marcador de peso molecular

de 1 kb de la casa comercial Thermo scientific. Los tamaños esperados de los genes *rpoB*, *gyrB* y ADNr 16S fue de 500 pb, 580 p b y 1500pb, respectivamente.

Para purificar los productos de cada reacción de PCR se utilizó el kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” de Zymo Research. La purificación se realizó según las indicaciones de la casa comercial.

Posterior a la purificación, el material genético se cuantificó en un espectrofotómetro “Nanodrop2000” para determinar la concentración de ADN y la calidad de la muestra.

Las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM de acuerdo con las indicaciones de la institución, para ser secuenciadas.

6.2 Construcción de árbol filogenético concatenado

Para la construcción del árbol filogenético concatenado se combinaron las secuencias de los genes *rpoB*, *gyrB* y 16S rDNA, se alinearón 13 secuencias usando Clustal X2.1 (75). El árbol filogenético se construyó en el programa MEGA 11 (76), por el método de Maximum Likelihood (Máxima Verosimilitud), usando el modelo de 3 parámetros de Tamura y un Bootstrap de 1000 repeticiones (77).

Para la elaboración del árbol se seleccionaron 13 secuencias de diferentes bacterias, se alinearon y editaron en el programa Bioedit (78), finalmente se elaboró el árbol filogenético por el método de Maximum Likelihood (Máxima Versosimilitud) en el programa MEGA 11, el modelo utilizado fue Tamura de 3 parámetros, y se seleccionó un Bootstrap de 1000 repeticiones para la validación de los clados del árbol.

6.3 Generación de oligonucleótidos para amplificación del gen *phzF*

Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos del NCBI, quince secuencias un gen involucrado en la vía biosintética de las fenazinas, el gen *phzF* codifica para una enzima clave en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Las secuencias fueron alineadas en el programa CLUSTALX2.1. Posteriormente se editaron en el programa Bioedit (78) para la generación de una secuencia consenso. Dicha secuencia se analizó en el programa de Primer3Plus para generar los oligonucleótidos y se seleccionaron los mejores cebadores con base al %GC, T_m y longitud (pares de bases). Finalmente, con los oligonucleotidos seleccionados se realizó un BLAST en NCBI, y en PRIMER BLAST se colocaron los cebadores elegidos para confirmar el alineamiento de los oligonucleótidos con la secuencia blanco (79,80).

Para la amplificación del gen *phzF* se llevó a cabo una amplificación mediante PCR a 94°C durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, un alineamiento a 57°C durante 1 minuto, y una etapa de extensión a 72°C durante 2 minutos, por último, una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para visualizar los productos de la amplificación del gen se realizó un gel de electroforesis descrito anteriormente.

6.4 Aislamiento de microorganismos de hoja de plátano con signos de infección

Una hoja de plátano con signos de infección como clorosis y manchas necróticas, proveniente de un cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* var. cavendish) de Michoacán fue macerada con ayuda de un mortero y homogenizada con agua estéril (81). El aislamiento de los microorganismos se hizo por medio de la metodología de *Goteo en Placa* (82), la cual consiste en hacer una serie de diluciones seriadas 1:10 para después colocar una alícuota de 20 µL de cada dilución en el medio seleccionado (Figura 4). Los medios utilizados fueron: LB, LGI, BAC, Rojo Congo y PDA (Anexo 2), al crecer en los diversos medios de cultivo se aislaron por estría cruzada (82).



Figura 4. Protocolo utilizado para aislar los posibles fitopatógenos de la hoja de plátano con signos de infección. 1) La muestra fue una hoja de plátano presuntamente infectada por *Sigatoka* negra, 2) Maceración y homogenización de la muestra con agua estéril, 3) Realización de diluciones seriadas 1:10, 4) Colocación de alícuotas de las diluciones 1:10 en diferentes medios de cultivo, 5) Crecimiento de múltiples microorganismos, 6) Aislamiento de cada microorganismo en el respectivo medio de cultivo utilizado.

Con base en su morfología macroscópica y microscópica se aislaron los microorganismos provenientes de cada medio utilizado, las bacterias fueron teñidas por el método de Gram y los hongos con azul de algodón (Figura 5).



Figura 5. Crecimiento de microorganismos aislados de hoja de plátano con signos de infección fúngica usando la metodología de *Goteo en placa* en agar LB. Se observaron diferentes morfologías pertenecientes a bacterias y hongos.

6.5 Identificación molecular de microorganismos inhibidos por la bacteria rizosférica de maíz

Se llevó a cabo tanto la identificación de bacterias como de hongos. Para ello se extrajo el ADN con el “Wizard Genomic DNA purification kit” de la casa comercial PROMEGA para las bacterias y para los hongos “Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit” de Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados para la identificación de las bacterias fueron los primers universales ADN_r16S, y para los hongos se utilizaron los oligos ITS1 e ITS4 (83).

El kit “Zymoclean Gel DNA Recovery” fue usado para purificar los productos de PCR. Posterior a ello, para conocer la concentración y calidad del DNA se midieron las muestras purificadas en el espectrofotómetro “Nanodrop2000”.

Las muestras fueron enviadas para su identificación al instituto de biotecnología de la UNAM.

6.6 Búsqueda del hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Se aisló el ADN de todos los hongos seleccionados de la hoja de plátano, la extracción del ADN se realizó usando el kit “Quick Fungal/Bacterial Miniprep”

de Zymo Research y se llevó a cabo una PCR utilizando unos oligonucleótidos específicos para *Mycosphaerella fijiensis* (84) (Anexo 1). Finalmente, el producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

6.7 Pruebas de antibiosis de la bacteria rizosférica del maíz contra los microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada

6.7.1 Inhibición simultánea

La bacteria rizosférica creció en medio LB líquido durante 48 h, las bacterias aisladas de la hoja de plátano también crecieron en sus respectivos medios en estado líquido durante 24 h, y los hongos se dejaron crecer en el medio de cultivo en estado sólido durante 7 días (Figura 6).

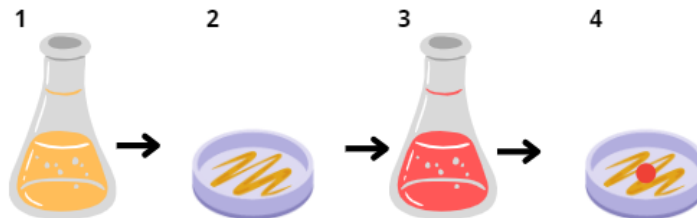


Figura 6. Metodología de inhibición simultánea. 1) Crecimiento en medio líquido del microorganismo presuntamente sensible, 2) Estría masiva del microorganismo sensible en medio sólido, 3) Crecimiento en medio líquido de la bacteria rizosférica, 4) Colocación de alícuota de la cepa de estudio en el centro de la placa donde previamente fue sembrado el microorganismo sensible.

Posteriormente, se llevó a cabo un sembrado masivo de los microorganismos aislados de la hoja de plátano y en el centro de la placa se colocó un inóculo de 20 μ L de la cepa rizosférica. Finalmente, las placas se incubaron durante 48 h para observar la producción del halo de inhibición en caso de ser sensibles a la bacteria antagonista (85).

6.7.2 Doble capa

La bacteria rizosférica del maíz se dejó crecer en medio líquido LB durante 48 horas. Posteriormente, se colocó un inóculo de 20 μ L en 20 mL medio LB sólido (16 g/L de agar) y, a las 24 horas de crecimiento se removió la colonia con ayuda de un portaobjetos estéril e hisopos. Para eliminar por completo a la bacteria se expuso la placa a vapores de cloroformo durante 1 hora.

Para la segunda capa se dejó crecer a las bacterias y hongos en medio líquido durante 24 horas, y se colocaron 40 μ L del precultivo en 10 mL de agar

LB blando (8 g/L de agar). Las placas se incubaron durante 48 horas para analizar la presencia o ausencia de halo de inhibición (Figura 7) (86).

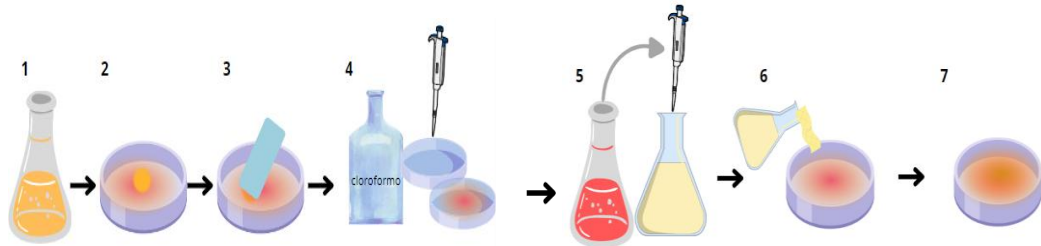


Figura 7. Metodología de inhibición por doble capa. 1) Crecimiento en medio líquido de la bacteria rizosférica, 2) Inoculación de la cepa en el centro de una placa con medio líquido, 3) Después de la incubación, la bacteria es retirada con un portaobjetos estéril, 4) Exposición a vapores de cloroformo durante 1 hora, 5) Inoculación del microorganismo presuntamente sensible en medio líquido en agar blando, 6) Colocación de segunda capa con el microorganismo sensible, 7) Incubación.

6.7.3 Cultivo dual

Los hongos de interés fueron cultivados en agar papa dextrosa (PDA) durante una semana hasta alcanzar un crecimiento completo en la placa. Posteriormente, se extrajo una sección de 1 cm³ utilizando un bisturí estéril y se transfirió a una placa con agar LB. La muestra se dejó incubar durante tres días, tras los cuales se observó un crecimiento miceliar. Finalmente, se colocaron tres inóculos de 20 µL de la bacteria rizosférica del maíz alrededor del micelio para evaluar la interacción microbiana a las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h, respectivamente (Figura 8) (87).

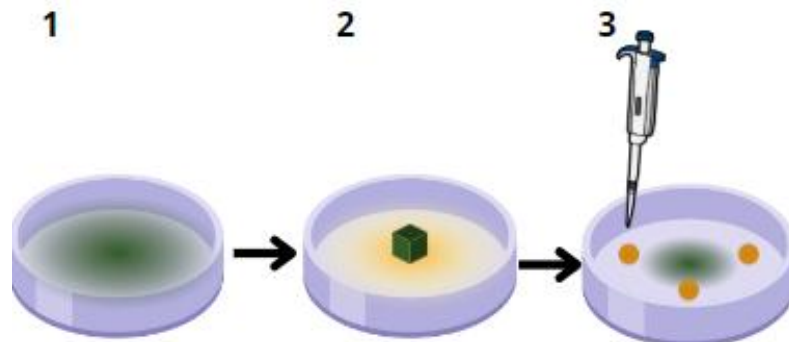


Figura 8. Metodología de cultivo dual. 1) El hongo fue incubado durante siete días hasta que el micelio cubrió completamente la superficie del medio sólido. 2) Posteriormente se extrajo una sección de 1 cm³ del hongo cultivado en medio sólido y se transfirió a un nuevo medio de cultivo. 3) Tras un periodo de inoculación de tres a cuatro días, una vez iniciado el desarrollo miceliar, se añadieron tres alcuotas de la cepa rizosférica a una distancia de 1 cm del micelio y se procedió a una nueva incubación para evaluar la interacción microbiana.

El cultivo dual de cada hongo se hizo por triplicado y se calculó el porcentaje de inhibición micelial usando la siguiente fórmula:

$$\%ICM = [(C_1 - C_2)/C_1 * 100]$$

Siendo C_1 la medida del micelio en la placa del hongo control y C_2 la medida del micelio con los inóculos de la bacteria (88).

6.8 Pruebas de patogenicidad en hojas de plátano con los hongos aislados

La patogenicidad de los hongos identificados molecularmente en hojas de plátano (*Musa paradisiaca* var. Cavendish) fue evaluada mediante ensayos controlados (Figura 9). Para ello, se utilizó una hoja de plátano previamente esterilizada superficialmente con etanol al 70 %, la cual se cortó en fragmentos de 6 cm × 4 cm y se colocó en cajas Petri con papel humedecido. Los hongos, previamente cultivados durante 7 días a 25°C, fueron inoculados en los fragmentos foliares mediante discos fúngicos de aproximadamente 2 cm de diámetro. Adicionalmente, se llevó a cabo otro ensayo en el que una hoja completa fue cortada por la mitad y colocada en un recipiente estéril con papel humedecido. En esta, se realizaron pequeñas incisiones con un bisturí estéril para depositar los discos de los hongos en evaluación. El desarrollo de la patogenicidad se monitoreó durante 30 días bajo condiciones de humedad controlada, y cada ensayo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados (89,90).

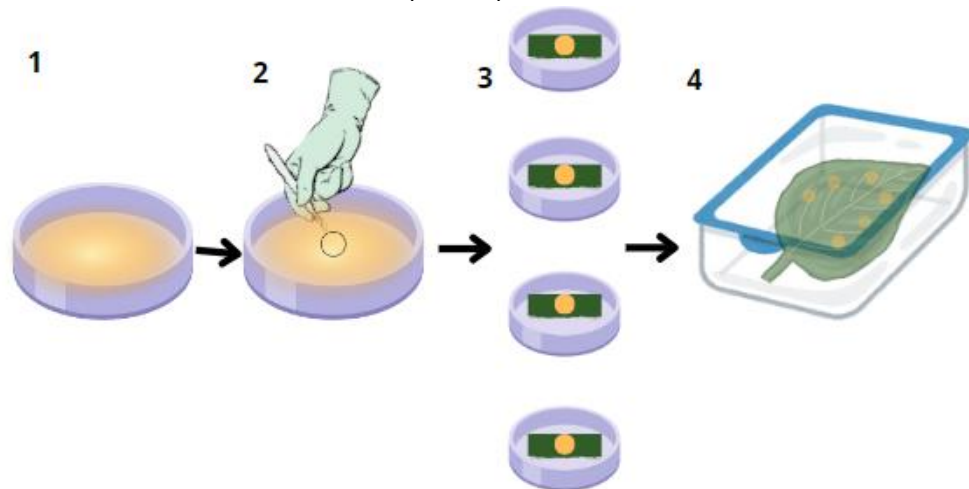


Figura 9. Prueba de patogenicidad. 1) Los hongos a evaluar se incuban durante una semana. 2) Con ayuda de un bisturí se corta un disco de agar de 1 cm de diámetro. 3) Los hongos se colocan en los fragmentos de hoja de plátano previamente desinfectadas y cortadas, dentro de una caja Petri estéril con un pedazo de papel humedecido debajo de la hoja. 4) En una hoja de plátano se colocan los hongos, previo a la colocación del hongo se corta la zona donde se van a colocar los hongos para una mejor penetración, debajo de la hoja se coloca una pieza de papel humedecido y se cierra herméticamente.

6.9 Extracción y purificación parcial de la sustancia inhibitoria

6.9.1 Curva de producción de la sustancia inhibitoria

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de producción de la sustancia inhibitoria, se llevó a cabo una curva de producción. Para ello, a partir de un precultivo de la cepa en estudio, se inocularon 20 μ L en tres matraces de 250 mL de capacidad, cada uno conteniendo 100 mL de medio LB. Los cultivos fueron incubados durante 72 horas, tomando muestras en los siguientes intervalos: 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, y 72 h. Las muestras obtenidas se emplearon para evaluar la producción de la sustancia inhibitoria mediante la metodología de doble capa previamente descrita. Para garantizar la fiabilidad del análisis estadístico, cada medición se realizó por triplicado (91).

6.9.2 Extracción de la sustancia inhibitoria

La bacteria fue cultivada en cada uno de los tres medios de cultivo seleccionados; LB, SYP y GYP (Anexo 2) (Figura 10) e incubada durante periodos de 24, 48, 60 y 72 horas, con el objetivo de evaluar la producción de la sustancia inhibitoria según en función del tiempo.

Para cada medio de cultivo y tiempo de incubación, se siguió un protocolo estandarizado. Inicialmente, la cepa bacteriana se cultivó en medio líquido durante el tiempo establecido. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 5,000 x rpm durante 20 minutos para separar el sobrenadante, el cual se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con cloroformo en una relación 1:1 (V/V). La mezcla se agitó de forma constante durante 5 minutos y se dejó en reposo hasta la separación de las fases acuosa, interfase y orgánica. Cada una de estas fases fue concentrada mediante rotavapor bajo condiciones controladas: la fase acuosa a 65 °C, la interfase a 55 °C y la fase orgánica a 45 °C, todas a 50 x rpm. Posteriormente, cada fase fue recolectada y evaluada por su potencial inhibitorio utilizando la metodología de doble capa. La fase con mayor actividad inhibitoria fue sometida a un proceso adicional de concentración en rotavapor para obtener un extracto enriquecido de la sustancia inhibitoria (92).

