



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

TESIS

“Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in planta* de los metabolitos secundarios producidos por *Paraburkholderia* sp. GB99 frente a *Fusarium solani*, un fitopatógeno del café”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Con opción en Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:

ITZIA CITLALI GUEVARA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. VIANEY MARÍN CEVADA

H. PUEBLA DE Z. A 28 ENERO, 2026



Puebla, Pue. a 22 de enero 2026

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 **Itzia Citlali Guevara González**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* e *in planta* de los metabolitos secundarios producidos por *Paraburkholderia* sp. GB99 frente a *Fusarium solani*, un fitopatógeno del café"

A nuestro juicio, la alumna **Itzia Citlali Guevara González** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"



D.C. Dalia Molina Romero

D.C. Luis Javier Martínez Morales

D.C. Ricardo Carreño López

D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo reconocimiento a mis padres, cuyo amor incondicional, sacrificio silencioso y fe absoluta en mis capacidades me sostuvieron durante todo este camino académico.

Agradezco de corazón a mis asesores de tesis cuyo conocimiento, orientación precisa y confianza constante fueron el pilar fundamental de esta investigación, guiándome en cada etapa con sabiduría y paciencia.

A mis queridos amigos (Monse, Kate, Chris y Teo), agradezco su invaluable apoyo emocional, las largas noches, las risas compartidas y la motivación constante que hicieron este proceso no solo posible, sino profundamente enriquecedor.

A mi directora de tesis D. C. Vianey Marín Cevada por siempre creer en mí y su confianza, por darme la oportunidad de trabajar con ella y formar parte de su equipo, siempre estaré muy agradecida por su apoyo incondicional.

Al Dr. Luis Ramiro, mi eterno agradecimiento por su valioso tiempo, dedicación y generoso apoyo en el uso del equipo FTIR para el análisis espectral de las muestras.

Al Dr. Sebastián Hernández (Uniparts), mi sincero reconocimiento por su incondicional apoyo, amabilidad, paciencia en la metodología de citotoxicidad y su constante motivación que nos permitió superar todos los retos experimentales.

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

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo prestado durante el desarrollo de esta Tesis, sobre todo, a Licenciada Ángeles por su gran labor y guía para nosotros.

¡A todos ustedes, mi gratitud eterna! ¡Esta tesis es también suya!

CITLALI

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	10
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1. ORIGEN Y TAXONOMÍA DE <i>COFFEA</i>	12
3.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE CAFÉ A NIVEL MUNDIAL	15
3.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE CAFÉ A NIVEL NACIONAL	16
3.4. PROBLEMÁTICA EN EL CULTIVO DE CAFÉ: <i>FUSARIUM SOLANI</i>	17
3.5. CONTROL BIOLÓGICO: <i>BURKHOLDERIA SENSU LATO</i>	18
4. ANTECEDENTES	20
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. OBJETIVOS	24
6.1. OBJETIVO GENERAL	24
6.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	25
7.1.1. HONGO FITOPATÓGENO	25
7.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>BURKHOLDERIA SPP.</i>	25
7.2. OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE GB99	25
7.2.1. CURVA DE CRECIMIENTO Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	25
7.2.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS	26
7.3. ENSAYOS DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> : DIFUSIÓN EN POZOS	27
7.4. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE SACAROSA POR ESPECTROSCOPIA FTIR	27
7.5. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD	28
7.5.1. FITOTOXICIDAD DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	28
7.5.2. CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)	29
7.5.3. TOXICIDAD AGUDA EN <i>EISENIA ANDREI</i>	31
7.6. ENSAYOS <i>EX VIVO</i> EN HOJAS DE CAFÉ	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1. REACTIVACIÓN DE CEPAS	34
8.1.1. HONGO FITOPATÓGENO <i>FUSARIUM SOLANI</i>	34
8.1.2. CEPA BACTERIANA <i>PARABURKHOLDERIA SP.</i> GB99	35
8.2. CURVA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTIFÚNGICOS DE GB99	35
8.3. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE SACAROSA POR ESPECTROSCOPIA FTIR	39
8.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD	41

8.4.1.	FITOTOXICIDAD EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	41
8.4.2.	CITOTOXICIDAD	46
8.4.3.	TOXICIDAD AGUDA EN <i>EISENIA ANDREI</i>	50
8.5.	ENSAYOS <i>EX VIVO</i> EN HOJAS DE CAFÉ	53
9.	CONCLUSIONES	56
10.	PERSPECTIVAS	57
11.	ANEXOS	64
12.	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO FENOLÓGICO DEL CAFÉ Y PROBLEMAS COMUNES EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL CULTIVO DE CAFÉ, DESDE LA GERMINACIÓN HASTA LA POSCOSECHA.	14
FIGURA 2. LISTA DE LOS 10 PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE CAFÉ MUNDIALMENTE.	16
FIGURA 3. (A) COLONIAS DE <i>F. SOLANI</i> EN PDA DESPUÉS DE 7 DÍAS; (B) MICROCONIDIOS Y MACROCONIDIOS OBSERVADOS AL MICROSCOPIO.	34
FIGURA 4. COLONIAS DE GB99 EN PCAT.	35
FIGURA 5. A) MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA A 600 NM Y CUANTIFICACIÓN DE LAS UFC/ ML A LAS 24 HORAS DE LA CEPA GB99. B) CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA GB99 EN MEDIO MM9 + SACAROSA 2 % A 30 °C.	36
FIGURA 6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA CEPA GB99 VS <i>F. SOLANI</i> EN DIFERENTES HORAS DESPUÉS DE 12 DÍAS.	37
FIGURA 7. MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS INACTIVADOS DE LA CEPA GB99 A DIFERENTES TIEMPOS CONTRA <i>F. SOLANI</i> . LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (****) Y (*) CORRESPONDIENTES A $P < 0,05$ SE DETERMINÓ MEDIANTE UNA PRUEBA DE DUNN EN GRAPHPAD PRISM 8.0.1. LAS BARRAS DE ERROR INDICAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	38
FIGURA 8. A) IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN ESPECTRAL DE LAS BANDAS RELACIONADAS CON LA SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO A DIFERENTES CONCENTRACIONES. B) CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA SACAROSA COMO LÍNEA BASE 0% DE SACAROSA MEDIANTE LA DETECCIÓN DE DOS DE SUS BANDAS INFRARROJAS: 1056 cm^{-1} (VERDE) Y 997 cm^{-1} (MORADA). LA ABSORBANCIA AUMENTA CON EL INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA.	39
FIGURA 9. CURVA DE CALIBRACIÓN DESCENDIENTE A PARTIR DE UN MEDIO CON CONCENTRACIÓN DE 2% COMO LÍNEA BASE.	40
FIGURA 10. ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DEL CONSUMO DE SACAROSA POR LA CEPA GB99 EN MEDIO MM9 A DIFERENTES TIEMPOS, CON DOS BANDAS DE ABSORCIÓN REPRESENTADAS.	41
FIGURA 11. GERMINACIÓN DE <i>A. THALIANA</i> EN MEDIO MS. METABOLITOS SECUNDARIOS (MS, PARTE SUPERIOR), METABOLITOS SECUNDARIOS CONCENTRADOS (MC, PARTE INFERIOR). 3 DPG (DESPUÉS DE LA GERMINACIÓN).....	43
FIGURA 12. MEDICIÓN DE LA LONGITUD DE RAÍCES DE <i>A. THALIANA</i> TRATADAS AL 10, 30 Y 50 % DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS SIN CONCENTRAR. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL TEST DE KRUSKAL-WALLIS CON SUS RESPECTIVAS SIGNIFICANCIAS. LA LÍNEA HORIZONTAL DENTRO DE LA CAJA REPRESENTA LA MEDIA, EL CUADRADO DE COLOR LA MEDIA $\pm$ EL DESVÍO ESTÁNDAR.....	46