Finalmente, se comparó la actividad inhibitoria del sobrenadante antes y después del proceso de concentración en rotavapor, determinando las unidades arbitrarias de actividad (UA) como medida de eficacia (93).



Figura 10. Metodología para extracción de sustancias inhibitorias. 1) La cepa rizosférica fue inoculada en medio de cultivo líquido y posteriormente incubada durante 72 horas para su crecimiento. 2) El cultivo bacteriano fue sometido a centrifugación con el fin de separar el sobrenadante con cloroformo. 3) La mezcla obtenida se transfirió a un embudo de separación, donde fue agitada vigorosamente y se dejó en reposo para permitir la separación de las fases. 4) Se recolectaron las tres fases resultantes del proceso de extracción. 5) Finalmente, se concentró la fase orgánica en un rotavapor. 6) Obtención del concentrado del extracto con los compuestos de interés.

6.10 Determinación de tamaño aproximado de las moléculas y su estabilidad térmica

Para estimar el tamaño aproximado de las moléculas con potencial inhibitorio, se mezcló 1 mL del concentrado obtenido con 9 mL de alcohol al 70%, y los 10 mL de la solución resultante se filtró en tubos Milipore con membranas de nitrocelulosa de 50, 30 y 3 kDa.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 5,000 x rpm durante 10 minutos. La actividad antimicrobiana de cada fracción se evaluó mediante la metodología de doble capa (91).

Para determinar la estabilidad térmica de las sustancias inhibitorias, se incubaron 500 mL del extracto a diferentes temperaturas (-4, 4, 40, 60 y 80 °C) durante una hora, y se determinó su actividad inhibitoria utilizando la metodología de doble capa (94).

6.11 Cromatografía de capa fina en papel filtro de la sustancia inhibitoria y doble capa

El concentrado de la fase orgánica fue separado mediante la metodología de cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria papel filtro, como fase móvil se probaron diferentes solventes con distinta polaridad, los compuestos utilizados fueron: alcohol al 70%, alcohol a 25%, hexano, hexano y cloroformo. El papel filtro y todos los materiales fueron esterilizados previamente para evitar contaminación, la separación por cromatografía en capa fina (TLC) fue visualizada en luz UV, y finalmente para observar en que fracción se retuvo la

sustancia inhibitoria se realizó la metodología de doble capa (Figura 11). Para ello se colocaron 20 mL de medio GYP, al solidificar se colocó el papel filtro seco con la muestra que fue previamente corrida, al adherirse al agar se colocó la segunda capa con 40 μ L de una bacteria sensible, después de 48 h se observó el resultado (95).

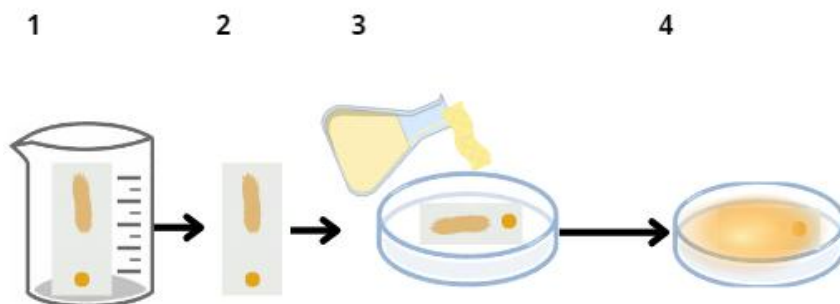


Figura 11. TLC con doble capa. 1) Se colocó una pequeña alícuota del concentrado de la fase orgánica sobre una placa de papel filtro, la cual se colocó en un vaso de precipitado conteniendo el solvente adecuado para la separación de la sustancia mediante cromatografía en capa fina. 2) Posteriormente, se dejó secar el papel filtro para garantizar la eliminación del solvente residual. 3) El papel filtro con el patrón cromatográfico obtenido por TLA fue colocado sobre un medio de cultivo sólido y se cubrió con una segunda capa de agar previamente inoculada con el microorganismo sensible. 4) Finalmente, la preparación se incubó bajo condiciones controladas para evaluar la actividad de la sustancia separada.

6.12 Purificación parcial por cromatografía de capa fina de la sustancia inhibitoria

Tras la realización de la cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando papel filtro como fase estacionaria, se procedió a una nueva separación cromatográfica empleando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (TLC Silica Gel60, Merck) como fase estacionaria, con el objetivo de mejorar la resolución y la separación de los compuestos de interés.

Para ello, se depositaron tres alícuotas de 100 μ L del extracto a 1 cm de un extremo de la placa cromatográfica, utilizando cloroformo como fase móvil. La cromatografía en capa delgada (TLC) se llevó a cabo en un vaso de precipitado cubierto con placa Petri de vidrio, permitiendo el desarrollo hasta que el solvente alcanzó su punto máximo de migración en la placa. La placa fue retirada del vaso de precipitado y se dejó secar en campana de extracción. La visualización de los compuestos se realizó bajo luz ultravioleta (UV), y se calculó el factor de retención (R_f). A continuación, con la ayuda de un bisturí estéril, se raspó la banda separada de la muestra inicial y el material obtenido se recolectó en un tubo Eppendorf. El polvo extraído se resuspendió en 1 mL de cloroformo, se mezcló durante 1 minuto en vortex y se centrifugó a 10000 x rpm durante 2 minutos. Finalmente, el

sobrenadante obtenido fue empleado para evaluar su actividad inhibitoria mediante la metodología de doble capa. El ensayo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados (96).

6.13 Caracterización parcial por cromatografía de gases acoplada a masas (GS/MS) de las sustancias inhibitorias

Después de la purificación por TLC se analizó en el cromatógrafo de gases Agilente Thechnologies 7890. Este cromatógrafo cuenta con una columna DB-5MS, con una longitud de 3 metros y un diámetro de 0,5 μm . El cromatógrafo cuenta con flujo de Helio a 1,7 mL/min. Para el análisis se inyectó 1 μL del extracto en el puerto de inyección, a una temperatura de 250 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura de la columna se inició a 50 $^{\circ}\text{C}$ y aumentó gradualmente durante 49 minutos hasta alcanzar los 290 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se mantuvo a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos, luego aumentó a 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 150 $^{\circ}\text{C}$, donde se mantuvo durante 1 minuto. A continuación, la temperatura se elevó a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 270 $^{\circ}\text{C}$, donde se mantuvo durante 3 minutos. Finalmente, la temperatura aumentó a 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar el valor final, manteniéndose durante 9 minutos.

Los compuestos fueron detectados mediante cromatógrafo y registrados en el cromatograma correspondiente. Posteriormente, su identificación se realizó utilizando la biblioteca NIST08 (91).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación molecular de bacteria de estudio

Para explorar la identidad de la cepa de interés, se amplificaron los genes 16S ADNr, *rpoB* y *gyrB*. Inicialmente, se construyeron árboles filogenéticos individuales para cada gen, observándose una relación cercana con *Pseudomonas chlororaphis*. El análisis de similitud mediante BLASTn con las secuencias de estos genes confirmó que la cepa EMM2 pertenece al género *Pseudomonas*, mostrando una alta homología con *P. chlororaphis*.

De acuerdo con el análisis filogenético, la bacteria rizosférica aislada del maíz rojo fue identificada como *Pseudomonas chlororaphis*, y nombrada como *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 por el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, donde se llevó a cabo su identificación (Figura 12).

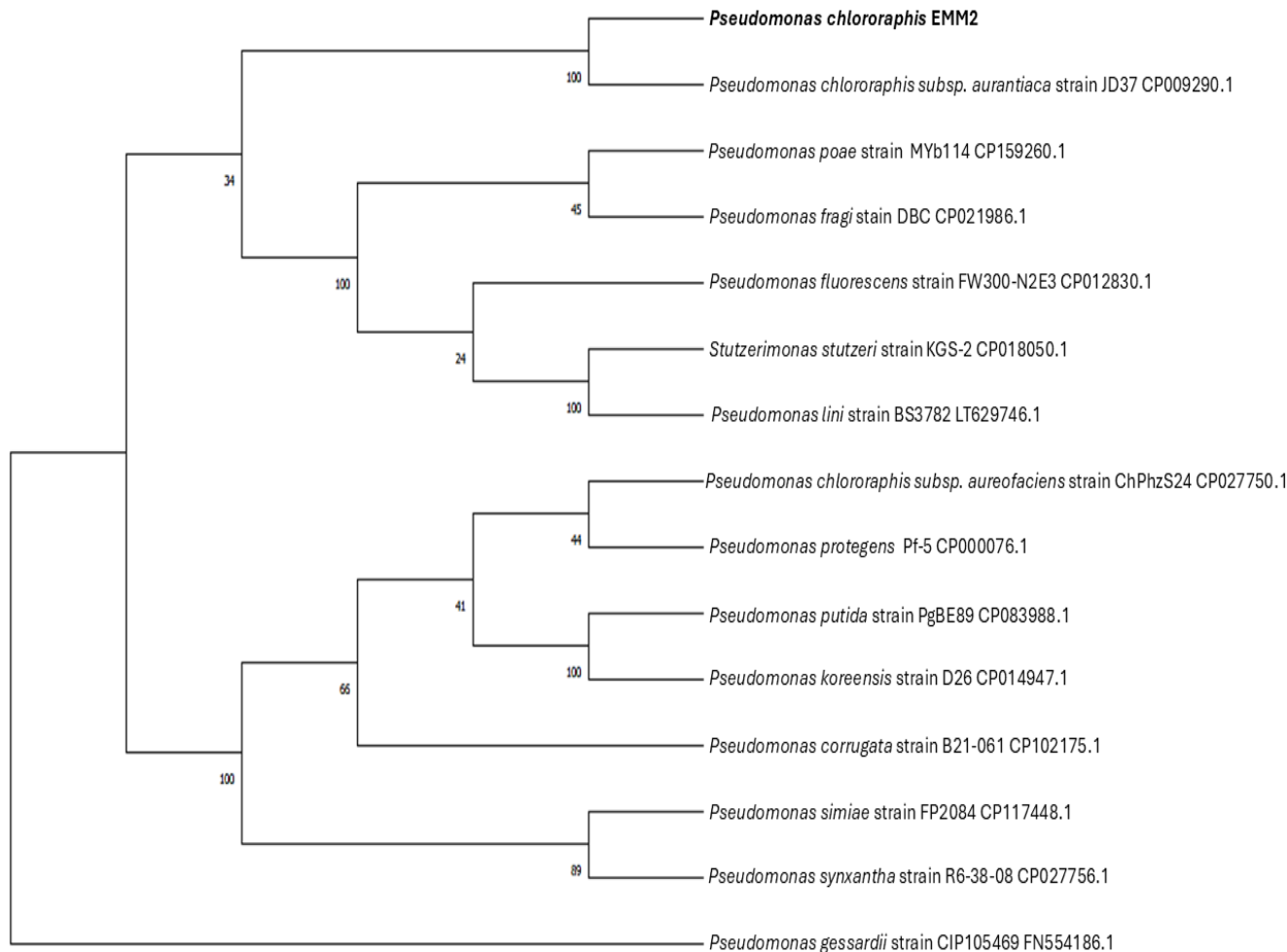


Figura 12. Árbol filogenético concatenado usando el método de Máxima Verosimilitud.

Se generó un árbol filogenético concatenado utilizando el método de máxima verosimilitud a partir de la concatenación de trece secuencias, con un modelo evolutivo de sustitución T92+G, y fueron calculados los valores de Bootstrap con 1000 réplicas.

7.2 Amplificación del gen *phzF*

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen *phzF*, de acuerdo con los análisis realizados se obtuvo como oligonucleótido sentido (forward) la secuencia: 5'-TGTTCTGGAAACCCAGATG-3' y como secuencia antisentido (reverse): 5'-AGTGGAAGAAGGCGCTGTAG-3', los cuales amplifican una secuencia de 750 pb que codifica para la proteína *phzF*, de la bacteria *Pseudomonas chlororaphis*.

Se amplificó mediante PCR y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el producto de la amplificación. Como resultado se ha obtenido una banda que coincide con el tamaño del gen *phzF*, como control negativo se utilizó el ADN de *Microbacterium* sp. BHPL5 (Figura 13).

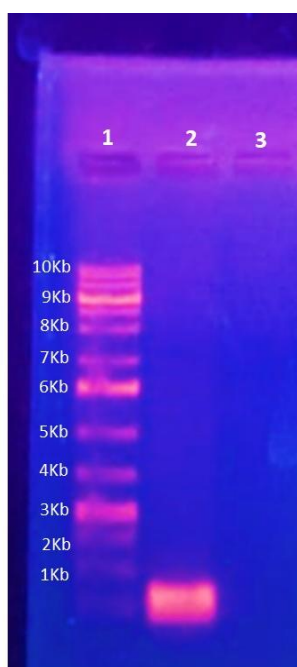


Figura 13. Gel de electroforesis de la amplificación del gen *phzF*. En el gel se observaron las siguientes condiciones: 1) Marcador de peso molecular de ADN de 1Kb. 2) Resultado de PCR para la amplificación en *Pseudomonas chlororaphis* EMM2. 3) La cepa bacteriana BHPL4 como control negativo, en el cual no se detectó amplificación.

7.3 Aislamiento de microorganismos de hoja de plátano con signos de infección

La hoja de plátano infectada fue macerada en agua estéril y, procesada mediante la técnica de *Goteo en Placa* en medios de cultivo selectivos para diversos microorganismos (Figura 14). De acuerdo con las características macroscópicas de las colonias desarrolladas en los medios utilizados, así como

en la morfología microscópica de las bacterias y hongos, se lograron aislar un total de 46 microorganismos, de los cuales 28 correspondieron a bacterias (61%) y 18 a hongos (39%). Todos los aislamientos fueron preservados en glicerol para su almacenamiento y posterior análisis.

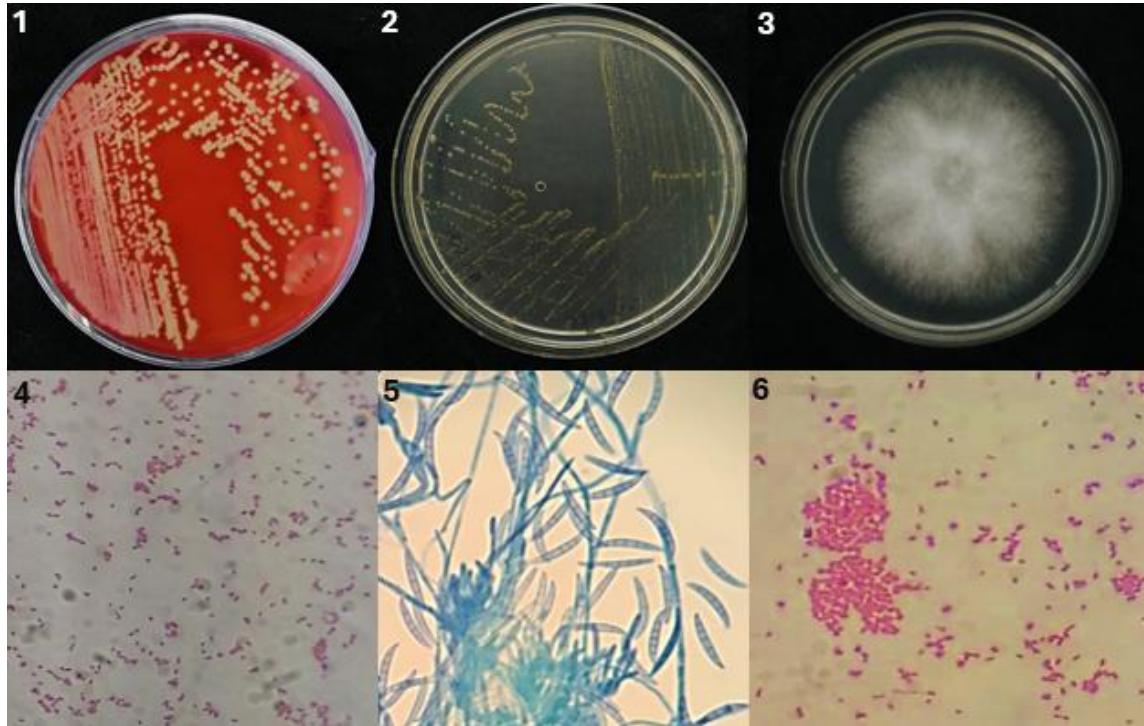


Figura 14. Morfología macroscópica y microscópica de microorganismos aislados de la hoja de plátano con signos de infección. 1) Bacteria aislada en medio Rojo Congo. 2) Bacteria aislada en medio LB. 3) Hongo aislado en PDA. 4) Bacterias en forma de bacilos teñidos por tinción de Gram (Gram-positivos). 5) Macroconidias teñidas con azul de algodón. 6) Bacterias en forma de cocos teñidos por tinción de Gram (Gram-negativos).