FIGURA 13. ENSAYO EN AGAR SANGRE. A) $MgSO_4$ (-), B) MM9 (-), C) <i>E. COLI</i> (-), D) <i>S. AUREUS</i> (β -HEMÓLISIS, CONTROL +), E) METABOLITOS (-) Y F) GB99 (β -HEMÓLISIS). FOTOGRAFÍA DEL TERCER DÍA.	47
FIGURA 14. ENSAYO MTT CUALITATIVO DE VIABILIDAD CELULAR EN PBMC'S EXPUESTAS 24 H A DIFERENTES TRATAMIENTOS. (A) CONTROL NEGATIVO (RPMI), (B) ALTO® 100SL 0.1 MG/ML (DOSIS COMERCIAL), (C) ALTO® 100SL 0.5 MG/ML (DOSIS LETAL), (D) METABOLITOS GB99 30 %. CADA TRATAMIENTO POR TRIPLICADO. ESCALA DE COLOR MTT: PÚRPURA = VIABLE, AMARILLO = NO VIABLE.	48
FIGURA 15. VIABILIDAD PBMC'S (24H, N=3). ANOVA 1 VÍA ($P < 0.0001$) + TUKEY. CONTROL: $98.9 \pm 0.3\%$ VS METABOLITOS 30%: $78.3 \pm 0.4\%$ ($P < 0.0001$). METABOLITOS 30%: $78.3 \pm 0.4\%$ ($P < 0.0001$ AMBOS).	50
FIGURA 16. ASPECTO MORFOLÓGICO DE <i>EISENIA ANDREI</i> (48 H EXPOSICIÓN, OCDE 207). (A) CONTROL AGUA. (B) FURADAN® DOSIS RECOMENDADA. (C) FURADAN® DOSIS LETAL. (D) GB99. (E) MM9. (F - I) METABOLITOS DE GB99 10, 30, 50 Y 100%. N=30 LOMBRICES / TRATAMIENTO.	52
FIGURA 17. ENSAYO <i>EX VIVO</i> CON HOJAS DE CAFÉ DESPUÉS DE 21 DÍAS. A) CONTROL NEGATIVO (AGUA). B) ALTO 100®. C) METABOLITOS 30 %.	54
FIGURA 18. ENSAYO <i>EX VIVO</i> CON HOJAS DE CAFÉ DESPUÉS DE 21 DÍAS. A) CONTROL POSITIVO (<i>F. SOLANI</i>). B) ALTO 100® + <i>F. SOLANI</i> . C) METABOLITOS 30 % + <i>F. SOLANI</i>	55
FIGURA 19. ENSAYO <i>EX VIVO</i> EN HOJAS DE CAFÉ DÍA CERO. A) CONTROL NEGATIVO (AGUA). B) ALTO 100®. C) METABOLITOS 30 %. D) CONTROL POSITIVO (<i>F. SOLANI</i>). E) ALTO 100® + <i>F. SOLANI</i> . F) METABOLITOS 30 % + <i>F. SOLANI</i>	66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ÁREA TOTAL DE LA PLANTA (ROSETA Y PRIMERA FLOR) DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>A. THALIANA</i> . 21 DPI (DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN).	45
TABLA 2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE <i>EISENIA ANDREI</i>	52

1. RESUMEN

El café (*Coffea arabica* L.) constituye el segundo producto agrícola más comercializado mundialmente, generando ingresos significativos y sustentando directamente a millones de familias productoras en regiones tropicales. México contribuye de manera relevante en la producción de este cultivo, siendo Puebla una región clave por sus condiciones edafoclimáticas. Sin embargo, enfrenta serias amenazas por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium solani*, un hongo ubicuo del complejo *Fusarium* que representa uno de los principales fitopatógenos radiculares en múltiples cultivos. En café, este microorganismo causa enfermedades de pudrición radical, mal del talluelo y damping-off en almácigos, afectando todas las etapas fenológicas del cafeto desde la germinación hasta la fructificación. La dependencia de fungicidas químicos genera resistencia, contaminación ambiental y restricciones para exportación. Por ello, se buscan activamente métodos de control sustentables y amigables con el medio ambiente, destacando el uso de metabolitos secundarios bacterianos producidos por microorganismos rizosféricos como *Burkholderia* spp.

La presente investigación evaluó el potencial biofungicida y su seguridad toxicológica de los metabolitos secundarios producidos por la cepa bacteriana *Paraburkholderia* sp. GB99 contra *Fusarium solani*, un fitopatógeno causal de pudrición radicular en cafeto (*Coffea arabica*). La cinética de crecimiento de *Burkholderia* GB99 identificó la fase estacionaria a 96 h como óptima para la producción de metabolitos antifúngicos, alcanzando 10^{14} UFC/mL y halos de inhibición de 24.5 cm contra *F. solani*. En la parte de las evaluaciones de toxicidad, en *Arabidopsis thaliana*, los metabolitos sin concentrar al 30% mostraron 88.8% germinación y estimulación del crecimiento radicular y foliar con respecto al control. En células mononucleares humanas (PBMC), se preservó $78.3 \pm 0.4\%$ viabilidad y sin hemólisis eritrocitaria. En *Eisenia andrei* los metabolitos exhibieron >95% supervivencia vs 73.3% mortalidad por Furadan®, protegiendo fauna edáfica benéfica. Finalmente, el ensayo *ex vivo* en hojas de *C. arabica* confirmó eficacia

comparable a Alto® (32% vs 35% necrosis por *F. solani*) sin fitotoxicidad vascular, preservando la funcionalidad foliar.

2. INTRODUCCIÓN

La caficultura, entendida como la actividad de producción y comercialización del café desempeña un papel de vital importancia a nivel internacional. Este cultivo se extiende por más de 80 países y su impacto trasciende lo económico, influyendo también en el ámbito social al generar empleos directos e indirectos, así como divisas para las naciones productoras. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) al cierre del ciclo comercial 2024 la superficie dedicada al cultivo de café en México alcanzó, 703,943 hectáreas, lo que representó un incremento de 5,908 hectáreas (0.8 %) respecto al año anterior (698,036 hectáreas). Los principales estados productores fueron Chiapas (392,903 toneladas), Veracruz (256,256 toneladas) y Puebla (228,006 toneladas) que contribuyeron con el 37.2 %, 24.3 % y 21.6 % de la producción nacional, respectivamente. Puebla registró el mayor aumento (4,426 toneladas), seguido por Veracruz (2,808 toneladas) (SIAP, 2024).

La relevancia económica del café es indiscutible, con ingresos que superan los 15 mil millones de dólares anuales y una cadena productiva que involucra directa o indirectamente a aproximadamente 20 millones de personas. Sin embargo, este sector enfrenta constantes amenazas. El cultivo del café está sujeto a factores bióticos y abióticos que limitan su rendimiento y afectan la calidad del grano. Entre estos destacan cambios térmicos, sequías, precipitaciones intensas y heladas, fenómenos que reducen las áreas aptas para el cultivo y favorecen la proliferación de plagas y enfermedades (Izzeddin & Medina., 2011; Prabhu *et al.*, 2025; Mulatu *et al.*, 2023). Particularmente, las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos representan un desafío significativo para los agricultores, ya que pueden provocar desde una merma en la cosecha hasta la mortalidad de las plantas.

En México, la producción cafetalera se ve afecta por diversas patologías. Entre las plagas más relevantes se encuentran la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) y el minador de la hoja (*Leucoptera coffeella* Guérin). En cuanto a las enfermedades fúngicas, la más devastadora a nivel económico es la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Otras de importancia

incluyen el ojo de gallo (*Mycena citricolor* Berkeley & Curtis), la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke), la fomopsis (*Phoma costarricensis* Echandi), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum* F. Noack) y la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum* Schltdl.), entre otras (Leyva Mir, 2010).

En este contexto, *Fusarium solani* emerge como agente causal de la pudrición radicular o "corky-root disease" en raíces de café, de manera particular, en regiones cafetaleras como Veracruz central, se asocia frecuentemente con *F. oxysporum* y nematodos radicales como *Meloidogyne paranaensis* (López-Lima *et al.*, 2020; Gamboa-Becerra *et al.*, 2021). Estudios recientes han demostrado que el estrés hídrico incrementa su capacidad colonizadora y patogénica, con la presencia de genes efectores *SIX* y *Fum* que potencian su virulencia (Gamboa-Becerra *et al.*, 2021). Además, se ha aislado en viveros afectando plántulas de variedades como Typica, Bourbon y Sarchimor, coexistiendo con *F. oxysporum* en síntomas de damping-off (Cruz-Sarmiento, 2025), y en vectores como el escarabajo de la ambrosia *Xylosandrus morigerus* que disemina cepas patogénicas (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2022).

A pesar de que existen alternativas de control, principalmente basadas en productos químicos, éstas no han demostrado ser efectivas en muchos casos. El uso excesivo de estos productos conduce a la resistencia de los organismos que se pretenden controlar y contaminan el ambiente. Por lo tanto, se ha buscado activamente métodos más amigables con el medio ambiente, como el control biológico. En este sentido, se ha evidenciado que el empleo de microorganismos y/o sus metabolitos como agentes de control biológico representan una opción viable en el manejo de enfermedades por fitopatógenos (Mesa *et al.*, 2019; León *et al.*, 2024; Cortez *et al.*, 2025). A fin de enfrentar estos desafíos, la evaluación exhaustiva de metabolitos secundarios en condiciones controladas *in vitro* y en tejidos (*ex vivo*) o plantas vivas (*in planta*) resulta fundamental para identificar agentes de control biológico efectivos que puedan integrarse a estrategias de manejo sostenibles y reducir la dependencia de productos químicos. Entre estos microorganismos se incluyen hongos como *Penicillium* y *Trichoderma* (Mesa *et al.*, 2019; León

et al., 2024; Cortez *et al.*, 2025) así como bacterias, tal es el caso de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Agrobacterium* y *Burkholderia*, entre otros (Parra *et al.*, 2009; Bolívar *et al.*, 2016; Blanco & Castro, 2021). Varios estudios *in vitro* han demostrado la efectividad de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. y de extractos vegetales para inhibir el crecimiento de *Hemileia vastatrix* y *Fusarium* spp., mientras que evaluaciones *in planta* en viveros confirman su capacidad para reducir la incidencia de pudrición radicular y roya, promoviendo además el crecimiento de plántulas sin efectos negativos en el ambiente (Mesa-Vanegas *et al.*, 2019; Mamani-Huayhua *et al.*, 2021; Rosales-Hernández *et al.*, 2024).

Para enfrentar estos desafíos, la evaluación exhaustiva de metabolitos secundarios en condiciones controladas (*in vitro*) y en tejidos (*ex vivo*) o plantas (*in planta*) resulta fundamental para identificar agentes de control biológico efectivos que puedan integrarse en estrategias de manejo sostenible. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antifúngica *in vitro* y *ex vivo* de los metabolitos secundarios producidos por *Paraburkholderia* sp. GB99 frente a *Fusarium solani*, un fitopatógeno de la raíz del café que está afectando en las regiones productoras de Puebla. Se plantea la hipótesis de que dichos metabolitos serán capaces de inhibir el crecimiento fúngico y reducir la severidad de la enfermedad en hojas de café de *Coffea arabica*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Origen y taxonomía de *Coffea*

El café es originario de África, específicamente de regiones geográficas y climáticas dentro de la franja tropical comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, aproximadamente a 23° de latitud norte y sur. Desde la perspectiva botánica, el cafeto pertenece al género *Coffea*, que forma parte de la familia de las Rubiáceas (*Rubiaceae*). Esta familia, incluye alrededor de 500 géneros y más de 6,000 especies, constituidas principalmente por árboles y arbustos tropicales. El género *Coffea* abarca entre 100 y 126 especies autóctonas de

África tropical y de algunas islas del Océano Índico, como Madagascar (Davis *et al.*, 2006; 2011). Morfológicamente, son plantas leñosas, que varían desde arbustos hasta árboles de 5 a 10 metros de altura. Presentan hojas elípticas persistentes (de 12 - 24 cm de largo por 5 - 12 cm de ancho, coriáceas con nervadura pinnada), flores blancas fragantes (con tubo de la corola de 8 - 12 mm y anteras exertas) y frutos tipo drupa ("cereza") de forma ovoide - globular (12 - 17 mm, con pecíolo de 2 - 5 mm) que contienen dos semillas planas de endospermo córneo.

De todas estas especies, solo unas pocas tienen relevancia comercial a nivel global. Destacan *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (robusta), siendo *C. arabica* la responsable de más del 60 % de la producción mundial, y *C. canephora* de la mayor parte del resto. Otras especies como *Coffea liberica*, *Coffea excelsa* y *Coffea dewevrei* se cultivan en menor escala; aunque las dos últimas han sido recientemente reclasificadas como variedades de *Coffea liberica* (Davis *et al.*, 2006).

Coffea arabica puede alcanzar hasta 6 m de altura, con una forma cónica o irregular, y generalmente desarrolla un solo eje bajo condiciones normales de crecimiento (Maxiselly *et al.*, 2025). Su fruto, similar a una pequeña "cereza", cambia de color verde a rojo o amarillo durante la maduración, dependiendo de la variedad. *Coffea canephora*, por su parte puede llegar a los 10 m de altura, se cultiva a menores altitudes (400 – 800 m s. n. m.) y en climas más cálidos en comparación con *C. arabica* (óptimo entre 1000 – 2000 m s. n. m.).

El ciclo fenológico del café se divide en siete fases (0 - 6), desde la germinación hasta el reposo postcosecha, con duración variable según variedad y condiciones regionales (Figura 1) (Vignola *et al.*, 2018).

Fase 0 (Germinación - Almacigo): Desarrollo embrionario a plántula; usar semillas >80 % germinación, libres de *Rhizoctonia solani*; almacigo 8 semanas pretrasplante.

Fase 1 (Crecimiento vegetativo): Desde trasplante hasta inducción floral; fases vegetativas / reproductiva simultáneas en cultivo perenne.

Fase 2 (Desarrollo yemas): Yemas axilares crecen a 4 - 6 mm, entran en latencia ~30 días por estrés hídrico/endógeno.

Fase 3 (Floración): Ruptura latencia por lluvias; apertura 8 - 10 días post, flor dura 3 días, autofecundación > 90 % en *C. arabica*.

Fase 4 (Llenado frutos): Crecimiento fruto – endospermo - semilla; máxima competencia asimilados, movilización foliar.

Fase 5 (Maduración): Cambios morfo-fisiológicos a madurez fisiológica; cosecha por color cereza (verde-amarillo-rojo según variedad).

Fase 6 (Reposo): Postcosecha, producción apical limitada, defoliación; poda y alternancia bianual (baja-alta) por inversión en ramas.

Este ciclo bianual y susceptibilidad radical (fases 0 a 1) contextualizan vulnerabilidad a *F. solani* en plántulas / renuevos de Puebla. La fenología de *Coffea arabica* es clave para comprender su susceptibilidad a patógenos radicales. La floración es sincrónica inducida por lluvias tras un periodo seco (pulsos hídricos > 20 mm), e incluye las etapas preantesis (yemas indiferenciadas / latencia 4 - 6 semanas), antesis (apertura diurna, 50 - 100 flores por inflorescencia) y polinización, predominantes autógama y abiótica (Unigarro *et al.*, 2025).

	GERMINADOR	ALMÁCIGO	TRANSPLANTE	LLENADO DEL FRUTO	MITACA TRAVIESA	POSCOSECHA	LLENADO DEL FRUTO	COSECHA PRINCIPAL	POSCOSECHA
ETAPA									
PROBLEMAS	Damping Off (Mal del talluelo)	Nematodo, palomilla y perla de la tierra	Nematodos, fusarium, palomilla y llagas de la raíz	Época crítica de Broca		Broca	Broca de punto		Broca

Figura 1. Ciclo fenológico del café y problemas comunes en las diferentes etapas del cultivo de café, desde la germinación hasta la poscosecha.

Fuente: @smdeltropico. (2017, 17 mayo). Aplicación de controladores biológicos en cada etapa de cultivo de café. (imagen de twitter). <https://x.com/smdeltropico/status/867840429068242944/photo/1>

La fructificación inicia con una fase de expansión celular (frutos verdes duros, 3 a 4 meses) seguida de la lignificación del pericarpio y la maduración fisiológica (6 a 11 meses en total). Raíces superficiales (80 % de las raíces se encuentran en los primeros 30 cm del suelo) con una raíz pivotante que puede alcanzar 1 a 2 m de profundidad. Esta arquitectura, especialmente durante las etapas de plántula (germinación hipógea de 20 a 60 días) y fructificación temprana, la hace vulnerable al estrés climático y a la infección por patógenos como *Fusarium solani* (Mora, 2001; Cadena *et al.*, 2021; Serrato *et al.*, 2024) La invasión por hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., entre otros, se verá facilitada por heridas, la presencia de nematodos y se exacerba con desbalances nutricionales o sequía, siendo las etapas post floración y llenado del futo particularmente críticas (Mora, 2001; Cadena *et al.*, 2021; Huaman *et al.*, 2021; Serrato *et al.*, 2024).

3.2. Importancia económica del cultivo de café a nivel mundial

El café se produce en regiones de clima predominantemente cálido, involucrando a cerca de 25 millones de familias productoras en todo el mundo. Aproximadamente el 70 % de estos son pequeños productores con menos de 2 hectáreas de terreno (Tan, 2020; ICO, 2024). En el ciclo 2023/24, Brasil mantuvo su liderazgo como principal productor mundial con aproximadamente 66.3 millones de sacos de 60 kg (equivalente a 3.98 millones de toneladas), lo que representó un aumento del 6 % respecto al año anterior. Le siguieron Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopía y Uganda (Figura 2). La producción mundial se estimó entre 174.9 y 178 millones de sacos (10.49 y 10.68 millones de toneladas), registrando un alza del 4 al 5.8 % a pesar de las sequías en Asia y heladas previas en Brasil (OIC/USDA, 2024).

En el ámbito comercial, Brasil lideró las exportaciones en el mismo ciclo con aproximadamente 45 millones de sacos. Las importaciones estuvieron encabezadas por la Unión Europea, que adquirió alrededor de 50 millones de sacos (3 millones de toneladas), mostrando un incremento del 12 % impulsado por la demanda de cafés especiales (USDA, 2024).

Económicamente, la industria cafetalera global genera ingresos anuales que oscilan entre 145,600 y 200,000 millones de dólares estadounidenses, un valor en aumento respecto a años anteriores, impulsado por precios récord y por el crecimiento de cadena de valor sostenibles y de especialidad (Escamilla-Prado *et al.*, 2012; Fortune Business Insights, 2024)



Figura 2. Lista de los 10 principales países productores de café mundialmente.