7.4 Caracterización molecular de microorganismos con alta sensibilidad a *P. chloroaphis* EMM2 provenientes de la hoja de plátano infectada

Previo a la identificación molecular de las bacterias, se realizaron pruebas rápidas de inhibición (inhibición simultánea) utilizando *P. chloroaphis* EMM2 con el objetivo de identificar a las bacterias sensibles. Posteriormente, se llevaron cabo tinciones de Gram para analizar su morfología microscópica y determinar si correspondían a bacterias Gram-positivas y/o Gram-negativas. Finalmente, de las 17 bacterias sensibles, se seleccionaron 7, para su identificación molecular, eligiendo aquellas que presentaron los halos de inhibición más grandes. La identificación molecular se realizó mediante la amplificación del gen ADN_r 16S, utilizando los cebadores universales (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación en base a la amplificación del gen ADNr 16S. Las bacterias fueron parcialmente identificadas, y se buscó la bacteria más cercana en base al gen amplificado.

NOMBRE DE LAS CEPAS	BACTERIA CERCANAMENTE RELACIONADA	TAMAÑO SECUENCIADO (pb)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
BHPL1	<i>Microbacterium</i> sp. HX0021	1332	96,98
BHPL2	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. 139-9	1241	95,08
BHPL3	<i>Microbacterium paraoxydans</i> G8	1141	97,65
BHPL4	<i>Microbacterium paraoxydans</i> BLY	1290	99,54
BHPL5	<i>Microbacterium</i> sp. 78-5	1286	92,83
BHPL6	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. 137-9	1285	95,19
BHPL7	<i>Microbacterium testaceum</i> 4a	1311	95,06

Tras la amplificación del gen ADNr 16S, y su comparación con la base de datos de GenBank, las bacterias identificadas resultaron estar genéticamente relacionadas con los géneros *Microbacterium* y *Cellulosimicrobium*, como se observa en la tabla 2.

Para la caracterización molecular de los hongos, primero se analizaron sus características macroscópicas tras una semana de crecimiento en cultivo, así como sus características microscópicas con base en tinciones con azul de algodón. Posteriormente se realizaron pruebas de antibiosis simultánea para identificar los hongos sensibles a *P. chlororaphis* EMM2. Con base en la sensibilidad a la bacteria y a las características morfológicas observadas, se seleccionaron 12 hongos para su identificación molecular. La identificación molecular se llevó a cabo mediante la amplificación de los espaciadores transcritos internos del ADNr (ITS), utilizando los oligonucleótidos ITS1 – ITS4. Como resultado, de los 18 hongos aislados, se logró la identificación molecular de 12 cepas fúngicas (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de los hongos en base a la amplificación de los genes ribosomales. Los hongos fueron parcialmente identificados, y se buscó el hongo más cercano en base al gen amplificado.

NOMBRE DE LAS CEPAS	HONGO CERCANAMENTE RELACIONADO	TAMAÑO SECUENCIADO (pb)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
HHPL1	<i>Fusarium equiseti</i> F18	576	97,23
HHPL2	<i>Fusarium incarnatum</i> DTO 417-F2	561	99,82
HHPL3	<i>Fusarium incarnatum</i> EX2019-M11	512	99,57
HHPL4	<i>Fusarium incarnatum</i> p5	563	100
HHPL5	<i>Fusarium equiseti</i> FUS-18-1	543	100
HHPL6	<i>Fusarium equiseti</i> TD6.2	560	99,82
HHPL7	<i>Fusarium equiseti</i> FUS2940	586	99,32
HHPL8	<i>Fusarium incarnatum</i> FPM02	463	99,76
HHPL9	<i>Fusarium sulawesiense</i> NRRL 66472	581	99,13
HHPL10	<i>Fusarium temperatum</i> CN06111	571	99,82
HHPL11	<i>Fusarium pseudonygamai</i>	564	99,8
HHPL12	<i>Fusarium verticilicoides</i> HSRF52	545	99,45

Hay que destacar que el análisis de los resultados obtenidos a partir de la amplificación y secuenciación de los fragmentos ITS1–ITS4 reveló que las doce cepas fúngicas presentan una estrecha relación filogenética con el género *Fusarium*.

7.5 Búsqueda del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra)

Con el objetivo de identificar la presencia del hongo causante de la Sigatoka negra, se amplificó una región variable dentro de la región espaciadora interna transcrita 1 (ITS 1) específica para *Mycosphaerella fijiensis*. Para ello, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos específicos dirigidos a esta región, los cuales fueron evaluados en los 18 hongos que fueron aislados de la hoja de plátano, previamente sometidos a extracción de ADN.

Los resultados indicaron la ausencia de amplificación en todos los aislamientos fúngicos analizados, lo que permitió descartar la presencia de *Mycosphaerella fijiensis* en las muestras evaluadas.

7.6 Pruebas de antibiosis de *P. chlororaphis* EMM2 contra los microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada

7.6.1 Antibiosis por doble capa de microorganismos aislados de la hoja de plátano con signos de infección

Para evaluar la capacidad inhibitoria de la cepa bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2, se empleó la metodología de doble capa, utilizando como microorganismo diana las bacterias y hongos previamente aislados de hojas de plátano infectadas.

En los ensayos de antagonismo, se analizaron 12 bacterianas, de las cuales 7 fueron inhibidas por *P. chlororaphis* EMM2. Entre ellas, la cepa BHPL4, la cual está genéticamente relacionada con la bacteria *Microbacterium paraoxydans*, presentó la mayor sensibilidad, con un halo de inhibición de $39,3 \pm 1,15$ mm, lo que la posicionó como la bacteria más susceptible en este estudio (Figura 15).

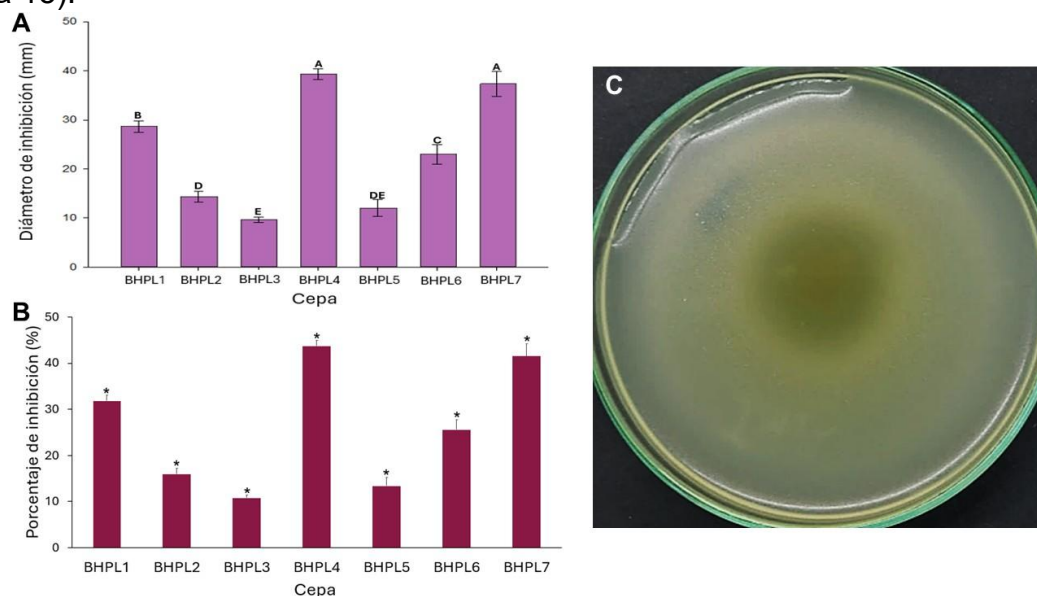


Figura 15. Inhibición del crecimiento de las bacterias aisladas de la hoja de plátano por la bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 mediante la metodología de doble capa. (A) Gráfico del diámetros del halo de inhibición, las letras iguales dentro del mismo gráfico indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). **(B)** Porcentaje de inhibición, el símbolo * indica que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto al control según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). **(C)** Imagen del halo de inhibición producido por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 ante la cepa bacteriana BHPL4.

De los múltiples hongos aislados, se seleccionaron 9 para la prueba de inhibición por doble capa, siendo 6 los que presentaron un halo de inhibición ante los metabolitos producidos por *P. chlororaphis* EMM2, cabe destacar que no se probaron los doce hongos caracterizados molecularmente ya que no todos crecieron en medio líquido (Figura 16).

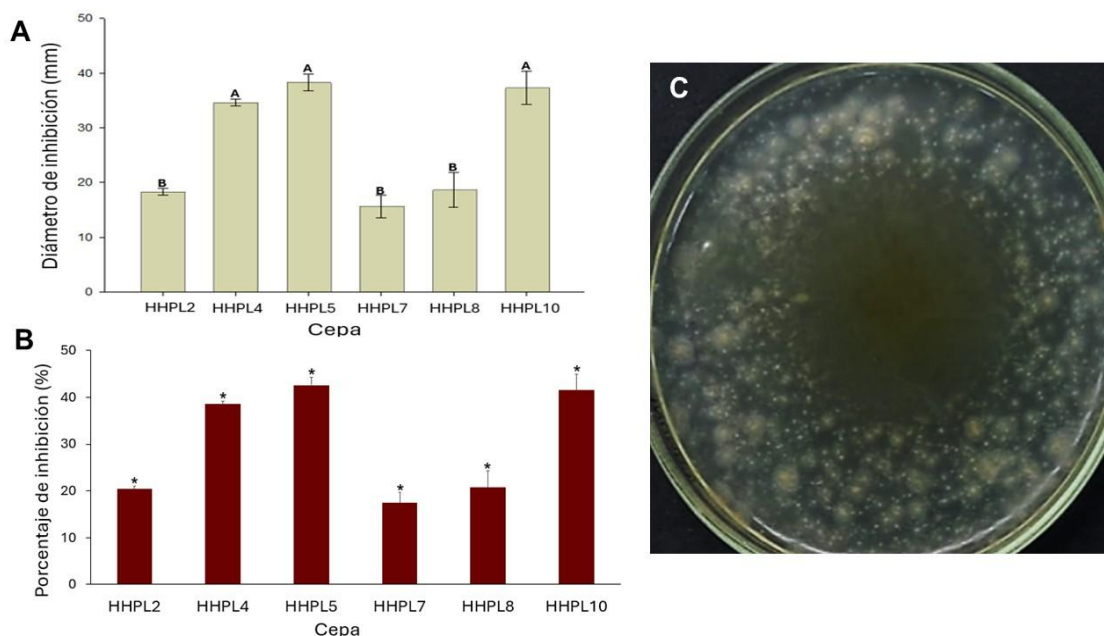


Figura 16. Inhibición del crecimiento de los hongos aislados de la hoja de plátano por la bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 mediante la metodología de doble capa. (A) Gráfico del diámetros del halo de inhibición, las letras iguales dentro del mismo gráfico indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (B) Porcentaje de inhibición, el símbolo * indica que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto al control según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (C) Imagen del halo de inhibición producido por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 ante la cepa fúngica HHPL5.

Los hongos cercanamente relacionados a diferentes cepas de *Fusarium equiseti*, HHPL1, HHPL4 y HHPL5, fueron los más sensibles por medio de la metodología de doble capa, produciendo halos de $37,3 \pm 3,05$ mm, $34,6 \pm 0,57$ mm y $38,3 \pm 1,52$ mm, respectivamente.

7.6.2 Detección de antibiosis mediante inhibición simultánea de microorganismos aislados de la hoja de plátano infectada

Para evaluar la actividad inhibitoria de *P. chlororaphis* EMM2, además de utilizar la metodología de doble capa, se empleó la técnica de inhibición simultánea, previamente descrita. En este estudio, se seleccionaron las 12 cepas fúngicas caracterizadas, de las cuales 10 mostraron sensibilidad a *P. chlororaphis* EMM2, evidenciando su capacidad antagonista frente a estos microorganismos (Figura 17).

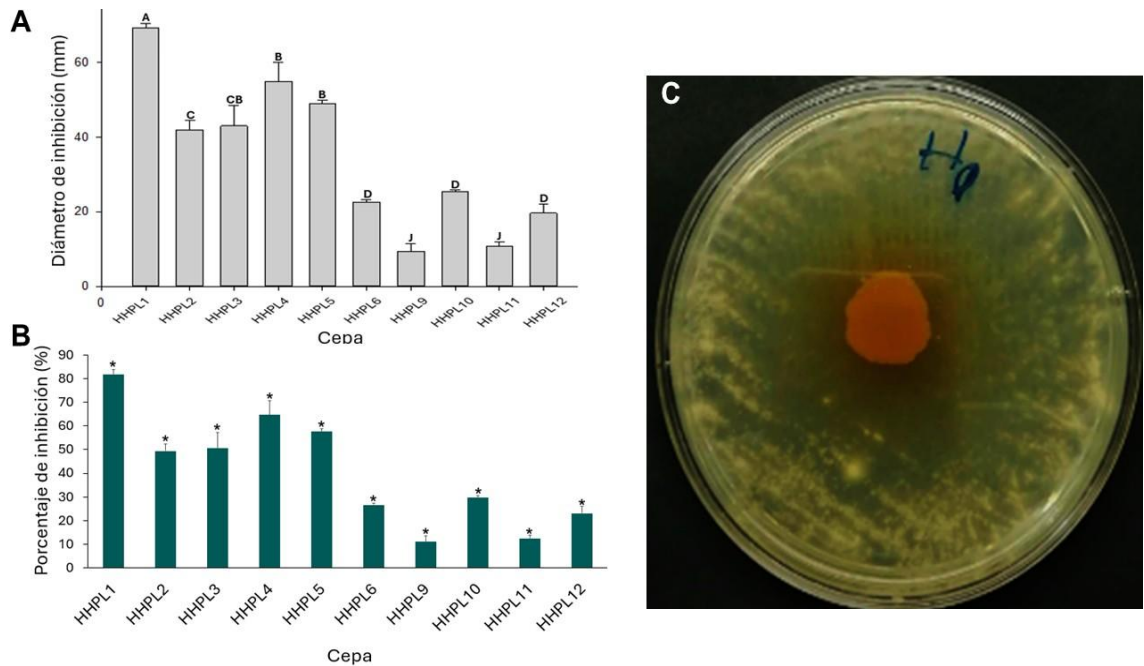


Figura 17. Inhibición del crecimiento de los hongos aislados de la hoja de plátano por la bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 mediante la metodología inhibición simultánea. (A) Gráfico del diámetros del halo de inhibición, las letras iguales dentro del mismo gráfico indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (B) Porcentaje de inhibición, el símbolo * indica que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto al control según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (C) Imagen del halo de inhibición producido por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 ante la cepa fúngica HHPL2.

Los resultados obtenidos en la gráfica 3, demuestran que los hongos cercanamente relacionados a diferentes cepas de *Fusarium equiseti*, HHPL1, HHPL4 y HHPL5, fueron los más sensibles por medio de la metodología de doble capa, produciendo halos de $70 \pm 0,5$ mm, 55 ± 5 mm y 49 ± 1 mm, respectivamente.

Asimismo, se evaluaron 17 cepas bacterianas mediante la metodología de de inhibición simultánea, determinándose que el 70,5% de ellas fueron sensibles a la actividad antagónica de *P. chlororaphis* EMM2.

Las bacterias identificadas molecularmente que presentaron los halos de inhibición más amplios fueron BHPL4, BHPL5 y BHPL2, las cuales mostraron una relación genética cercana con *Microbacterium paraoxydans*, *Microbacterium* y *Cellulosimicrobium*, respectivamente (Figura 18).