Fuente: curitiba_cafe. (2021, 10 junio). Productores de café del Mundo. ¿De que país viene el café que estás tomando? (imagen de instagram). <https://www.instagram.com/p/CBREpavBDHN/>

3.3. Importancia económica del cultivo de café a nivel nacional

México cuenta con las condiciones climáticas favorables para la caficultura. En 2024, la superficie sembrada fue de 702,500 ha, con una superficie cosechada de 660,000 ha, que produjeron un volumen de 1,080,000 toneladas de café cereza (SIAP, 2024). Esto equivale, a 3.9 millones de sacos de 60 kg de café verde, representando un incremento del 1.9% respecto a 2023. El cultivo se distribuye en 14 entidades federativas (Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, México, Tabasco, Querétaro y Morelos) siendo Chiapas el principal productor con el 37 - 39 % del total nacional

(aproximadamente 400,000 toneladas), seguido de Veracruz (24 %) y Puebla (22 %) (SIAP, 2024).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y el informe más reciente del USDA (Coffee Annual Mexico MX2025-0026), aproximadamente el 39 % de la producción nacional corresponde a café arábica de altura (cultivado por arriba de 950 m s. n. m.), el 15 % a robusta y el resto a otras variedades. Para el ciclo 2024/25, se estima, una producción de 232,200 toneladas de arábica y 32,700 toneladas de robusta, proyectándose estabilidad para el siguiente ciclo a pesar de los desafíos climáticos persistentes (USDA, 2025). Esta distribución refleja una ligera expansión de las áreas de altura favorecida por renovaciones varietales y mejores prácticas agronómicas.

En Puebla, el café se produce en 625 comunidades de 55 municipios (SIAP, 2024). La superficie destinada al cultivo alcanza las 69,650 – 70,200 hectáreas, un 4 % más que lo reportado en SAGARPA 2011. El estado líder nacional en rendimiento, con 3.15 t / ha de café cereza en 2024 (equivalente a 10.1 - 12.22 sacos / ha de café verde), superando a Veracruz (2.8 t / ha). Puebla es el segundo productor nacional por volumen, con aproximadamente 707,000 - 710,000 sacos, lo que representa el 22% de la producción del país, frente a los 2.939 t / ha reportados en SIAP 2013. Municipios como Ajalpan, Tehuiztzingo, Tehuacán, Zacapala y Xicotepec impulsan esta tendencia mediante variedades renovadas como Oro Azteca (arábica) y robusta adaptada, beneficiándose de precios internacionales favorables y de una recuperación post sequías que eleva la competitividad regional.

3.4. Problemática en el cultivo de café: *Fusarium solani*

La producción cafetalera enfrenta numerosos desafíos, entre los que destacan los efectos del cambio climático, como temperaturas extremas y patrones de precipitación erráticos (sequías e inundaciones). Estos fenómenos provocan disminuciones en el rendimiento y la calidad, además de favorecer el incremento de enfermedades y plagas invasoras (Mora, 2001; Cadena

et al., 2021; Serrato *et al.*, 2024). Entre los problemas fitosanitarios, las enfermedades causadas por hongos y bacterias son de especial preocupación para los agricultores, ya que pueden afectar a la planta en cualquier etapa de su desarrollo (semilla, plántula o planta adulta) y manifestarse de manera cíclica. Estas enfermedades ocasionan pérdidas que van del 10 al 50 % de la producción, en la calidad del grano, aumentando los costos de manejo y fomentando el uso indiscriminado de plaguicidas, lo cual genera contaminación ambiental, afecta a especies no objetivo y promueve la resistencia en los patógenos (Olvera *et al.*, 2020; Flores *et al.*, 2023).

Las principales enfermedades fúngicas del café incluye: la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), el mal de hilachas (*Corticium koleroga*), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*), el ojo de gallo (*Mycena citricolor*), la fomosis o muerte descendente del café (*Phoma spp.*, *Phomopsis sp.*), la marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*), y además, a esta gran lista se ha documentado la presencia de *F. solani* que puede causar la enfermedad de la raíz corchosa del café y del cancro del tallo (Canet *et al.*, 2016).

La corchosis de la raíz está frecuentemente asociada a la infección concomitante del nematodo agallador *Meloidogyne paranaensis*, un problema grave para el cultivo de café en varios países cafetaleros. En México, particularmente en el estado de Veracruz, se registran pérdidas anuales considerables en plantaciones de *Coffea arabica* debido a esta enfermedad (López-Lima *et al.*, 2020; Gamboa-Becerra *et al.*, 2021). Por su parte, *F. solani* ha sido reportado como agente causal de pudrición radical del café en países como Marruecos (Al-Areqi *et al.*, 2015). En Puebla, condiciones como suelos ácidos y patrones de lluvia específicos podrían favorecer su presencia, relación que ha sido sugerida por estudios comparativos de biometría y patogenicidad realizados en México (Jiménez & Naty, 2009; Sáez, 2015).

3.5. Control biológico: *Burkholderia sensu lato*

El género *Burkholderia* comprende alrededor de 235 especies de bacterias Gramnegativas, metabólicamente diversas y versátiles. Recientes análisis filogenómicos

(basados en secuencias multilocus MLSA, ANI y genomas completos) han redefinido la taxonomía de este grupo, ahora conocido como *Burkholderia sensu lato*. Este complejo multigénero incluye, entre otros, a *Burkholderia sensu stricto*, *Paraburkholderia*, *Trinickia*, *Caballeronia*, *Mycetohabitans* y *Robbsia* (Mullins & Mahenthiralingam, 2021; Bach *et al.*, 2022). Esta reclasificación surgió de estudios genómicos que identificaron una alta densidad de clústeres biosintéticos de genes (BGC's) en sus genomas revelando un gran potencial como fuente de metabolitos secundarios bioactivos (Bach *et al.*, 2022). Estos microorganismos habitan nichos ecológicos diversos, desde la rizosfera y ambientes contaminados hasta asociaciones simbióticas con plantas, donde pueden actuar como promotores del crecimiento vegetal (PGPR), fijadores de nitrógeno y agentes de biocontrol. Sin embargo, hay especies del complejo *B. cepacia* (Bcc) que son patógenas para humanos, lo que limita ciertas aplicaciones agrícolas (Estrada-de Los Santos *et al.*, 2016; Bach *et al.*, 2022).

En el contexto del control biológico, las especies de *Burkholderia sensu lato* destacan por su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Bach *et al.*, 2022). La genómica comparativa ha identificado numerosos BGCs que codifican para enzimas como sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y policétidos sintasas (PKS) y terpenos, responsables de la síntesis de compuestos como la pirrolnitrina (inhibidor de la respiración mitocondrial fúngica), la occidiofungina (causa lisis de esporas), la xilocandina (daña membranas lipídicas) y sideróforos como la ornibactina (que secuestra hierro, un nutriente esencial para los hongos) (Bach *et al.*, 2022). Esta diversidad de mecanismos de acción posiciona a este grupo bacteriano como un reservorio promisorio para el desarrollo de biofungicidas.

4. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación se han constituido una colección de cepas bacterianas del grupo *Burkholderia sensu lato*. Inicialmente, se identificaron 46 aislados mediante comparación morfológica en medios selectivos, producción de pigmentos y herramientas moleculares, como la amplificación del gen ribosomal 16S, perfiles ARDRA (Amplified rDNA - Restriction Analysis) y la amplificación de genes de mantenimiento o metabólicos asociados a la fijación de nitrógeno. Estos aislados se obtuvieron de la rizosfera de diversos cultivos y plantas silvestres (maíz, pino, bromelia, ajo, chile canario, mora azul, helecho, maguey, orquídeas, alcatraz y café) en cinco regiones del Estado de Puebla (Antonio Flores, 2015; Vega Aguilar, 2015; Cervantes Álvarez, 2016). Este cepario continua en expansión, incorporando nuevos aislados provenientes de estudios de asociación con *Peponapis* sp y *Curcubita ficifolia*, en los que se han identificado bacterias de los géneros *Caballeronia*, *Mycetohabitans*, *Burkholderia* y *Paraburkholderia*.

A partir de esta colección, se han desarrollado diversas líneas de investigación orientadas a la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas, la evaluación de su capacidad como promotoras del crecimiento vegetal y, de manera destacada, la búsqueda de metabolitos con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos (Jiménez Gómez, 2019; Merino Espinoza, 2020; García Nieto, 2020; Islas Jiménez 2021; Guevara González, 2021).

El estudio pionero de Jiménez-Gómez (2019) se enfocó en la detección de metabolitos secundarios con actividad antifúngica a partir del cepario. Mediante ensayos *in vitro* (antagonismo dual, doble capa y difusión en pozos) contra hongos fitopatógenos del café (*Hemileia vastatrix*, *Alternaria longissima*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*), se determinó que la cepa designada como GB99 presentaba el mayor potencial. Esta cepa inhibió el crecimiento radial de *F. solani* en un 62 %, demostrándose que el efecto se debía a compuestos no volátiles producidos por la bacteria. Estudios posteriores evaluaron el efecto de estos idiolitos contra *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (García

Nieto, 2020; Islas Jiménez, 2021), sentando precedentes de su actividad biocontroladora, aunque sin abordar aún su aplicación en el cultivo de café.

Recientemente, la investigación ha avanzado hacia una caracterización integral de los metabolitos de GB99. Jiménez-Gómez (2025) evaluó diferentes fuentes de carbono (glicerol 3 %, fructosa 2 % y xilosa 3 %) para optimizar la producción de compuestos inhibidores de *F.solani*,

Identificando a la xilosa como el sustrato más efectivo. Paralelamente, los análisis bioinformáticos del genoma de GB99 revelaron la presencia de múltiples clústeres biosintéticos (BGCs) asociados a la síntesis de antifúngicos conocidos, como fenacina, pirrolnitrina, glidocbactina, occidiofungina y pioluteorina.