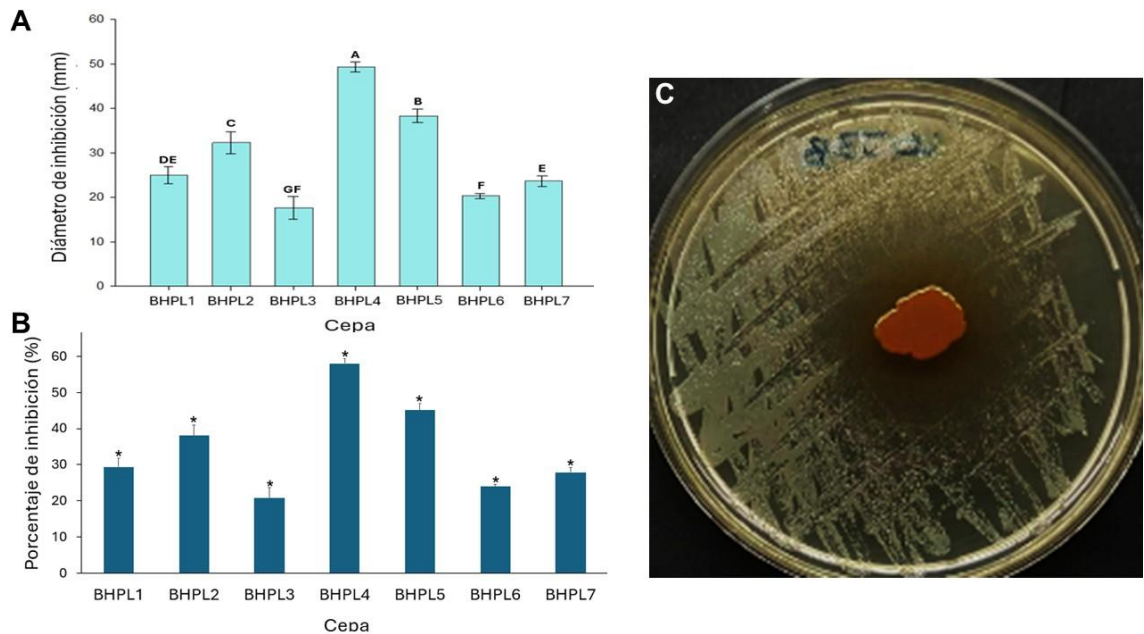


Figura 18. Inhibición del crecimiento de las bacterias aisladas de la hoja de plátano por la bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 mediante la metodología inhibición simultánea. (A) Gráfico del diámetros del halo de inhibición, las letras iguales dentro del mismo gráfico indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (B) Porcentaje de inhibición, el símbolo * indica que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto al control según la prueba *t*-student ($P < 0.05$). (C) Imagen del halo de inhibición producido por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 ante la cepa bacteriana BHPL5.

7.6.3 Inhibición por cultivo dual para detección de inhibición micelial en hongos estudiados

Para estudiar la interacción entre la bacteria *P. chlororaphis* EMM2 y los hongos previamente caracterizados, se empleó la metodología de cultivo dual con el fin de determinar el porcentaje de inhibición micelial (IMC). La evaluación de la interacción se realizó cada 24 horas hasta alcanzar las 120 horas de incubación. El ICM se calculó para cada hongo en triplicado (Figura 19, Gráfico 1).

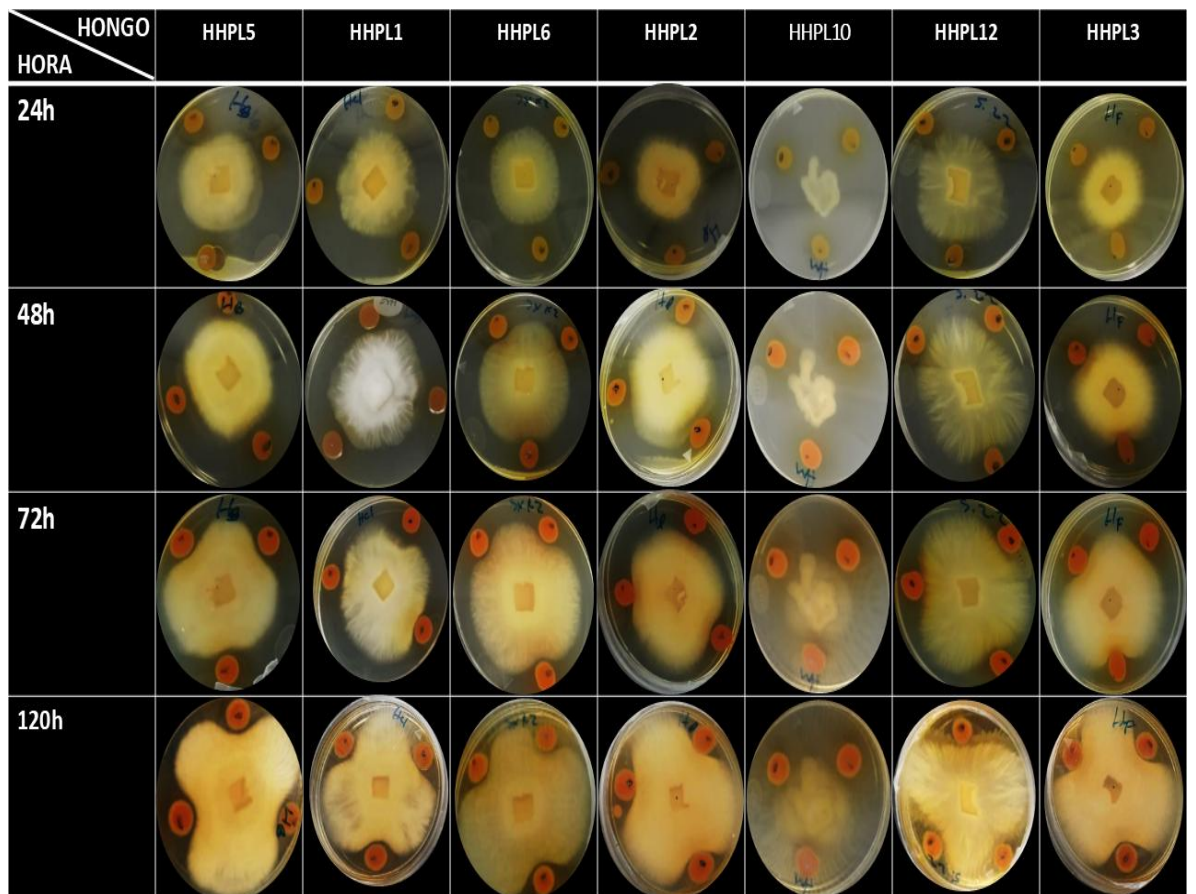
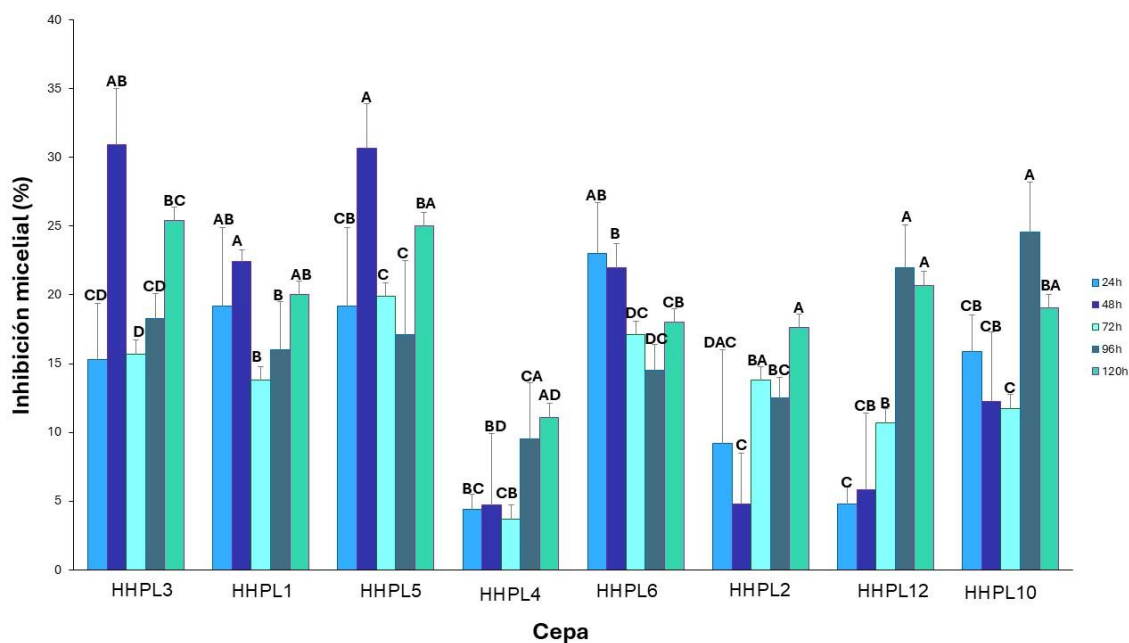


Figura 19. Cultivo dual de los hongos aislados de la hoja de plátano con la bacteria *Pseudomonas chlororaphis* EMM2. La inhibición micelial puede ser suprimida por la bacteria en los hongos estudiados, el experimento se realizó por triplicado en cada hongo, y cada uno con su respectivo control.

A



B

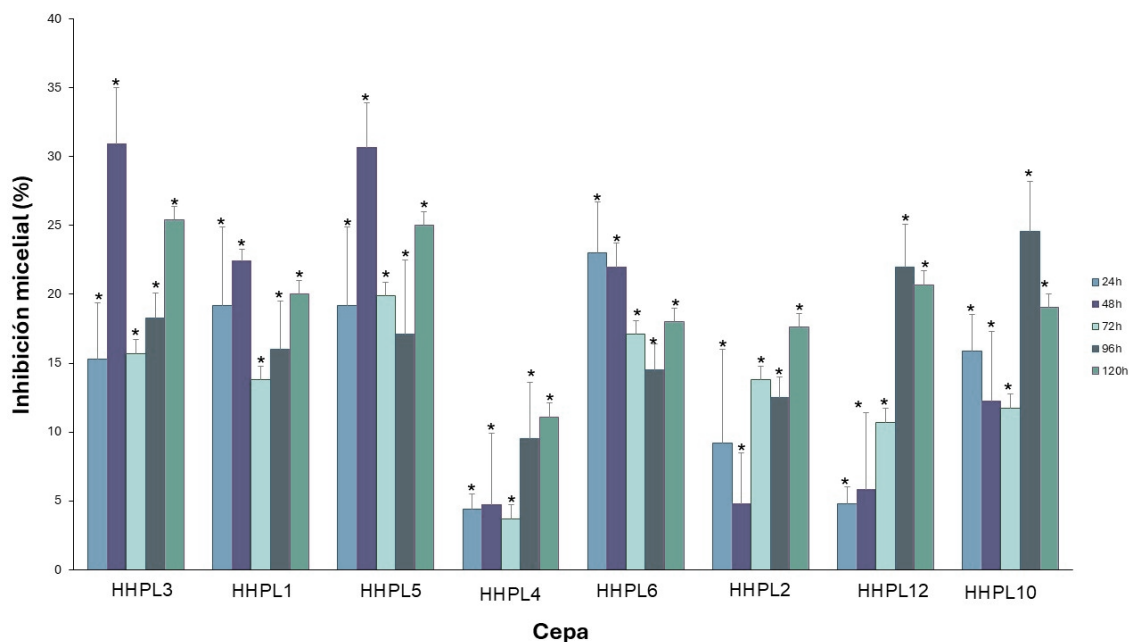


Gráfico 1. Porcentaje de inhibición micelial. El ICM fue calculado a las 24, 48, 72, 96 y 120 h en cada hongo evaluado por triplicado, se puede observar que el crecimiento micelial fue parcialmente controlado por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2. **(A)** Gráfico del diámetros del halo de inhibición, las letras iguales dentro del mismo gráfico indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas según la prueba t-student ($P < 0.05$). **(B)** Porcentaje de inhibición, el símbolo * indica que hay una diferencia estadísticamente significativa respecto al control según la prueba t-student ($P < 0.05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar en todos los hongos una supresión de crecimiento micelial. Sin embargo, los hongos con un ICM mayor fueron HHPL3 y HHPL5, los cuales están relacionados genéticamente con *Fusarium equiseti*.

7.7 Pruebas de patogenicidad

Para evaluar el daño en la hoja de *Musa paradisiaca* var. (Cavendish), se cortó una hoja nueva de una planta de 3 años. La hoja fue fragmentada para inocular los hongos, este ensayo se realizó por triplicado.

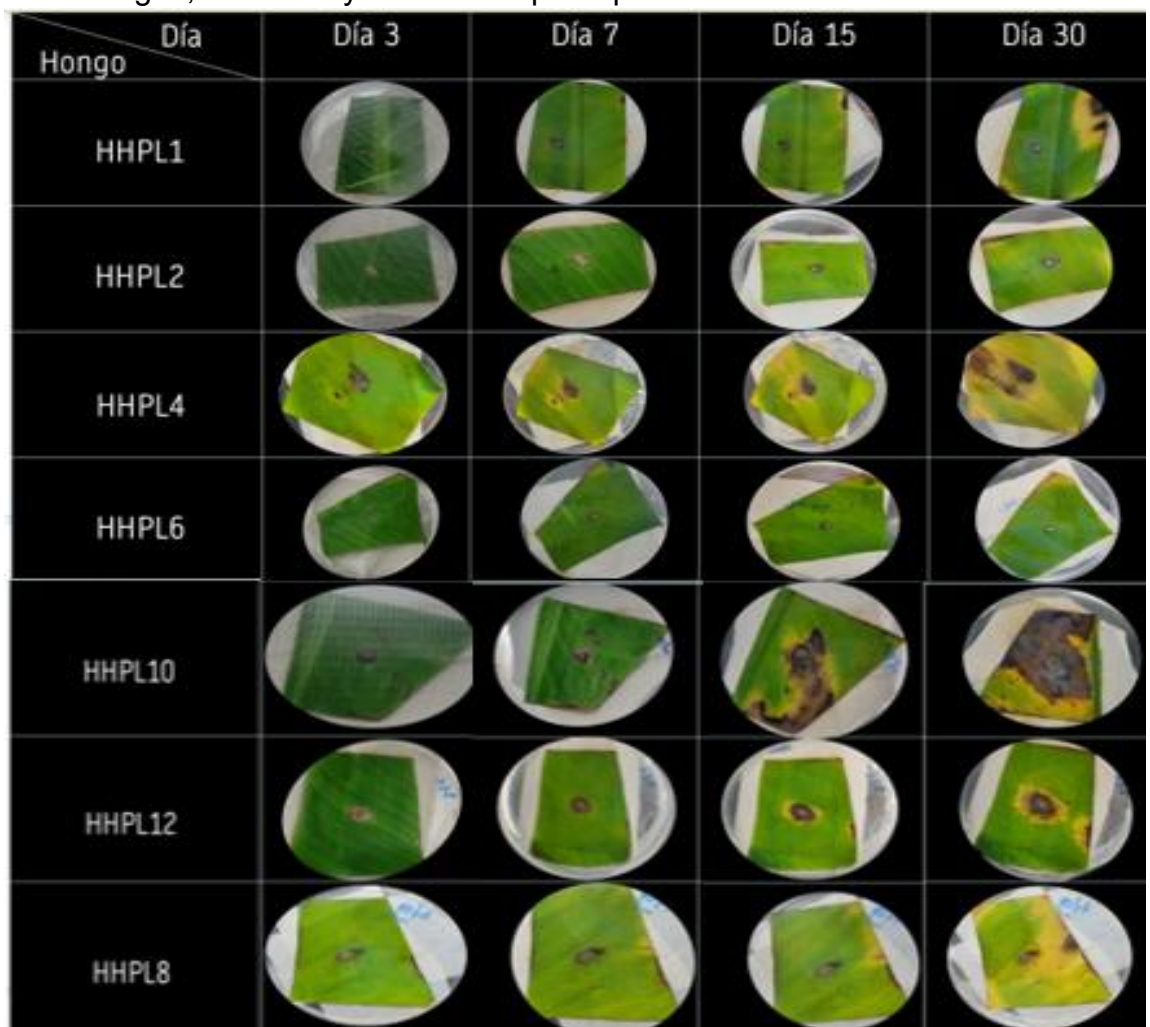


Figura 20. Prueba de patogenicidad de los hongos de género *Fusarium* en fragmentos de hoja de plátano. Se evaluó el daño ocasionado por los hongos en fragmentos de hoja de *Musa paradisiaca* var. Cavendish, por cada hongo se realizó un triplicado.

Se monitoreó durante un mes el efecto de los hongos en las hojas cada tres días manteniendo una humedad constante. Los resultados indicaron que los hongos que ocasionaron daños significativos en los fragmentos de las hojas corresponden a las cepas HHPL10 y HHPL12, las cuales mostraron una relación genética cercana a *Fusarium temperatum* y *Fusarium verticilicoides*, respectivamente (Figura 20).

Con el objetivo de corroborar los resultados previamente obtenidos, en otra hoja de *Musa paradisiaca* var. (Cavendish), se inocularon todos los hongos en diferentes puntos de la hoja para comparar el daño ocasionado. Los resultados confirmaron que las cepas HHPL10 y HPL12 son las cepas fúngicas que causan un daño mayor en las células vegetales de la planta en cuestión (Figura 21).

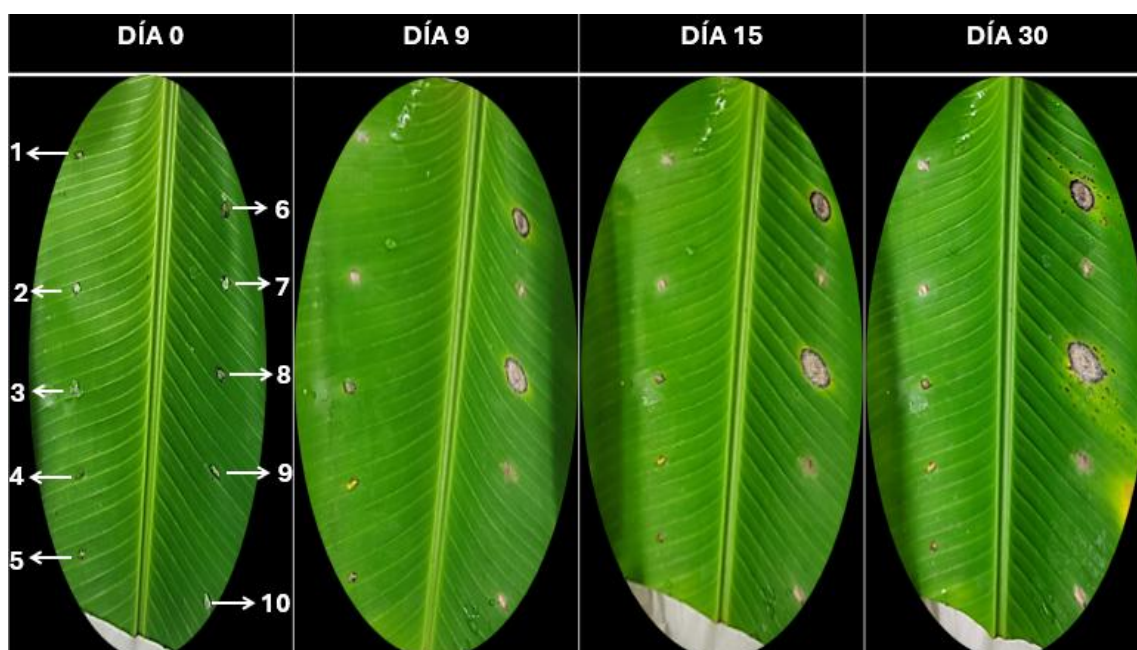


Figura 21. Prueba de patogenicidad de hongos del género *Fusarium* en hoja de *Musa paradisiaca* var. *cavendish*. En una hoja de plátano se evaluó el daño ocasionado por los hongos durante 30 días, siendo 1. HHPL1, 2. HHPL4, 3 – 5 Control, 6. HHPL10, 7. HHPL6, 8. HHPL12, 9. HHPL8, 10. HHPL22. El experimento se realizó por triplicado.

7.8 Extracción y purificación de sustancia inhibitoria

7.8.1 Curva de producción de las sustancias inhibitorias

Previo a la extracción de la sustancia inhibitoria, se evaluó el tiempo de incubación óptimo para una mayor producción de los metabolitos antimicrobianos. Para ello, se dejó crecer la bacteria durante 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. En cada intervalo de crecimiento, se aplicó la metodología de doble capa utilizado a BHPL5, como bacteria sensible, y después de 48 horas se midió el

halo de inhibición. El ensayo se realizó por triplicado en cada uno de los tiempos programados.

Se concluyó que el tiempo de incubación ideal para la producción de la/las sustancias inhibitorias es 72 horas (Figura 22).

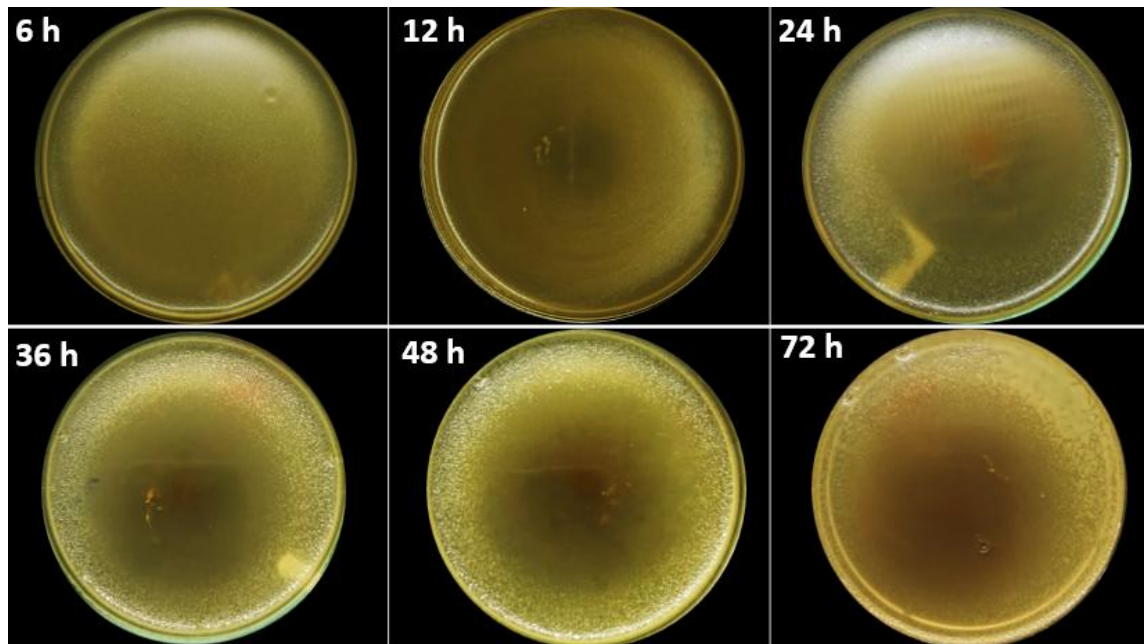


Figura 22. Curva de inhibición de crecimiento de *Pseudomonas choloraphis* EMM2 frente a la bacteria BHPL5. El halo de inhibición se puede observar a partir de las 6 h hasta las 72 h.

7.8.2 Extracción de las sustancias inhibitorias

Para extraer la/las sustancias inhibitorias se creció la bacteria en medio GYP durante 72 horas, después se mezcló en un embudo de separación con cloroformo en relación 50/50. Se separaron las 3 fases y se probó el potencial inhibitorio por medio de la metodología de doble capa. Como resultado se observó un halo de inhibición en la fase orgánica y en la interfase, obteniendo un halo mayor en la fase orgánica (Figura 23).

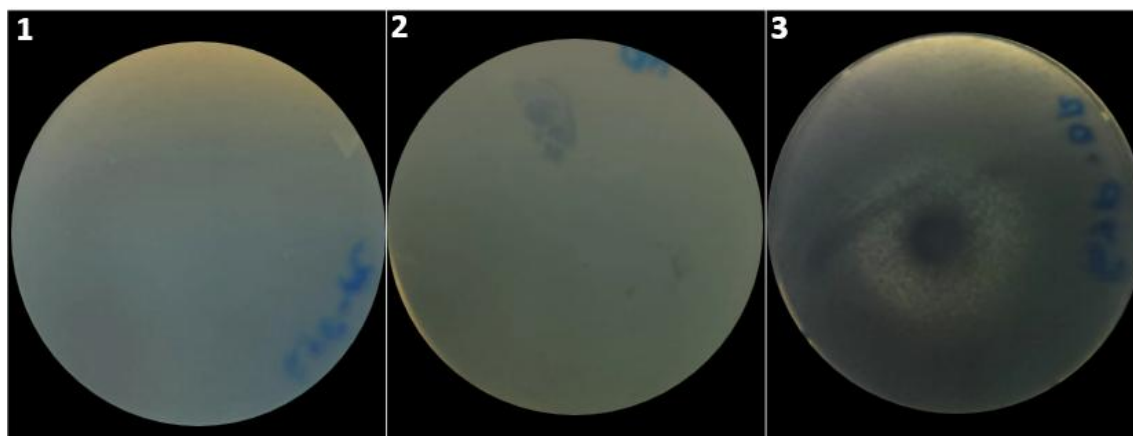


Figura 23. Resultado de la prueba de inhibición por doble capa con las fases obtenidas de la separación del sobrenadante de *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 con clororformo. (1) La fase acuosa presentó ausencia de halo de inhibición, indicando nula actividad antimicrobiana. (2) La interfase presentó una inhibición parcial, indicando una baja actividad antimicrobiana. (3) La fase orgánica produjo un halo de inhibición bien definido, indicando una actividad antimicrobiana positiva. La cepa sensible usada fue BHPL4.

La fase orgánica fue concentrada en rotavapor a 45 °C a 50 x rpm, obteniendo un concentrado color naranja. Se comprobó la actividad inhibitoria del concentrado por doble capa y se corroboró la actividad antimicrobiana.

7.9 Determinación de tamaño aproximado de las moléculas y su estabilidad térmica

Para estimar el tamaño molecular de la sustancia se utilizaron tubos Milipore con filtros de 50, 30 y 3 kDa. Los resultados mostraron, que la sustancia inhibitoria está compuesta por diversas moléculas de diferentes tamaños, ya que se comprobó la actividad inhibitoria por doble capa tanto en el filtrado como en el concentrado retenido en todos los filtros utilizados.

La estabilidad térmica se determinó incubando el concentrado de la fase orgánica a diferentes temperaturas, desde -4 °C hasta 80 °C. Al calentar la muestra a 80 °C, el solvente se evaporó y formaron cristales que fueron disueltos en 500 µL de cloroformo. Finalmente, se determinaron las unidades arbitrarias (UA) de actividad de las sustancias inhibitorias por doble capa, utilizando tanto el sobrenadante de la bacteria (sin pasar por rotavapor), como el concentrado, con el fin de evaluar el potencial de la sustancia.

7.10 Cromatografía en capa fina (TLC) con papel filtro y comprobación de actividad inhibitoria por la metodología de doble capa

Para purificar parcialmente la/las sustancias inhibitorias, el concentrado de la fase orgánica previamente obtenido se sometió a TLC utilizando como fase estacionaria papel filtro. Como fase móvil fueron utilizados diferentes solventes

para la migración de la sustancia inhibitoria: hexano, alcohol 25%, alcohol 70% y cloroformo.

La migración de la muestra fue visualizada bajo luz UV, y posteriormente se realizó la metodología de doble capa para observar si la/las sustancias que migraron tenían potencial inhibitorio. Después de 48 horas se pudo observar halos de inhibición en las TLC que fueron corridas usando como fase móvil cloroformo, alcohol al 70% y hexano (Figura 24).

La bacteria sensible utilizada fue BHPL4, la cual ya había sido inhibida previamente por el sobrenadante de *P. chlororaphis* EMM2.

Para cerciorarnos que la actividad inhibitoria no se debía a los solventes, se realizó la metodología de doble capa colocando una alícuota de cada solvente en la primera capa, después de 48 horas no se presentó inhibición.

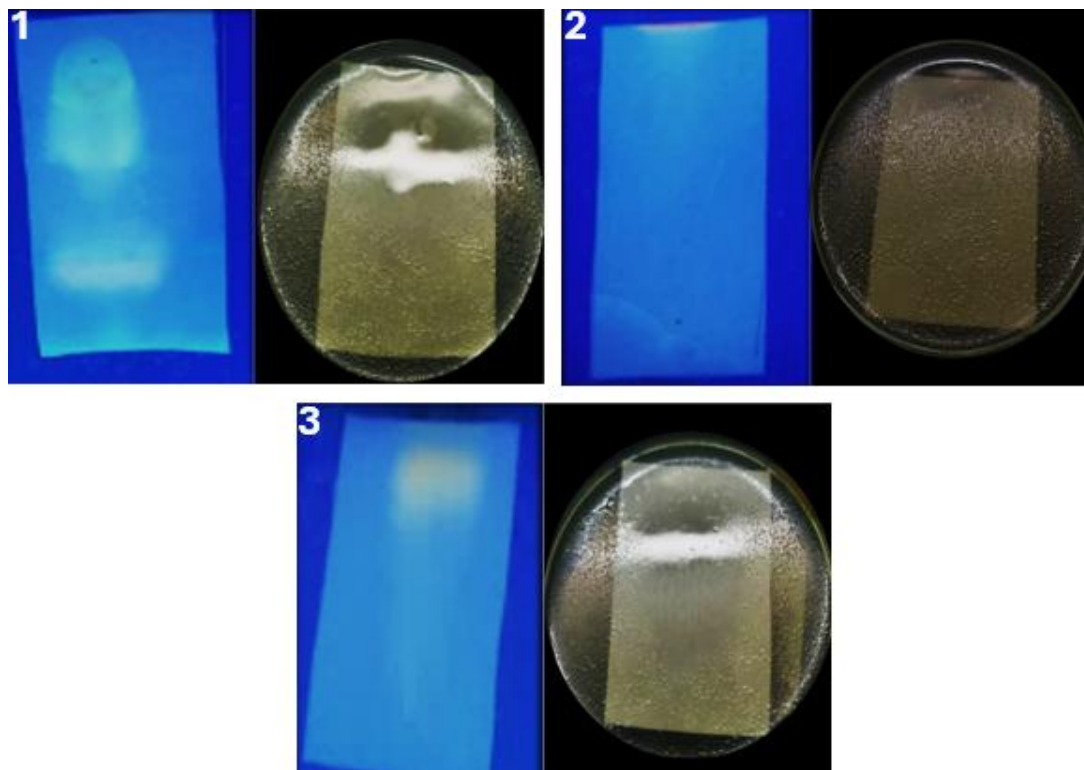


Figura 24. TLC en papel filtro y doble capa. El sobrenadante concentrado en rotavapor fue purificado por TLC en papel filtro para posteriormente realizar el ensayo de doble capa con el papel filtro y corroborar el corrimiento de la/las sustancias inhibitorias. Para ello se usaron diferentes solventes. (1) TLC con hexano como solvente. (2) TLC con cloroformo como solvente. (3) TLC con alcohol al 70% como solvente.

7.11 Purificación por TLC

La muestra fue nuevamente separada mediante la metodología cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), utilizando silica gel como fase estacionaria en lugar de la fase empleada previamente.

Para la fase móvil, se probaron diferentes solventes: hexano, cloroformo y alcohol al 70%. Tras realizar la cromatografía, las bandas obtenidas en la placa fueron cuidadosamente raspadas y disueltas en 500 μ L del solvente correspondiente. Posteriormente, se aplicó la metodología de doble capa para evaluar su actividad inhibitoria.

De los solventes utilizados, únicamente la banda obtenida al emplear cloroformo como fase móvil mostró una inhibición (Figura 25).