De manera complementaria, Ruiz–Andrade (2024) estudió la producción y actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de la cepa GB99 en medios sólidos y líquidos suplementados con xilosa al 3 % y fructosa al 2 %. Utilizando la técnica de medio envenenado confirmó una actividad antifúngica significativa contra *F. solani* las concentraciones del 30 y 50 %. Además, mediante análisis genómicos, identificó el *core* biosintético responsable de la producción de occidiofungina en GB99, sugiriendo que este compuesto es uno de los principales responsables de la actividad antifúngica observada.

En síntesis, los estudios previos han establecido una sólida base *in vitro*: la cepa GB99 produce metabolitos secundarios que inhiben eficazmente a *F. solani*, se han identificado fuentes de carbono que optimizan esta producción y se han detectado los clústeres genéticos potencialmente involucrados. Sin embargo, persisten vacíos críticos en el conocimiento como la caracterización química cuantitativa completa de los metabolitos activos y, de manera fundamental, la evaluación de su eficacia *ex vivo* o *in planta* bajo condiciones realistas de cultivo. Específicamente, no existen estudios que evalúen la aplicación de estos compuestos en plantas de café (*Coffea arabica*) bajo las condiciones edafoclimáticas de las regiones productoras, ni que elaboren las bases para su aplicación práctica y segura en el campo.

Es por ello, que el presente proyecto propone llevar a cabo ensayos *ex vivo* en hojas de café para confirmar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de *Paraburkholderia* sp. GB99 frente a *F. solani* e iniciar las bases para su aplicación práctica en el control biológico del café.

5. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del café posee una relevancia socioeconómica fundamental a nivel global. En México, este sector ocupa una posición destacada, siendo el décimo productor mundial y representado una fuente clave de ingresos y empleo para numerosas comunidades. No obstante, en los últimos años, la incidencia y severidad de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en este cultivo se han incrementado, fenómeno exacerbado por los cambios climáticos. Esta situación genera pérdidas económicas directas para los agricultores y conlleva un aumento en los costos de producción a escala nacional e internacional.

Actualmente, el manejo depende predominantemente del uso de agroquímicos. Esta estrategia presenta limitaciones significativas: además de incrementar costos de producción su eficacia puede verse reducida debido al desarrollo de resistencia en los patógenos. Asimismo, su aplicación indiscriminada conlleva riesgos para la salud humana, contamina suelos, fuentes de agua y afecta a organismos no objetivo, alterando los ecosistemas.

Ante esta problemática, es imperativo desarrollar e investigar métodos de control alternativos que sean eficaces, sostenibles y ambientalmente compatibles. El control biológico, mediante el uso de microorganismo o sus metabolitos, emerge como una estrategia promisoría para prevenir o mitigar el daño causado por fitopatógenos en el cafeto.

En este contexto, el presente trabajo se justifica al proponer la evaluación de la cepa bacteriana GB99 (*Paraburkholderia* sp.), productora de metabolitos antifúngicos. Estudios previos *in vitro* han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos patógenos del café, como *Fusarium solani*. Esta investigación busca avanzar en la validación de su potencial al evaluar dicha actividad *in vitro* y *ex vivo* (hojas de café), sentando las bases científicas para el desarrollo de un bioproducto que contribuya a un manejo fitosanitario más sostenible del cultivo de café.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagónica *in vitro* y *ex vivo* de los metabolitos secundarios producidos por *Paraburkholderia* sp. GB99 frente a *Fusarium solani*.

6.1.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un protocolo para el cultivo de *Paraburkholderia* sp. GB99 y la obtención de sus metabolitos secundarios antifúngicos.
- Cuantificar la inhibición del crecimiento de *F. solani* mediante ensayos de difusión de pozos *in vitro* con los metabolitos secundarios extraídos de la cepa GB99.
- Evaluar la fitotoxicidad de los metabolitos de la cepa GB99 en el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar la citotoxicidad de los metabolitos de GB99 en cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).
- Evaluar la toxicidad aguda en *Eisenia andrei* de los metabolitos secundarios obtenidos.
- Implementar un ensayo *ex vivo* en hojas de *Coffea arabica* para evaluar la capacidad de los metabolitos de GB99 para reducir la severidad de la pudrición causada por *F. solani*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

7.1.1. Hongo fitopatígeno

Se empleó una cepa de *Fusarium solani*, donada por la Dra. Gloria Carrión (INECOL) previamente aislada de cafeto. Para su reactivación, se cultivó en medio PDA (MCD Lab (infusión de papa 200 g/L, dextrosa 20 g/L, agar 15 g/L) durante 7 días a 26 °C. La pureza y características morfológicas se confirmaron en el microscopio estereoscópico y microscopio óptico.

7.1.2. Condiciones de cultivo de *Burkholderia* spp.

La cepa GB99, perteneciente al grupo *Burkholderia sensu lato* se seleccionó por su actividad antifúngica previamente contra fitopatógenos del café (Jiménez-Gómez, 2019). La cepa, criopreservada en glicerol al 30% a - 80 °C, se reactivó en caldo nutritivo (NB) y en medio PCAT (ver Anexo 1) a 30 °C durante 72 h. La pureza del cultivo se verificó mediante observación macroscópica, microscópica y tinción de Gram.

7.2. Obtención de los metabolitos secundarios de GB99

7.2.1. Curva de crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

Se preparó un preinóculo de GB99 en 5 mL de medio PCAT, incubado a 30 °C con agitación (110 rpm) durante 18 - 24 h, hasta alcanzar una DO_{600} de 0.067 (10^8 UFC / mL). A partir de este cultivo, se inocularon 50 μ L en matraces de 125 mL que contenían 50 mL de medio MM9 suplementado con sacarosa al 2% (Anexo 1), obteniendo una concentración de 10^5 UFC / mL. Los cultivos se incubaron a 30 °C con una agitación constante (110 rpm). Durante las primeras 24 h, se tomaron muestras cada 3 h para medir la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) y determinar las UFC / mL mediante la técnica de drop-plate en agar NB. Posteriormente, el muestreo se realizó cada 24 h hasta completar 168 h. El experimento se llevó a cabo por triplicado.

La tasa específica de crecimiento máximo (μ_{max}) y el tiempo de duplicación (t_d) se calcularon a partir de los datos de UFC / mL de la fase exponencial (6 -18 h). Los datos de UFC / mL se transformaron a escala logarítmica natural ($\ln$ (UFC / mL)) y se graficaron contra el tiempo en Microsoft Excel® mediante dispersión XY con ajuste lineal forzado a los puntos correspondientes a esta fase. La pendiente de la recta obtenida corresponde a μ_{max} según la ecuación:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde N_1 y N_2 representan las concentraciones de UFC / mL en los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente. El tiempo de duplicación se calculó como $t_d = \ln(2)/\mu_{max}$. Las fases de crecimiento (lag, exponencial, estacionaria y declive) se identificaron visualmente en la gráfica semilogarítmica de UFC / mL vs tiempo, registrando los intervalos temporales donde cada fase mostró su comportamiento característico. Todos los cálculos y gráficas se realizaron utilizando las funciones de regresión lineal de Microsoft Excel® 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

7.2.2. Extracción de metabolitos

A los tiempos establecidos (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h), los cultivos (3 matraces por cada intervalo de tiempo) se inactivaron por calor (baño maría 96 °C durante 20 min). Posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad (15 - 18 min, temperatura ambiente) para separar las células. El sobrenadante se recolectó y almacenó a 4 °C. La ausencia de células viables se confirmó sembrando 5 μ L del sobrenadante en medios PCAT y NB sólidos, seguido de incubación a 30 °C durante 48 h.

7.3. Ensayos de antagonismo *in vitro*: Difusión en pozos

La actividad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos se evaluó contra *F. solani*. Se preparó medio LB semisólido sin sal (agar 7.5 g / L), el cual se inoculó con una suspensión de esporas de *F. solani* (10^6 esporas / mL). En cada placa una vez gelificada se realizaron pozos, sobre la superficie del agar de 6 mm de diámetro, donde se depositaron 100 μ L de cada sobrenadante. Como control negativo se utilizó agua estéril. Las placas se incubaron a una temperatura entre 25 a 26 °C y los halos de inhibición se midieron (diámetro en centímetros) a las 48 h y diariamente hasta durante 7 días (Pérez *et al.*, 2014; Jiménez-Gómez, 2019). Cada condición se evaluó por triplicado, empleando cuatro pozos por placa. Los halos de inhibición de los metabolitos de GB99 frente a *F. solani* se analizaron mediante ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn con corrección por comparaciones múltiples ($\alpha = 0.05$), utilizando el software GraphPad Prism v8.0.1. Este enfoque estadístico se seleccionó debido a que las mediciones de diámetros de halos no cumplieron con la prueba de normalidad (D'Agostino & Pearson), condición común en ensayos de antagonismo *in vitro* por la variabilidad biológica inherente a hongos filamentosos. Cada tiempo de incubación (48, 72, 96, 120, 144, 168 h) se evaluó por triplicado ($n = 3$ réplicas biológicas independientes), donde cada réplica consistió en una placa Petri con cuatro pozos de 100 μ L de sobrenadante. El diámetro de cada halo se midió en dos orientaciones (horizontal y vertical), promediándose para obtener un valor por pozo.