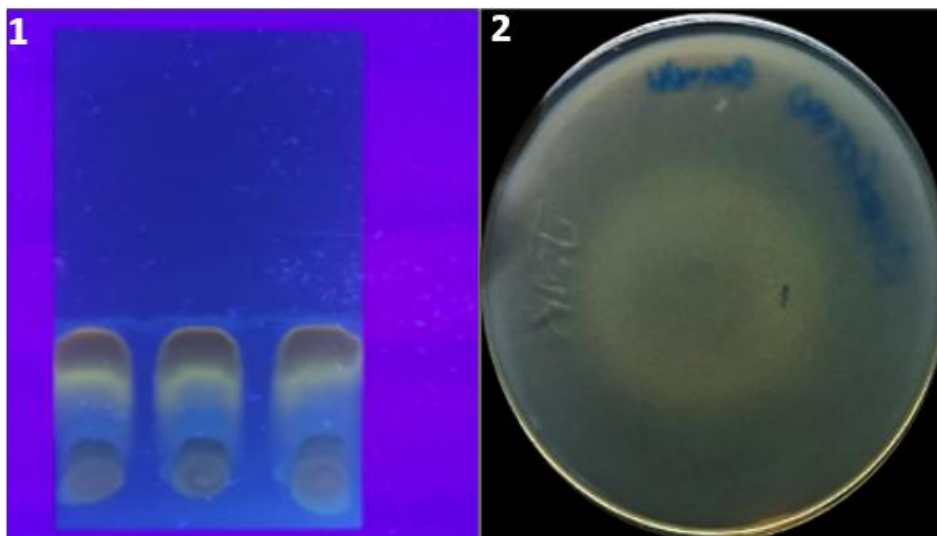


Figura 25. Purificación de sustancia inhibitoria por TLC. Separación de la/las sustancias inhibitorias por TLC con sílica gel como fase estacionaria y cloroformo como fase móvil. (1) Visualización de la separación bajo luz UV. (2) Halo de inhibición por metodología doble capa de sustancia purificada por TLC, se utilizó como bacteria sensible a BHPL4.

7.12 Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de la/s sustancia/s inhibitoria parcialmente purificada por TLC

La banda obtenida de la cromatografía en capa fina y disuelta en cloroformo fue inyectada en un cromatógrafo de gases para la detección de los compuestos presentes. Fueron detectados 16 compuestos, de los cuales 5 fueron de gran interés debido a que se ha reportado una actividad antimicrobiana de estas moléculas (Figura 25).

Los compuestos de interés fueron:

1. N-Carboxal-4-carboxi-cloropiperidina
2. 2,4-Dimetilbenzaldehído
3. Fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletilo)
4. Ácido n-hexadecanóico
5. Ácido 6-octadecanóico

En el cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), cada compuesto identificado está señalado con una flecha roja (Figura 25). Las moléculas de interés fueron analizadas en detalle, permitiendo obtener tanto su espectro de masas como su estructura química correspondiente (Figura 26).

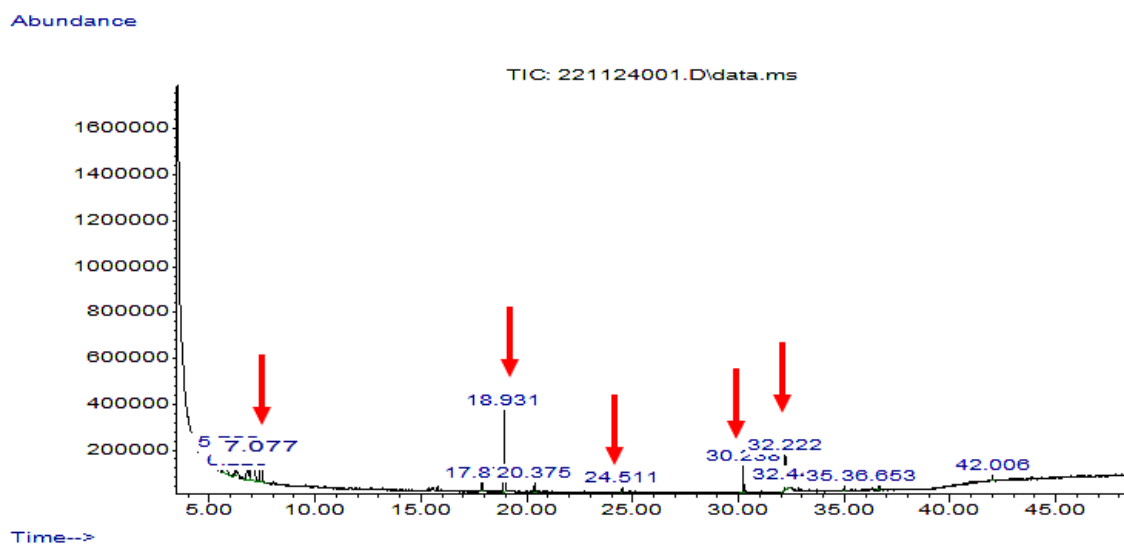


Figura 25. Cromatograma obtenido a partir del análisis de la muestra parcialmente purificada por TLC. Se pueden observar los 16 picos que indican la presencia de diferentes moléculas, las cuales se caracterizan por tener diferentes tiempos de retención, las flechas rojas indican los compuestos de interés por su potencial antimicrobiano reportado.

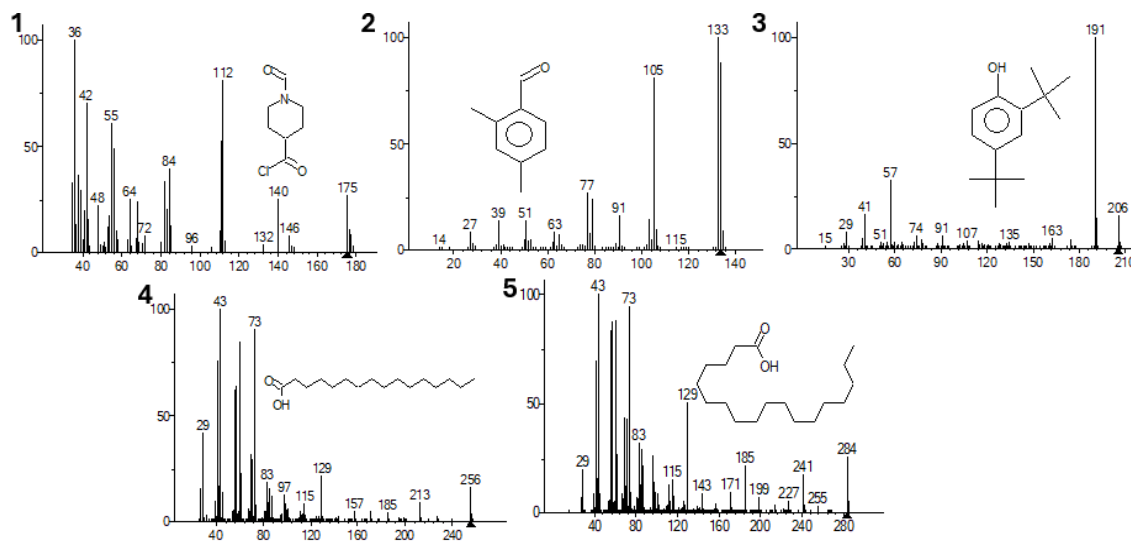


Figura 26. Espectros de masas de los compuestos de interés detectados por GS/MS. (1) N-Carboxal-4-carboxi-cloropiperidina. (2) 2,4-Dimetilbenzaldehído. (3) Fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletilo). (4) Ácido n-hexadecanóico. (5) Ácido 6-octadecanóico.

8. DISCUSIÓN

Se ha reportado que las rizobacterias producen una amplia gama de metabolitos secundarios con destacado potencial antimicrobiano tales como lipopéptidos, pirrolnitrinas, iturinas, surfactinas, fenazinas, sideróforos, VOCs, entre otros compuestos (97). Esta investigación identificó a la bacteria rizosférica aislada del maíz rojo con base en los genes 16S rDNA, *gyrB* y *rpoB*, se demostró que la bacteria tiene un parentesco cercano a *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain JD37 con un soporte Bootstrap del 100%. Este resultado se obtuvo mediante la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de Máxima Verosimilitud y 1000 repeticiones de Bootstrap. La bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantica* destaca por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica (98).

Pseudomonas chlororaphis EMM2 fue aislada junto con la bacteria *Pseudomonas protegens* EMM1 de la rizósfera del maíz rojo autóctono, esta bacteria ha demostrado tener una amplia actividad antimicrobiana contra hongos fitopatógenos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. Además, se ha reportado su potencial inhibitorio contra cepas bacterianas de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Streptococcus* (85,96,99).

Aguilera Méndez (2009) reportó el potencial inhibitorio de *P. chlororaphis* EMM2 contra diversas bacterias aisladas del suelo, pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Bradyrhizobium*. Además, se observó la inhibición de varias cepas bacterianas aisladas de pacientes del Hospital ISSTEP, entre las cuales se encontraron las cepas patógenas: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* y *Staphylococcus simulans* (73).

Pseudomonas chlororaphis es utilizada para el biocontrol de fitopatógenos en la agricultura, ya que produce diversos compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana, siendo las fenazinas los metabolitos secundarios más característicos y estudiados de esta bacteria (100). Con el objetivo de buscar la presencia del operón *phz*, responsable de la síntesis de fenazinas, se diseñaron unos oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen que codifica enzima *phzF* (involucrada en la ruta biosintética de las fenazinas). Como resultado se logró la amplificación del gen *phzF*, lo que indica la presencia del operón *phz*. Sin embargo, esto no garantiza la producción de fenazinas, ya que la producción de estos metabolitos secundarios depende de los sistemas de dos componentes GacS/GacA y RpeA/RpeB, los cuales responden a señales ambientales como la disponibilidad de nutrientes o pH, la activación de este sistema lleva a la expresión del operón, que codifica las enzimas necesarias para la biosíntesis de fenazinas (101). Por otro lado, el sistema quorum sensing (QS) también influye en la producción de estos metabolitos en dependencia a la

densidad celular, por ejemplo, ante una alta densidad celular se promueve la síntesis de acil homoserina lactonas (AHLs), que se unen a factores de transcripción y, a su vez, activan al promotor del operón *phzF*, activando la síntesis de fenazinas (102).

Para probar el potencial inhibitorio de *P. chlororaphis* EMM2, se realizaron estudios de inhibición contra microorganismos aislados de una hoja de plátano (*Musa paradisiaca* var. Cavendish) con signos de infección, la hoja fue obtenida de una planta de tres años de crecimiento de un cultivo de plátano roatan en el municipio de Cohauayana, Michoacan.

Hay que destacar que los resultados indicaron que fueron cuarenta y seis los microorganismos aislados de la hoja de plátano con signos de infección, siendo veintiocho bacterias y dieciocho hongos identificados por su morfología microscópica y macroscópica. Con algunos de estos microorganismos se realizaron las pruebas de inhibición para comprobar la actividad inhibitoria de *Pseudomonas chlororaphis* EMM2. Las metodologías utilizadas fueron la de inhibición simultánea y la de doble capa. En la metodología de inhibición simultánea fueron inhibidas 70,5% de las bacterias y 83,3% de los hongos, en cambio, en la metodología de doble capa se inhibió el 75% de las bacterias y el 66,6% de los hongos. El ensayo de inhibición simultánea evalúa la interacción directa entre microorganismos, donde la inhibición del crecimiento puede deberse tanto a la producción de metabolitos antimicrobianos como a la competencia por nutrientes en el medio. En contraste, el ensayo de doble capa mide específicamente la supresión de crecimiento causada por metabolitos difusibles secretados previamente por el antagonista, pero no se detectan los metabolitos volátiles o los producidos ante un contacto directo entre los microorganismos (85,86). Esta diferencia en los ensayos explica las variaciones observadas en los porcentajes de inhibición.

Además, se empleó la metodología de cultivo dual para evaluar la actividad antagonica de *P. chlororaphis* EMM2 contra los hongos que mostraron una mayor sensibilidad frente a la cepa EMM2 en los ensayos de inhibición previos. Como resultado se observó una inhibición en el desarrollo del micelio de todos los hongos evaluados. En el cultivo dual se evalúa el contacto directo entre un microorganismo antagonista (*P. chlororaphis* EMM2) y un hongo, para la cuantificación del porcentaje de inhibición micelial. Los resultados obtenidos demuestran que *P. chlororaphis* EMM2 produce metabolitos antifúngicos efectivos contra los hongos evaluados (87).

Con base en las características microscópicas y macroscópicas de los hongos aislados, se seleccionaron aquellos con características similares a *Mycosphaerella fijiensis* para su identificación molecular, así como los hongos más sensibles ante *P. chlororaphis* EMM2. De los dieciocho hongos aislados, diez

fueron identificados molecularmente. Los resultados mostraron que todos los hongos están genéticamente relacionados con el género *Fusarium*. Para no descartar la presencia del agente causal de la Sigatoka negra, se amplificó por PCR una secuencia específica para *Mycosphaerella fijiensis* en todos los hongos aislados, sin embargo, no se obtuvo ningún resultado positivo. En consecuencia, se puede concluir que ninguno de los hongos aislados de hojas de plátano con signos de infección correspondía al agente causal de la Sigatoka negra.

Para buscar el hongo *Fusarium* causante del daño a la hoja de *Musa paradisiaca* var. (Cavendish), se realizaron pruebas de patogenicidad con los hongos: HHPL1, HHPL2, HHPL4, HHPL6, HHPL10, HHPL12, HHPL8. La evaluación fue realizada por triplicado en diferentes periodos para tener una certeza del resultado. De acuerdo con las pruebas de patogenicidad, los hongos causantes de las manchas necróticas en las hojas de plátano fueron: HHPL10 y HHPL12, los cuales están cercanamente relacionados con *Fusarium temperatum* y *Fusarium verticilicoides*, respectivamente, por lo que se puede concluir que estos hongos pueden actuar como fitopatógenos bajo las condiciones experimentales. El hongo *Fusarium verticilicoides* ha sido reportado como agente causal de pudriciones poscosecha en plátano, considerándose una de las enfermedades más destructivas para este fruto durante el almacenamiento (103). No obstante, este patógeno es más conocido por su impacto en el cultivo de maíz, donde provoca pudrición de la raíz y mazorca, además de producir micotoxinas peligrosas como las fumonisinas (104). Por su parte, *Fusarium temperatum* ha emergido como un fitopatógeno devastador para el cultivo de maíz en Asia, Europa y Sudamérica. Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias que lo señalen como patógeno en el cultivo del plátano (105).

Se comprobó que la bacteria *P. chlororaphis* EMM2 puede antagonizar una amplia variedad de microorganismos, por lo que el siguiente paso fue extraer y caracterizar parcialmente a la/s sustancia/s que producían la actividad inhibitoria. Previo a la extracción, se realizó un monitoreo de producción de compuestos antimicrobianos durante tres días con la finalidad de buscar el periodo en el cual hay una mayor producción de compuestos antimicrobianos, como resultado se demostró que la bacteria produce un mayor halo de inhibición a las 72 horas de incubación, y por ende, una mayor producción de antimicrobianos, debido a que en este periodo la bacteria se encuentra en la fase estacionaria, activándose el metabolismo secundario debido al estrés ocasionado por la limitación de nutrientes, la producción de estos compuestos se debe a que la bacteria los puede usar como defensa para la competencia por nutrientes y espacio (106).

La extracción de las sustancias inhibitorias se realizó por el método de solvente, el cloroformo fue el solvente de elección por dos razones principales, la primera es su polaridad baja que permite disolver compuestos moderadamente polares o apolares como lo son muchos compuestos antimicrobianos, y la

segunda razón es la compatibilidad con metabolitos secundarios dada su naturaleza orgánica (107).

Se probaron dos temperaturas de incubación y tres diferentes medios de cultivos con diferentes fuentes de carbono para la producción de los compuestos antimicrobianos (Anexo 3), esto se realizó debido a que Martínez Ramos (2023), estudió el impacto de la fuente de carbono, temperatura y oxigenación para la producción de sustancias antimicrobianas en la bacteria *P. protegens* EMM1, concluyendo que la fuente de carbono que permite una mayor producción de metabolitos antimicrobianos es el glicerol, y a una temperatura de 23 °C (108). La incubación de la bacteria *P. chlororaphis* EMM2 se hizo a una temperatura de 30 °C y 23 °C, y los medios de cultivos utilizados fueron: LB, GYP y TESMA. Los halos de inhibición solo se hicieron presentes al utilizar el medio de cultivo GYP y al incubar la bacteria a 23 °C, este resultado se debe a que el glicerol se convierte de forma rápida en glicerol-3-fosfato, el cual es un precursor esencial para antimicrobianos, además, esta molécula puede activar vías glucolíticas y gluconeogénicas proporcionándole energía a la bacteria y, al mismo tiempo, estimulando la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (109,110, 111). Por otro lado, la producción de metabolitos antimicrobianos a los 23 °C puede estar relacionado a que, a temperaturas de alrededor a los 30 °C, el regulador transcripcional RhIR es inestable (108). El sistema Rhl en *Pseudomonas* es un sistema de señalización de doble componente que consta de un sensor (RhIS) y un regulador (RhIR), los genes bajo el control de RhIR se termo regulan, incluyendo los implicados en la producción de antimicrobianos, el sistema Rhl/RhIR es más activo a temperaturas subóptimas, promoviendo la síntesis de metabolitos antimicrobianos, pero se desestabiliza a temperaturas de 30°C (112, 113).