7.4. Determinación del consumo de sacarosa por espectroscopía FTIR

Para evaluar el consumo de sacarosa por la cepa GB99 durante la curva de crecimiento, se realizó análisis por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizando el equipo TENSOR 27 (Bruker Optics, Alemania). Inicialmente, se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de medio MM9 suplementado con sacarosa a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.1, 1.5, 1.8 y 2% (p/v), no inoculadas.

Se realizaron dos mediciones de calibración:

1. Primera calibración: Línea base = MM9 sin sacarosa (0%).
2. Segunda calibración: Línea base = MM9 + 2% sacarosa

Posteriormente, los sobrenadantes centrifugados de GB99 obtenidos en 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h (n=3) se analizaron utilizando la segunda calibración. Se monitorearon dos bandas espectrales referentes a los enlaces de sacarosa. Cada muestra se midió por triplicado, registrando la absorbancia promedio y desviación estándar en las tablas respectivas. Los espectros se procesaron con el software OPUS 7.8 (Bruker Optics), aplicando corrección de línea base automática y normalización por vector. Los resultados permitieron evaluar cualitativamente la disminución de señal de sacarosa y la posible acumulación de metabolitos secundarios durante el cultivo bacteriano.

7.5. Evaluación de toxicidad

7.5.1. Fitotoxicidad de *Arabidopsis thaliana*

Para este ensayo se seleccionó como modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) para evaluar la fitotoxicidad de los metabolitos secundarios de GB99 debido a su amplio uso estandarizado en ecotoxicología vegetal y siguiendo los criterios para la selección de la especie de acuerdo con la OCDE Test Guideline 208: "Terrestrial Plant Test", 2006.

Se siguió una adaptación de la Guía OCDE 208 (2006) y el protocolo de Liu *et al.* (2023). En primer lugar, se determinó la viabilidad de las semillas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0) las cuales recibieron un preenfriamiento durante 2 días a 4 °C para sincronizar la germinación. Una vez transcurrido el tiempo se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, 15 min; donde cada 5 minutos se agitaban con ayuda de un agitador vortex y los otros 5 min manualmente, seguido de 5 lavados con agua destilada estéril de 3 min y un lavado con etanol al 70% durante 15 s, y finalmente, se enjuagaron con agua destilada (6 veces x 3 min). Las semillas se sembraron en

placas Petri cuadradas de 10 × 10 cm con medio agar - agua (10 g / L agar, 35 semillas / placa, n=2 placas) para confirmar viabilidad > 90 %.

Una vez realizado este paso, se montó el experimento de fitotoxicidad iniciando por la desinfección (método mencionado anteriormente) y las semillas fueron colocadas en medio Murashige Skoog (MS) (agar al 0.8%, sacarosa al 0.5%, pH 5.8) en placas Petri cuadradas de 10 x 10 mm, de manera horizontal en la parte superior se realizaron cuatro pocitos donde se colocaron tres semillas por cada pozo y cada cuarto día se aplicaban 20 µL de los metabolitos secundarios sin concentrar (es decir extracto crudo, **Ms**) y los metabolitos concentrados por rotavapor (**Mc**), los cuales fueron diluidos en agua tanto los Ms y Mc para obtener soluciones de 10, 30 y 50%, como control agua y metanol. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 23 °C, ciclo de luz de 16/8 h y se mantuvieron en un ángulo de aproximadamente 65° para permitir la elongación radicular y brotes a lo largo de la superficie del agar. El número de semillas germinadas se observó día a día hasta que la mayoría de las semillas (> 90 %) en las placas de Petri de control germinaran.

La tasa de germinación se registró diariamente hasta alcanzar > 90 % en controles (radícula visible > 1 mm), calculándose como: $(N^{\circ} \text{ semillas germinadas} / N^{\circ} \text{ total}) \times 100$ (media $\pm$ error estándar, SE).

Para el análisis sobre el crecimiento de las raíces, se midió el alargamiento de las raíces usando el programa ImageJ versión 1.54k después de 21 días. La tasa de inhibición del crecimiento de la longitud de la raíz se calculó de acuerdo con la fórmula: $I\% = (1 - T/C) \times 100$, donde T = longitud tratamiento, C = longitud control.

7.5.2. Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Para determinar la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios se trabajaron dos metodologías. La primera consistió en preparar Sangre Agar Base suplementado el cual se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 min. Una vez a temperatura entre 45 a 50 °C, se

añadió sangre humana fresca (preferentemente sangre total anticoagulada con EDTA o citrato) en un 5 – 10 % v/v bajo condiciones estériles. Se mezcló cuidadosamente para evitar burbujas y se vertió en placas Petri estériles, dejando solidificar.

Posteriormente se colocaron cuatro gotas de 30 μ L de los siguientes tratamientos por triplicado:

MgSO₄ (10 mM)

Medio MM9 (Anexo 1)

E.coli - 10⁸ ufc / mL (control negativo)

S. aureus - 10⁸ ufc / mL (β -hemólisis, control +),

Metabolitos sin diluir (tomados directamente del extracto crudo)

GB99 - 10⁸ ufc / mL

y se incubaron a 30 °C durante 24 a 72 horas, en el caso de *S. aureus* se incubó a 37 °C. Para la evaluación de hemólisis como indicador de citotoxicidad se observó la formación de halos de hemólisis alrededor de la colonia o la gota. Tipo de hemólisis:

Alfa (hemólisis parcial, verdosa)

Beta (hemólisis completa, zona clara) - indica mayor citotoxicidad por lisis de eritrocitos.

Gamma (sin hemólisis)

Por otra parte, las muestras para el ensayo de citotoxicidad con PBMC's (células mononucleares de sangre periférica) fueron recolectadas por venopunción, previo consentimiento a través de una carta de consentimiento informado. Las PBMC's se separaron empleando un gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque) y centrifugando a 2000 rpm por 25 min. El suero se descartó y la fase con PBMC's se recuperó y se realizaron 2 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) mediante centrifugaciones sucesivas a menor velocidad (1700 rpm durante 10 minutos). Posteriormente, las células se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1 % de antibiótico -

antimicótico. Las PBMC's se contaron mediante un hemocitómetro con la tinción de azul de tripano (1:1) para ajustar a una densidad de 1×10^6 células / ml.

Las células se sembraron en placas de 96 pozos, colocando 200 μ l por pozo (2×10^5 células / pozo). La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 % para permitir que alcanzará la fase logarítmica de crecimiento. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo con mucho cuidado de los pozos evitando romper o levantar la monocapa formada en la superficie de la placa y se pasó a colocar 200 μ L de cada tratamiento. Por lo cual, se realizaron las diluciones correspondientes de los tratamientos en microtubos de 1.5 mL con el medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1 % de antibiótico antimicótico.

Los cuatro tratamientos fueron: Control negativo (sin tratamiento), Control positivo (dosis letal 0.5 mg/mL de Alto® 100SL), dosis aplicada en campo de Alto® 100SL (0.1 mg/mL) y Metabolitos sin concentrar (Ms) al 30 %, cada uno por triplicado. La placa con 200 μ L de cada tratamiento se llevó a incubar durante un período de 24 h a 37 °C con CO₂ al 5 % que es el período más comúnmente utilizado para pruebas de toxicidad en PBMC's, y se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo por azul tripano y por el metabolismo de sales de tetrazolio (MTT). Para el ensayo de MTT (metabolismo de sales de tetrazolio) se preparó una solución de MTT (5 mg / mL en PBS) justo antes de su uso, y se añadió 20 μ L de solución de esta preparación a cada pocillo y se incubaron 3 h a 37 °C evitando la exposición a la luz, la absorbancia se tenía que leer a 570 nm sin embargo no se contaba en el momento con un espectrofotómetro de microplacas y se dejó como una prueba cualitativa.

7.5.3. Toxicidad aguda en *Eisenia andrei*

Se siguió el principio de la Guía OCDE 207 (1984). En recipientes de plástico estériles (500 mL) se colocaron 30 g de materia orgánica homogenizada y estéril. Se aplicaron los siguientes tratamientos: T1: agua (control negativo); T2: Furadan (dosis del proveedor); T3:

Furadan (dosis letal); T4: medio MM9; T5: suspensión de GB99 (10^8 UFC / g de suelo); T6 - T9: metabolitos sin concentrar al 10, 30, 50 y 100%. Se emplearon lombrices *Eisenia andrei* adultas (0.3 - 0.6 g), previamente aclimatadas sin alimento durante 48 h. Se colocaron 10 lombrices por recipiente (triplicado) y se mantuvieron entre 20 a 22 °C, humedad 60-80% y en oscuridad. La mortalidad y signos de toxicidad se registraron cada 24 h durante 48 h. Los datos se expresaron como porcentaje de mortalidad.