Aguayo Acosta (2015), logró caracterizar de manera parcial algunos metabolitos producidos por *Pseudomonas protegens* EMM1 anteriormente conocida como *Sphingomonas* sp. DS 204, para la caracterización partió del extracto crudo de la bacteria y probó cinco solventes con diferente polaridad: pentano, tolueno, cloroformo, benceno y etil acetato, teniendo una extracción exitosa únicamente con cloroformo, por ello, en este estudio se trabajó con este solvente (91). El cloroformo tiene características fisicoquímicas como su polaridad intermedia, bajo punto de ebullición y baja reactividad química que lo hacen idóneo para de extracción de numerosos compuestos antimicrobianos (114).

El extracto parcialmente purificado por TLC fue analizado por GS/MC, se detectaron dieciséis compuestos, pero solo cinco de ellos fueron de interés por sus propiedades antimicrobianas. El primer compuesto es el N-carboxal-4-carboxi-cloropiperidina, las piperidinas tienen potencial bactericida y fungicida, y en específico las cloropiperidinas inhiben la síntesis de ergosterol en los hongos,

conllevando a un daño celular (115). Si bien no se ha reportado el compuesto detectado, es muy probable que posea actividad antifúngica y bactericida debido a la estructura del compuesto. También fue detectada la molécula 2,4-Dimetilbenzaldehído la cual posee actividad antimicrobiana previamente reportada, el tercer compuesto de interés fue el fenol-2,4 bis(1,1-dimetiletilo), esta molécula se ha aislado de bacterias como *Bacillus licheniformis* y ha demostrado actividad inhibitoria contra fitopatógenos (116). Por último, fueron detectados dos tipos de ácidos grasos, el ácido n-hexadecanoico y el ácido 6-octadecanoico, estos compuestos alteran la pared celular bacteriana, interfiriendo con la cadena transportadora de electrones, conllevando a una muerte celular (117,118).

9. CONCLUSIONES

1. *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 demostró capacidad para inhibir una amplia variedad de bacterias y hongos, aislados de hojas de plátano infectadas.
2. *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 está dotada del gen que codifica para la enzima phzF. Sin embargo, no fueron detectadas fenazinas bajo las condiciones experimentales.
3. Entre los hongos aislados de la hoja de plátano no se amplificó la región variable dentro de ITS 1 específica para *Mycospaherella fijiensis*.
4. Los hongos HHPL10 y HHPL12, genéticamente relacionados con *Fusarium temperatum* y *Fusarium verticilioides*, respectivamente, demostraron que pueden ser potenciales fitopatógenos bajo las condiciones experimentales.
5. *Pseudomonas chlororaphis* EMM2 requiere glicerol como fuente de carbono y, debe ser incubada a 23 °C durante 72 horas para producir metabolitos antimicrobianos.
6. Se identificaron mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (GS/MC) cinco moléculas antimicrobianas producidas por *Pseudomonas chlororaphis* EMM2.

10. REFERENCIAS

1. Soubam Indrakumar Singh, Sharanpreet Singh, Bhawana, Adarsh Pal Vig, Chapter 13 - Earthworm-assisted bioremediation of agrochemicals, Editor(s): Majeti Narasimha Vara Prasad, Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation, Butterworth-Heinemann, 2020, Pages 307-327.
2. Divya Singh, Sandeep Kumar Singh, Arpan Modi, Prashant Kumar Singh, V. Yeka Zhimo, Ajay Kumar, Chapter 4 - Impacts of agrochemicals on soil microbiology and food quality, Editor(s): Majeti Narasimha Vara Prasad, Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation, Butterworth-Heinemann, 2020, Pages 101-116,
3. Devi PI, Manjula M, Bhavani RV. Agrochemicals, environment, and human health. *Annu Rev Environ Resour.* 2022;47(1):399–421. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-environ-120920-111015>
4. Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front Public Health.* 2016;4:1-8. doi: 10.3389/fpubh.2016.00148.
5. Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmaeel Q, El Hamss H, Belabess Z, Barka EA. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms.* 2022;10(3):596. doi: 10.3390/microorganisms10030596.
6. Pandit MA, Kumar J, Gulati S, Bhandari N, Mehta P, Katyal R, Rawat CD, Mishra V, Kaur J. Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens. *Pathogens.* 2022;11(2):273,1-21. doi: 10.3390/pathogens11020273.
7. Bonaterra A, Badosa E, Daranas N, Francés J, Roselló G, Montesinos E. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms.* 2022;10(9):1759. doi: 10.3390/microorganisms10091759.
8. Ayaz M, Li CH, Ali Q, Zhao W, Chi YK, Shafiq M, Ali F, Yu XY, Yu Q, Zhao JT, Yu JW, Qi RD, Huang WK. Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives. *Molecules.* 2023;28(18):6735,1-24. doi: 10.3390/molecules28186735.
9. Legein M, Smets W, Vandenheuvel D, Eilers T, Muyschondt B, Prinsen E, et al. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Front Microbiol.* 2020;11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>
10. Lahlali R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmaeel Q, El Hamss H, Belabess Z, Barka EA. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms.* 2022 Mar 9;10(3):596. doi: 10.3390/microorganisms10030596.
11. Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. *Microbial biotechnology*, 16(12), 2250–2263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>
12. Infante Danay, Martínez B, González Noyma, Reyes Yusimy. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Rev. Protección Veg.* (2009);24(1):14-21. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522009000100002&lng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522009000100002&lng=es)

13. Yu Y, Gui Y, Li Z, Jiang C, Guo J, Niu D. Induced Systemic Resistance for Improving Plant Immunity by Beneficial Microbes. *Plants*. 2022; 11(3):386,1-19. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
14. MARTIN HEIL, RICHARD M. BOSTOCK, Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences, *Annals of Botany*, Volume 89, Issue 5, 1 May 2002, Pages 503–512, <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>
15. Srivastava, Dhruv Aditya, Raviv Harris, Gilli Breuer, and Maggie Levy. 2021. "Secretion-Based Modes of Action of Biocontrol Agents with a Focus on *Pseudozyma aphidis*" *Plants* 10, no. 2: 210. <https://doi.org/10.3390/plants10020210>
16. Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P. *et al.* Evaluación de cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento, rendimiento y calidad del maíz dulce. *Representante científico* 12, 11598 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16044-2>
17. Ajjah, N.; Fiodor, A.; Pandey, A.K.; Rana, A.; Pranaw, K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. *Diversity* 2023, 15, 112. <https://doi.org/10.3390/d15010112>
18. Alori, E. T., & Babalola, O. O. (2018). Microbial Inoculants for Improving Crop Quality and Human Health in Africa. *Frontiers in microbiology*, 9, 2213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>
19. Bittencourt PP, Alves AF, Ferreira MB, da Silva Irineu LES, Pinto VB, Olivares FL. Mechanisms and Applications of Bacterial Inoculants in Plant Drought Stress Tolerance *Microorganisms*. 2023;11(2):502.doi: 10.3390/microorganisms11020502.
20. Höfte M. The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant disease. In: Köhl J, Ravensberg WJ, editors. *Microbial bioprotectants for plant disease management*. Burleigh Dodds; 2021.
21. Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN, Vyas RV. *Pseudomonas fluorescens*: A promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture. En: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. New Delhi: Springer India; 2016. p. 257–70.
22. Sánchez Carrillo R, Guerra Ramírez P. *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. *Rev Mex De Cienc Agric*. 2022;13(4):715–25. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342022000400715
23. Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., Zhang, Y., Cui, H., Yu, X., & Ye, Z. (2023). Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in *Microorganisms*. *Microorganisms*, 11(8), 2077. <https://doi.org/10.3390/microorganisms1108>
24. Glick, B. R., & Nascimento, F. X. (2021). *Pseudomonas* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase and Its Role in Beneficial Plant-Microbe Interactions. *Microorganisms*, 9(12), 2467. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122467>

25. Alori ET, Glick BR, Babalola OO. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol.* 2017;8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
26. Silva LI da, Pereira MC, Carvalho AMX de, Buttrós VH, Pasqual M, Dória J. Phosphorus-solubilizing microorganisms: A key to sustainable agriculture. *Agriculture.* 2023;13(2):462. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/2/462>
27. Aasfar A, Meftah Kadmiri I, Azaroual SE, Lemriss S, Mernissi NE, Bargaz A, et al. Agronomic advantage of bacterial biological nitrogen fixation on wheat plant growth under contrasting nitrogen and phosphorus regimes. *Front Plant Sci.* 2024;15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2024.1388775>
28. Lozano-González JM, Valverde S, Montoya M, Martín M, Rivilla R, Lucena JJ, et al. Evaluation of siderophores generated by *Pseudomonas* bacteria and their possible application as Fe biofertilizers. *Plants.* 2023;12(23):4054. <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/23/4054>
29. Rieusset, L., Rey, M., Muller, D., Vacheron, J., Gerin, F., Dubost, A., Comte, G., & Prigent-Combaret, C. (2020). Secondary metabolites from plant-associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1562–1580. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13598>
30. Johnson, E.T., Bowman, M.J., Gomes, R.P. *et al.* Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production in the genus *Chromobacterium*. *Sci Rep* **13**, 14292 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41277-0>
31. Julian WT, Vasilchenko AV, Shpindyuk DD, Poshvina DV, Vasilchenko AS. Bacterial-derived plant protection metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol: Effects on bacterial cells at inhibitory and subinhibitory concentrations. *Biomolecules.* 2020 ;11(1):13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11010013>
32. Pawar S, Chaudhari A, Prabha R, Shukla R, Singh DP. Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility. *Biomolecules.* 2019 ;9(9):443. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9090443>
33. Balthazar C, St-Onge R, Léger G, Lamarre SG, Joly DL, Filion M. Pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol are major contributors to *Pseudomonas protegens* Pf-5 biocontrol against *Botrytis cinerea* in cannabis. *Front Microbiol.* 2022;13. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.945498>
34. Cui Y, Song K, Jin Z-J, Lee L-H, Thawai C, He Y-W. Fructose promotes pyoluteorin biosynthesis via the CbrAB-CrcZ-Hfq/Crc pathway in the biocontrol strain *Pseudomonas* PA1201. *Synth Syst Biotechnol.* 2023;8(4):618–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2023.09.004>
35. Serafim B, Bernardino AR, Freitas F, Torres CAV. Recent developments in the biological activities, bioproduction, and applications of *Pseudomonas* spp. Phenazines. *Molecules.* 2023 ;28(3):1368. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1368>
36. LeTourneau MK, Marshall MJ, Cliff JB, Bonsall RF, Dohnalkova AC, Mavrodi DV, et al. Phenazine-1-carboxylic acid and soil moisture influence biofilm development and turnover of rhizobacterial biomass on wheat root surfaces. *Environ Microbiol.* 2018 ;20(6):2178–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29687554/>

37. Calderón CE, Tienda S, Heredia-Ponce Z, Arrebola E, Cárcamo-Oyarce G, Eberl L, et al. The Compound 2-Hexyl, 5-Propyl Resorcinol Has a Key Role in Biofilm Formation by the Biocontrol Rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *Front Microbiol.* 2019;10. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00396>
38. Ni H, Kong W-L, Zhang Y, Wu X-Q. Effects of Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas aurantiaca* ST-TJ4 against *Verticillium dahliae*. *J Fungi (Basel).* 2022;8(7):697. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8070697>
39. Razo-Belman R, Ozuna C. Volatile organic compounds: A review of their current applications as pest biocontrol and disease management. *Horticulturae.* 2023;9(4):441. <https://www.mdpi.com/2311-7524/9/4/441>
40. Crouzet J, Arguelles-Arias A, Dhondt-Cordelier S, Cordelier S, Pršić J, Hoff G, et al. Biosurfactants in plant protection against diseases: Rhamnolipids and lipopeptides case study. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.01014>
41. Arrebola E, Aprile FR, Calderón CE, de Vicente A, Cazorla FM. Insecticidal features displayed by the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *Int Microbiol.* 2022;25(4):679–89. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-022-00253-w>
42. Raio A, Puopolo G. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(6). <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-021-03063-w>
43. Anderson AJ, Kim YC. Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *J Med Microbiol.* 2020;69(3):361–71. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001157>
44. Xun W, Gong B, Liu X, Yang X, Zhou X, Jin L. Antifungal Mechanism of Phenazine-1-Carboxylic Acid against *Pestalotiopsis kenya*. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11274. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/14/11274>
45. Peng H, Zhang P, Bilal M, Wang W, Hu H, Zhang X. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0962-3>
46. El-Banna, Winkelmann. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol.* 1998;85(1):69–78. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00473.x>
47. Pohanka A, Levenfors J, Broberg A. Antimicrobial dialkylresorcinols from *Pseudomonas* sp. Ki19. *J Nat Prod.* 2006;69(4):654–7. <http://dx.doi.org/10.1021/np0600595>
48. Kwak Y-S, Weller DM. Take-all of wheat and natural disease suppression: A review. *Plant Pathol J.* 2013;29(2):125–35. <http://dx.doi.org/10.5423/ppj.si.07.2012.0112>
49. Yi H-S, Ahn Y-R, Song GC, Ghim S-Y, Lee S, Lee G, et al. Impact of a bacterial volatile 2,3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. *Front Microbiol* 2016;7. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00993>
50. Anand A, Chinchilla D, Tan C, Mène-Saffrané L, L'Haridon F, Weisskopf L. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*. *Microorganisms.* 2020;8(8):1144. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8081144>

51. Liu Y, Dai C, Zhou Y, Qiao J, Tang B, Yu W, et al. Pyoverdines are essential for the antibacterial activity of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 under low-iron conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(7). <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02840-20>
52. Dimkpa CO, Zeng J, McLean JE, Britt DW, Zhan J, Anderson AJ. Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 is inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(5):1404–10. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.07424-11>
53. Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R, Huante P. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev Fitotec Mex.* 2013;36(3):251–8. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010
54. Li L, Li Z, Yao W, Zhang X, Wang R, Li P, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* qiu-1 for the enhanced production of phenazine-1-carboxamide. *J Agric Food Chem.* 2020;68(50):14832–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33287542/>
55. Narayanan KL, Krishnan RS, Robinson YH, Julie EG, Vimal S, Saravanan V, et al. Banana plant disease classification using hybrid convolutional neural network. *Comput Intell Neurosci*;2022:1–13. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/9153699>
56. de Agricultura y Desarrollo Rural S. Plátano: la fruta tropical más cultivada en México. *gob.mx.* <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/hoy-dia-del-platano?idiom=es>
57. Voora V, Bermúdez S, Farrell JJ, Larrea C, Luna E. Global Market Report: Banana prices and sustainability. International Institute for Sustainable Development. 2023, <https://www.iisd.org/publications/report/global-market-report-banana>
58. Drenth A, Kema G. The vulnerability of bananas to globally emerging disease threats. *Phytopathology.* 2021;111(12):2146–61. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-07-20-0311-rvw>
59. Muimba-Kankolongo A. Fruit production. En: *Food Crop Production by Smallholder Farmers in Southern Africa.* Elsevier; 2018. p. 275–312.
60. George M, Anita Cherian K, Mathew D. Symptomatology of Sigatoka leaf spot disease in banana landraces and identification of its pathogen as *Mycosphaerella eumusae*. *J Saudi Soc Agric Sci.* 2022;21(4):278–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2021.09.004>
61. da Rocha Júnior OM, Saraiva Câmara MP, Michereff SJ, J. de-Oliveira M, Mora-Aguilera G, Ruiz-García N. Caracterización espacial de la sigatoka amarilla del banano e implicaciones en el muestreo. *Agrociencia* (1996). 2010. 44(3):351–61. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952010000300009
62. Ganga Devi P, Thangavelu R. Genetic diversity analyses of *Mycosphaerella eumusae* causing Septoria leaf spot disease of banana in India. *Indian Phytopathol.* 2014;67(4):388–98. <https://epubs.icar.org.in/index.php/IPPJ/article/view/45502>

63. Wong M-H, Crous PW, Henderson J, Groenewald JZ, Drenth A. Phyllosticta species associated with freckle disease of banana. Fungal Divers. 2012;56(1):173–87. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0182-9>
64. Ekwomadu TI, Mwanza M. Fusarium fungi pathogens, identification, adverse effects, disease management, and global food security: A review of the latest research. Agriculture. 2023;13(9):1810. <https://www.mdpi.com/2077-0472/13/9/1810>
65. Arie T. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. J Pestic Sci. 2019 [citado el 20 de julio de 2024];44(4):275–81. <http://dx.doi.org/10.1584/jpestics.j19-03>
66. Sánchez-Espinosa AC, Villarruel-Ordaz JL, Maldonado-Bonilla L. The cause and potential solution to the Fusarium wilt disease in banana plants. Terra Latinoam 2020;38(2):435–42.
67. Manzo-Sánchez G, Orozco-Santos M, Martínez-Bolaños L, Garrido-Ramírez E, Canto-Canché B. Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (Musa sp.) en México. Rev Mex Fitopatol. 2014;32(2):89–107. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200089
68. de la Cruz Quiroz R, Cruz Maldonado JJ, Rostro Alanis M de J, Torres JA, Parra Saldívar R. Fungi-based biopesticides: shelf-life preservation technologies used in commercial products. J Pest Sci (2004). 2019;92(3):1003–15. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-019-01117-5>
69. Sánchez-Espinosa AC, Villarruel-Ordaz JL, Maldonado Bonilla LD. Mycoparasitic antagonism of a Trichoderma harzianum strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico: Novel Trichoderma strain protects against Fusarium. Biotecnia 2021;23(1):127–34.
70. Gutierrez-Monsalve JA, Mosquera S, González-Jaramillo LM, Mira JJ, Villegas-Escobar V. Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on Bacillus subtilis EA-CB0015 culture. Biol Control. 2015;87:39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.012>
71. Liu K, Li Z, Liang X, Xu Y, Cao Y, Wang R, et al. Biosynthesis and genetic engineering of phenazine-1-carboxylic acid in Pseudomonas chlororaphis Lzh-T5. Front Microbiol. 2023;14. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1186052>
72. Kumar S, Diksha, Sindhu SS, Kumar R. Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. Curr Res Microb Sci 2022;3(100094):100094. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
73. Aguilera-Méndez N.; 2009. Tesis “Búsqueda de sustancias inhibitorias en *Sphingomonas* sp.” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla- Centro de Investigación en ciencias microbiológicas 2009.
74. Cesa-Luna C, Muñoz-Rojas J, Saab-Rincon G, Baez A, Morales-García YE, Juárez-González VR, et al. Structural characterization of scorpion peptides and their bactericidal activity against clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. 2019;14(11):e0222438. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0222438>
75. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23(21):2947–8. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

76. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022–7. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>
77. Zou Y, Zhang Z, Zeng Y, Hu H, Hao Y, Huang S, et al. Common methods for phylogenetic tree construction and their implementation in R. *Bioengineering* 2024;11(5):480. <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering11050480>
78. Madrigal-Valverde KA. Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. *Rev Tecnol Marcha.* 2017;30(5):30. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v30i5.3218>
79. Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Raaijmakers JM, Lemanceau P, et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(3):866–79. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02009-09>
80. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/qkm306>
81. Dos Reis JBA, do Vale HMM, Lorenzi AS. Insights into taxonomic diversity and bioprospecting potential of Cerrado endophytic fungi: a review exploring an unique Brazilian biome and methodological limitations. *World J Microbiol Biotechnol.* 2022;38(11):202. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-022-03386-2>
82. De la Torre Duque De Oliva Estrella Pérez y Terrón Rocío Martínez Martínez Lucía Martínez Contreras Rebeca Muñoz Rojas Jesus, M. G. Y. E. T. Z. J. (Ed.). (2013). *Aspectos críticos a considerar para el aislamiento de bacterias benéficas* (Vol. 11, Número 7). SABERES COMPARTIDOS.
83. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 2017;80(3):756–70. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
84. Michel Leiva-Mora, Orelvis Portal, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Cynthia Sánchez-García, Luis Emelio Rojas, Berkis Roque. Identificación molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *SciELO.* 2013;229–231.
85. Molina-Romero D, Baez A, Castañeda-Lucio M, Ernesto Fuentes-Ramírez L, del Rocío Bustillos-Cristales M, Rodríguez-Andrade O, et al. Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds. v1. 2017. <http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j4mcqu6>
86. Castañeda Antonio, M., Cesa Luna, C., Báez, A., et al. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens, 2020. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/17896>
87. Xu SJ, Kim BS. Biocontrol of Fusarium crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. *Mycobiology.* 2014;42(2):158–66. <http://dx.doi.org/10.5941/myco.2014.42.2.158>
88. Amini J, Agapoor Z, Ashengroph M. Evaluation of *Streptomyces* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. *J Plant Prot Res.* 2016;56(3):257–64. <http://dx.doi.org/10.1515/jppr-2016-0038>
89. Patel ZM, Jampala SSM. Detection of leaf spot disease of banana caused by *Alternaria* sp. in Gujarat, India. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz.* 2021;54(17–18):1436–42. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2021.1911570>

90. Herrera Parra E, Bacab Pérez I. M, Alejo J. C, Tun Suárez J. M, , Ruíz Sánchez E. Patogenicidad de *Fusarium solani* (MART.) sacc. y *alternaria alternata* (fries) keissler en thevetia peruviana (pers.) k. schum. y su control in vitro. *Fitosanidad* . 2011;15(4):231-236. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>
91. Acosta AA. Identificación y caracterización parcial de una sustancia inhibitoria producida por *Sphingomonas* sp. DS-204. [Puebla, Pue.]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2015.
92. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005;54(1):57–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2005.02.011>
93. Ansari A, Zohra RR, Tarar OM, Qader SAU, Aman A. Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant Bacteriocin active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *BMC Microbiol.* 2018;18(1):192. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1337-y>
94. Cesa-Luna C, Aguayo-Acosta A, Morales-García YE, Hernández-Luna I, Ramírez-Valverde A, Aragón-Hernández C, et al. PURIFICACIÓN PARCIAL DE UNA SUSTANCIA INHIBITORIA PRODUCIDA POR *Sphingomonas* sp. DS204 Y SU ANTAGONISMO CONTRA *Klebsiella* spp. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.21421.03049>
95. Lee T, Park D, Kim K, Lim SM, Yu NH, Kim S, et al. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. *Plant Pathol J.* 2017;33(5):499–507. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126>
96. Cesa-Luna C. Avances en la caracterización de la (s) sustancia (s) inhibitoria (s) producida (s) por *Sphingomonas* sp. DS-204, y su efecto contra cepas de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Streptococcus*. Unpublished; 2016. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.20224.64006/1>
97. Loera-Muro A, Caamal-Chan MG. Biopelículas en la rizósfera y su papel en la producción de compuestos antimicrobiales en el suelo. *Terra Latinoam.* 2023;41. <http://dx.doi.org/10.28940/terra.v41i0.1733>
98. Zhang C-M, Xu M-J, Li X-W, Gong Y, Xing K, Qin S. Complete genome sequence of the biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41. *Mol Plant Microbe Interact.* 2021;34(7):839–41. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-01-21-0005-a>
99. De La Cruz-Enríquez, J. (2019) *Sphingomonas* sp. *Ds204* como alternativa para antagonizar a hongos patógenos en cultivos de maíz. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
100. Yu JM, Wang D, Ries TR, Pierson LS 3rd, Pierson EA. An upstream sequence modulates phenazine production at the level of transcription and translation in the biological control strain *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *PLoS One.* 2018;13(2):e0193063. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0193063>
101. Wang, D., Yu, J. M., Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2012). Differential regulation of phenazine biosynthesis by RpeA and RpeB in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 7), 1745–1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059352-0>

102. Selin, C., Fernando, W. G. D., & de Kievit, T. (2012). The PhzI/PhzR quorum-sensing system is required for pyrrolnitrin and phenazine production, and exhibits cross-regulation with RpoS in *Pseudomonas chlororaphis* PA23. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 4), 896–907. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054254-0>
103. Salem NM, AIMomany AM, Tahat MM, Aldakil H. First report of *Fusarium verticillioides* causing banana fruit rot in Jordan. *Plant Dis.* 2020;104(12):3255. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-05-20-1116-pdn>
104. Báez-Astorga PA, Cázares-Álvarez JE, Cruz-Mendivil A, Quiroz-Figueroa FR, Sánchez-Valle VI, Maldonado-Mendoza IE. Molecular and biochemical characterisation of antagonistic mechanisms of the biocontrol agent *Bacillus cereus* B25 inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium verticillioides* P03 during their direct interaction *in vitro*. *Biocontrol Sci Technol* 2022;32(9):1074–94. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2022.2085662>
105. Robles-Barrios F, Ramírez-Granillo A, Medina-Canales MG, Gómez-Lim M, Loske AM, Rodríguez-Tovar AV, et al. *Fusarium temperatum* shows a hemibiotrophic infection process and differential pathogenicity over different maize breeds from Mexico. *J Phytopathol* (1986). 2022;170(1):21–33. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.13052>
106. Raaijmakers JM, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 2012;50(1):403–24. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-17290>
107. Hadadi Z, Nematzadeh GA, Ghahari S. A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. *BMC Chem.* 2020;14(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-020-00683-5>
108. Martínez-Ramos, I. (2023) Efecto de las variables de cultivo en la producción de metabolitos antagónicos de *Pseudomonas protegens* EMM1, Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
109. De Meneses L, Pereira JR, Sevrin C, Grandfils C, Paiva A, Reis MAM, et al. *Pseudomonas chlororaphis* as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. *N Biotechnol.* 2020;55:84–90. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678419300615>
110. Poblete-Castro I, Wittmann C, Nickel PI. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microb Biotechnol.* 2020;13(1):32–53. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13400>
111. Poblete-Castro I, Wittmann C, Nickel PI. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microb Biotechnol.* 2020;13(1):32–53. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13400>
112. de Oliveira Pereira T, Groleau M-C, Doucet N, Déziel E. Temperature-responsive control of *Pseudomonas aeruginosa* virulence determinants through the stabilization of quorum sensing transcriptional regulator RhlR. *bioRxiv.* 2024. <http://dx.doi.org/10.1101/2024.05.13.593818>
113. Magri M, Eljaoudi R, Belyamani L, Ibrahimi A, Mehdi Bouricha E. Unraveling the molecular mechanism of temperature-induced destabilization in

the PqsE-RhIR complex of *Pseudomonas aeruginosa* at mammalian body temperature through classical molecular dynamics and metadynamics. *J Mol Graph Model*. 2025;135(108931):108931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmglm.2024.108931>

114. Ugur A, Sarac N, Duru ME, Beyatli Y. In vitro study of antibacterial activity on multi-resistant bacteria and chemical composition of the chloroform extract of endemic *Centaurea drabifolia* subsp. *cappadocica*. *Nat Prod Commun*. 2009;4(9):1267–70. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578x0900400922>
115. Frolov NA, Vereshchagin AN. Piperidine derivatives: Recent advances in synthesis and pharmacological applications. *Int J Mol Sci* 2023 24(3):2937. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2937>
116. Karthick P, Mohanraju R. Antimicrobial potential of epiphytic bacteria associated with seaweeds of little Andaman, India. *Front Microbiol*. 2018;9. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00611>
117. Sajayan A, Ravindran A, Selvin J, Ragothaman P, Seghal Kiran G. An antimicrobial metabolite n- hexadecenoic acid from marine sponge-associated bacteria *Bacillus subtilis* effectively inhibited biofilm forming multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *Biofouling*. 2023;39(5):502–15. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2023.2232722>
118. Karthikeyan SC, Velmurugan S, Donio MBS, Michaelbabu M, Citarasu T. Studies on the antimicrobial potential and structural characterization of fatty acids extracted from Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13(1):332. <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-014-0057-x>

11. ANEXOS

11.1 Tabla de los oligonucleótidos utilizados

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA (5' – 3')	REFERENCIA
16S ADNr (Forward)	TAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG	(Morales García <i>et al.</i> 2011)
16S ADNr (Reverse)	CAGGGGCGGTGTGTACA	(Morales García <i>et al.</i> 2011)
rpoB (Forward)	CAGTTCATGGACCAGAACAACCCGCT	(Frapolli <i>et al.</i> 2007)
rpoB (Reverse)	CCCATCAACGCACGGTTGGCGTC	(Frapolli <i>et al.</i> 2007)
gyrB (Forward)	TTCAGCTGGGACATCCTGGCCAA	(Frapolli <i>et al.</i> 2007)
gyrB (Reverse)	TCGATCATCTTGCCGACTACCA	(Frapolli <i>et al.</i> 2007)
phzF (Forward)	TGTTCTGGAAACCCAGATG	Este trabajo
phzF (Reverse)	AGTGAAGAAGGCGCTGTAG	Este trabajo
MF (Forward)	GGC GCC CCC GGA GGC CGT CTA	(Johanson & Jener, 93)
MF (Reverse)	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	(Johanson & Jener, 93)

11.2 Composición de los medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo	Formulación
LB	Extracto de levadura (5g/L) Peptona de caseína (10g/L) NaCl (10g/L) Agar (16g/L)
Rojo Congo (pH 6.7 – 7)	Ácido málico (5g/L) K ₂ HPO ₄ 10% (5mL/L) KOH (4.8g/L) MgSO ₄ 10% (2mL/L) NaCl 10% (1mL/L) FeCl ₃ 10% (1.5mL/L) Rojo Congo 1:400 (15mL/L) Extracto de levadura (0.5g/L) Agar (16g/L)
LGI pH (5.5 – 5.7)	K ₂ HPO ₄ 10% (2mL/L) KH ₂ PO ₄ 10% (6mL/L) MgSO ₄ 10% (2mL/L) CaCl ₂ .2H ₂ O 10% (2mL/L) Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O 10% (200uL/L) Sacarosa (100g/L) Extracto de levadura (0.5g/L) FeCl ₃ .6H ₂ O 10% (1mL/L) Azul de bromotimol (6mL/L) Agar (16g/L)

BAC (pH 5.5 – 5.7)	Ácido succínico (5g/L) K ₂ HPO ₄ 10% (4mL/L) KH ₂ PO ₄ (4mL/L) MgSO ₄ (0.5g/L) Extracto de levadura (0.5g/L) Azul de bromotimol (6mL/L) Agar (16g/L)
SYP	Sacarosa (10g/L) Extracto de levadura (3g/L) K ₂ HPO ₄ (1g/L) KH ₂ PO ₄ (3g/L) Agar (16g/L)
GYP	Glicerol (10mL/L) Extracto de levadura (3g/L) K ₂ HPO ₄ (1g/L) KH ₂ PO ₄ (3g/L) Agar (16g/L)
TESMA (pH 6.7)	Extracto de levadura (2.7g/L) Glucosa (2.7g/L) Manitol (1.8g/L) TES/MES (4.4g/L) K ₂ HPO ₄ (4.8g/L) KH ₂ PO ₄ (0.65/L) Agar (16g/L)

11.3 Diámetros de halo de inhibición con diferente fuente de cultivo y temperatura

MEDIO DE CULTIVO \ TEMPERATURA	LB	GYP	SYP	TESMA
30°C	0 mm	4,-6±1,5mm	0 mm	0 mm
23°C	0 mm	37±7,2mm	0 mm	0 mm

12. PUBLICACIONES

1. Luna-Pérez EE, Muñoz-Rojas J. El peligro de los agroquímicos y los microorganismos como una alternativa. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2025.
2. Luna-Pérez EE, Mendoza-Rojas E, Morales-García YE, Gordillo-Ibarra X, Muñoz-Morales JM. Microorganismos en dormancia en los glaciares polares y los riesgos emergentes por el cambio climático. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024.
3. Luna Pérez EE. Las fenazinas como antimicrobianos en la agricultura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2024.
4. Luna Pérez EE. Discusión de artículo “Métodos moleculares independientes de cultivo para la detección de mecanismos de resistencia a antifúngicos e identificación de hongos”; 2023.
5. Muñoz-Morales JM, Luna-Pérez EE, Morales-García YE. Detección de ácaros en medios de cultivo, contaminantes que dejan senderos; 2023.