7.6. Ensayos ex vivo en hojas de café

Se recolectaron hojas sanas de *Coffea arabica* (5 - 6.5 cm) de plantas de 4 meses las cuales venían de invernadero. Una vez realizado la recolecta con ayuda de un pincel se limpió la tierra o polvo que tuviera y se hizo un primer lavado con agua destilada estéril. Los siguientes pasos se realizaron ya en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar, se partió con el proceso de desinfección de las hojas donde se realizó un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 15 min., y después, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril durante 2 min para eliminar residuos de desinfectante. Se continuó con un lavado con etanol al 70 % durante 20 seg., y una vez más, tres enjuagues con agua destilada estéril durante 2 min.

Seguidamente las hojas se colocaron en placas Petri de 150 x 20 mm con papel filtro humedecido para mantener humedad alta (80 %), y con ayuda de un bisturí se realizó una herida de 4 mm sobre el peciolo de todas las hojas. Se continuo con la inoculación de 40 μ L de *Fusarium solani* (hongo fitopatógeno), la cual, fue a partir de una suspensión de 1×10^8 esporas / mL previamente cultivado en medio SNA. Una vez inoculadas las hojas con el hongo, se aplicó simultáneamente los metabolitos al 30% en gotas separadas y se esparcieron con ayuda de un asa digralsky y cotonette, y en otro grupo se aplicó el ALTO 100® con la dosis recomendada. Los otros tratamientos consistieron en aplicar los metabolitos al 30% y en otro grupo el químico para

evaluar efecto independiente, y, por otro lado, se contó con el control negativo (agua) y el control positivo (suspensión de espores de *Fusarium solani*).

El experimento se mantuvo con una humedad relativa cercana al 80 % y temperatura entre 25 a 26°C en condiciones de oscuridad. Para la evaluación se observaron diariamente la aparición de lesiones, crecimiento de micelio o esporulación, también se registró el porcentaje de superficie afectada o número de manchas con el programa ImageJ, y se compararon los tratamientos para evaluar la inhibición del hongo por los metabolitos. Los datos se analizaron estadísticamente para determinar diferencias significativas entre tratamientos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Reactivación de cepas

8.1.1. Hongo fitopatógeno *Fusarium solani*

Para garantizar la pureza, viabilidad y reproducibilidad de los ensayos posteriores fue fundamental la reactivación y caracterización morfológica de *Fusarium solani*, la cual se hizo en medio PDA a 26 °C durante 7 días. Se observaron colonias algodonosas de color blanco - amarillo pálido con márgenes irregulares (Figura 3A). La observación microscópica reveló la presencia de microconidios ovalados y macroconidios falciformes con 3 - 5 septos bajo microscopio óptico (Figura 3B), características morfológicas que concuerdan con las descripciones estándar para el complejo *F. solani* (Leslie & Summerell, 2008) y con aislados mexicanos provenientes de café con pudrición radicular (Gamboa-Becerra *et al.*, 2021). Esta confirmación permitió estandarizar la preparación de inóculos con una concentración de 10^6 esporas/mL para todos los ensayos de antagonismo.

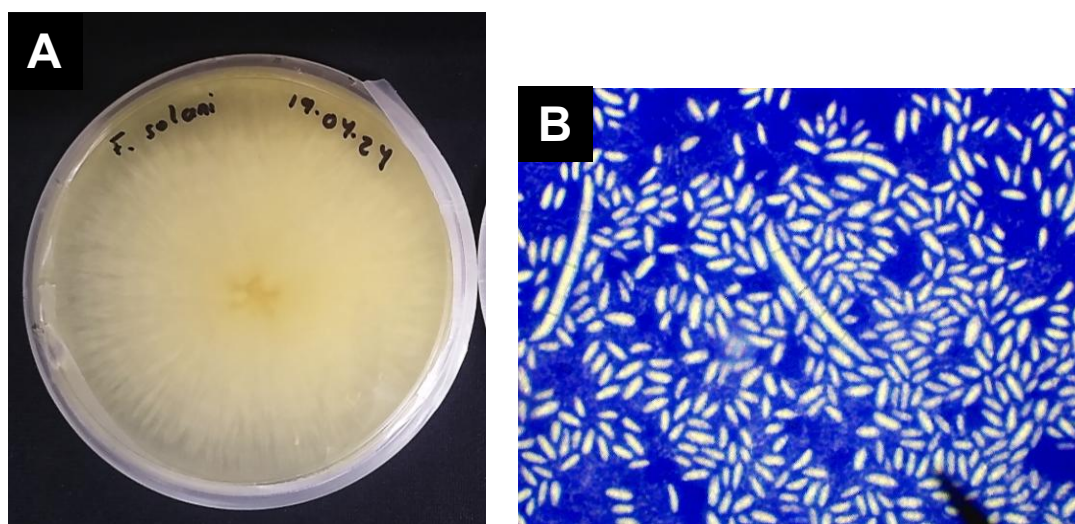


Figura 3. (A) Colonias de *F. solani* en PDA después de 7 días; (B) Microconidios y macroconidios observados al microscopio.

8.1.2. Ceba bacteriana *Paraburkholderia* sp. GB99

La cepa GB99 se reactivó exitosamente a partir de criopreservación. En medios NB y PCAT a 30 °C, se observaron colonias puntiformes de color beige, con superficie lisa y borde enteros (Figura 4). La observación microscópica confirmó la presencia de bacilos Gram negativos pequeños móviles y sin contaminantes. La selección de esta cepa se basó en su actividad antagonista previamente documentada frente a *F. solani* y otros fitopatógenos del café (Jiménez-Gómez, 2019), constituyendo el punto de partida para la evaluación de sus metabolitos secundarios.



Figura 4. Colonias de GB99 en PCAT

8.2. Curva de crecimiento y producción de metabolitos antifúngicos de GB99

Se estableció la curva de crecimiento de la cepa GB99 en medio mínimo MM9 suplementado con sacarosa al 2 %, con el objetivo de identificar la fase fisiológica asociada a la máxima producción de metabolitos antifúngicos contra *F. solani*. El crecimiento mostró una fase lag inicial corta (0 – 3 h), seguida de una fase exponencial bien definida entre aproximadamente

3 y 24 h, en la que la población aumentó desde el orden de 10^5 hasta 10^{10} UFC / mL (Figura 5A). En esta región se estimó una tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) de 0.59 h^{-1} y un tiempo de duplicación de $\sim 1.1 \text{ h}$. A partir de las 24 h, el cultivo entró en una fase estacionaria prolongada (24 – 120 h), con recuentos máximos entre $10^{12} - 10^{14}$ UFC / mL, seguida de fase de declive después de las 144 y 168 h (Figura 5B).

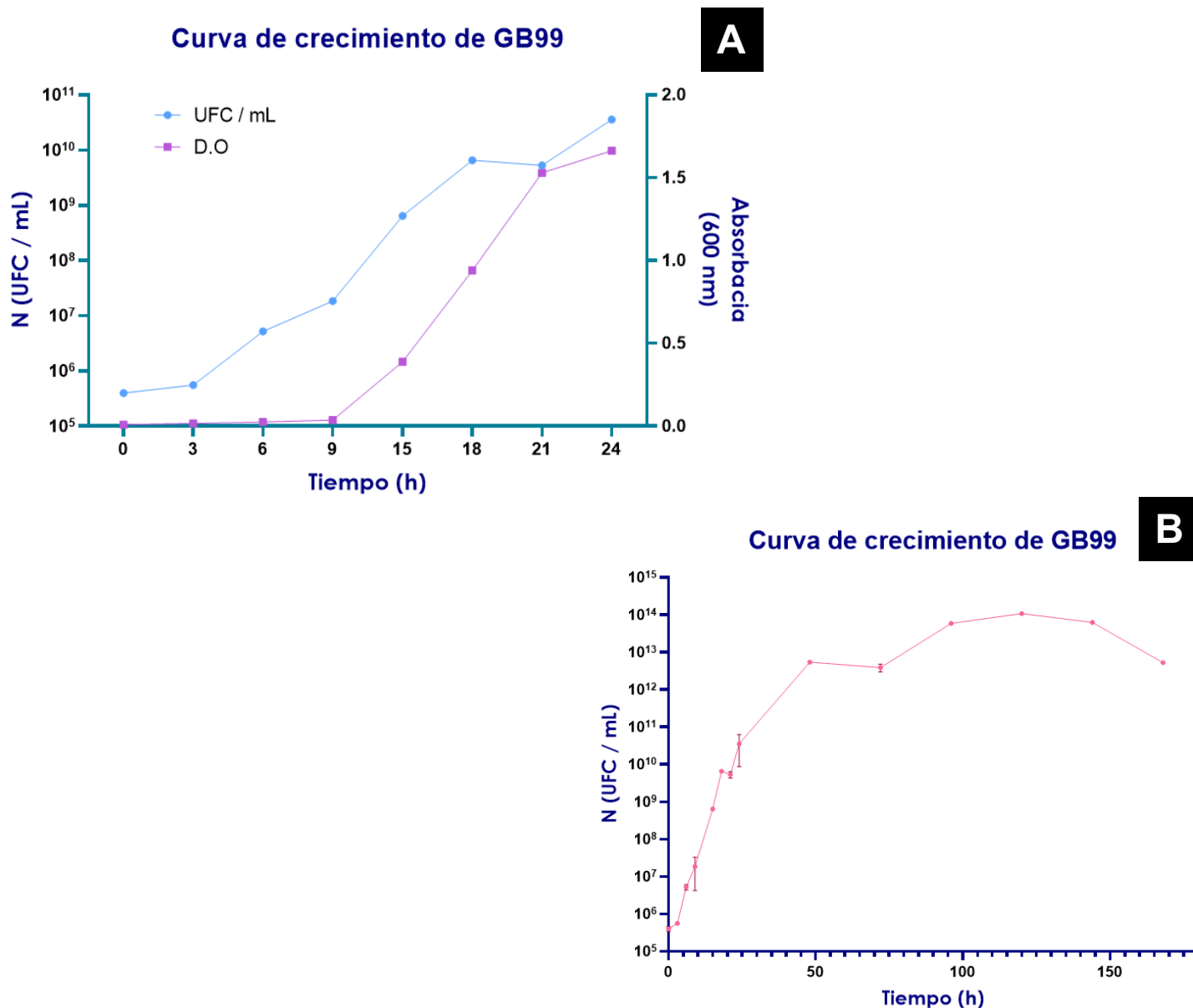


Figura 5. A) Medición de la densidad óptica a 600 nm y cuantificación de las UFC/ mL a las 24 horas de la cepa GB99. B) Curva de crecimiento de la cepa GB99 en medio MM9 + sacarosa 2 % a 30 °C

Al correlacionar estas fases crecimiento con los ensayos de difusión en pozos para determinar el mayor efecto antagónico de los metabolitos secundarios producidos en medios de cultivo líquido (libres de células bacterianas) obtenidos de las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h, se reveló que la máxima inhibición del crecimiento radial de *F. solani*, se obtuvo con los metabolitos producidos a las 96 h de cultivo con halos de inhibición de 24.5 cm (Figura 6). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los halos de inhibición a las 96 h y los obtenidos a tiempos anteriores (48 y 72 h), indicando que la producción óptima de los compuestos activos ocurre durante la fase estacionaria (Figura 7).

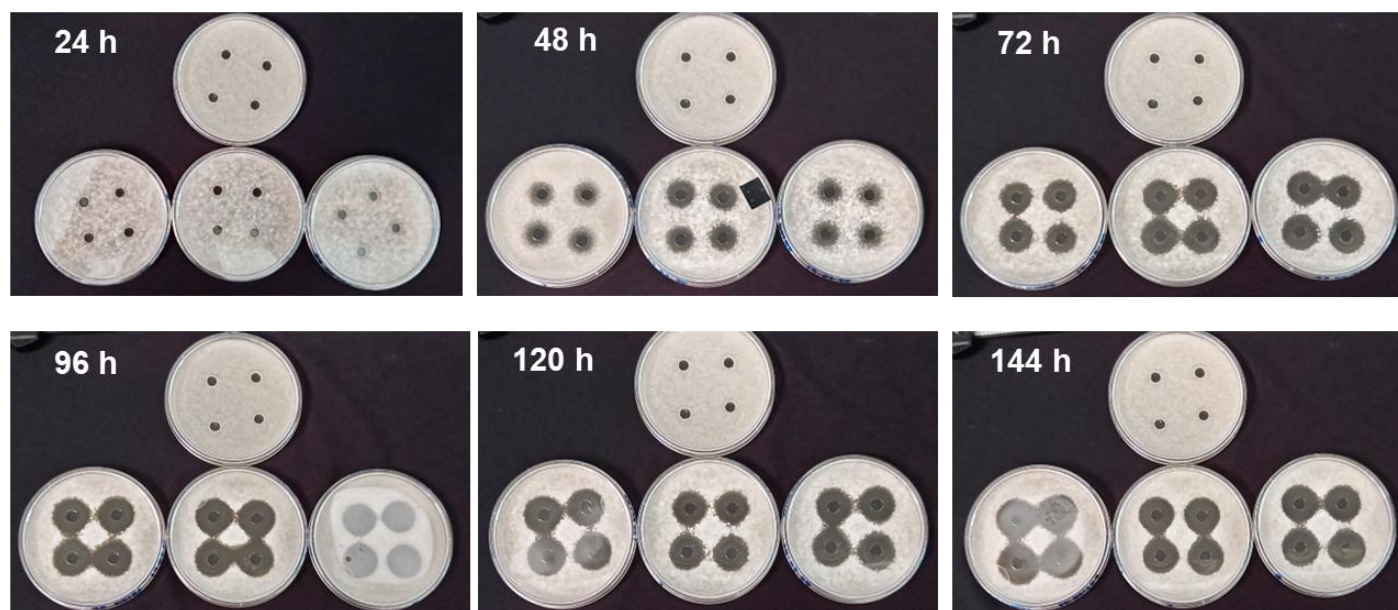


Figura 6. Actividad antifúngica de los metabolitos secundarios de la cepa GB99 vs *F. solani* en diferentes horas después de 12 días.

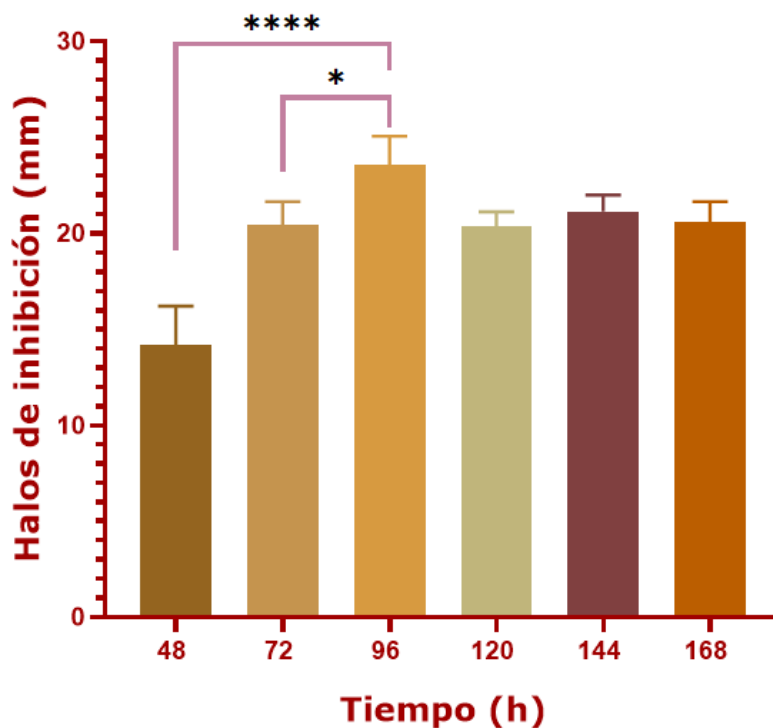


Figura 7. Medición del diámetro de los halos de inhibición de los inactivados de la cepa GB99 a diferentes tiempos contra *F. solani*. Las diferencias significativas (****) y (*) correspondientes a $p < 0,05$ se determinó mediante una prueba de DUNN en GraphPad Prism 8.0.1. Las barras de error indican la desviación estándar.

De acuerdo con ciertos reportes, la síntesis de metabolitos secundarios frecuentemente se induce o incrementa bajo condiciones de limitación nutricional y reducción de la tasa de crecimiento primario (Demain, 2000; Mao *et al.*, 2017; Chodkowski & Shade, 2020). Por ejemplo, la producción de pirrolnitrina por *Burkholderia cepacia* se maximiza en fase estacionaria y está influenciada por el pH y la fuente de carbono (Hwang *et al.*, 2002). Por otra parte, se tiene que el perfil regulatorio de algunos clústeres biosintéticos podría diferir del descrito para otros compuestos, como ciertos polienos cuya síntesis está más asociada al crecimiento activo (Petrova *et al.*, 2022). Estos resultados subrayan la importancia crítica de optimizar el tiempo de cosecha para maximizar el rendimiento de los metabolitos bioactivos.

8.3. Determinación del consumo de sacarosa por espectroscopía FTIR

Se identificó la región espectral donde aparecen las bandas relacionadas con la sacarosa en el medio de cultivo, encontrando las bandas de 1055 cm^{-1} y 997 cm^{-1} que corresponden a vibraciones características de la sacarosa, principalmente modos de estiramiento C-O y C-O-C en los anillos glucosídico y de fructosa (Figura 8A) (Max y Chapados, 2001; Brizuela *et al.*, 2012). Estas regiones espectrales (alrededor de 1000 a 1100 cm^{-1}) son típicas para carbohidratos como la sacarosa en análisis FTIR, confirmando su selección para monitorear concentraciones. Por lo cual, la curva de calibración ascendente (0 a 2%) con línea base al 0% muestra un aumento lineal de absorbancia, validando el método cuantitativo en esas bandas (Figura 8B). Una vez identificado esta parte, se pasó a realizar la curva descendente con línea base al 2% , si las muestras tienen menor absorbancia que el fondo, el cálculo $A = -\log(I/I_0)$ genera valores negativos, interpretándose erróneamente como "aumento" en lugar de disminución real de sacarosa (Figura 9).

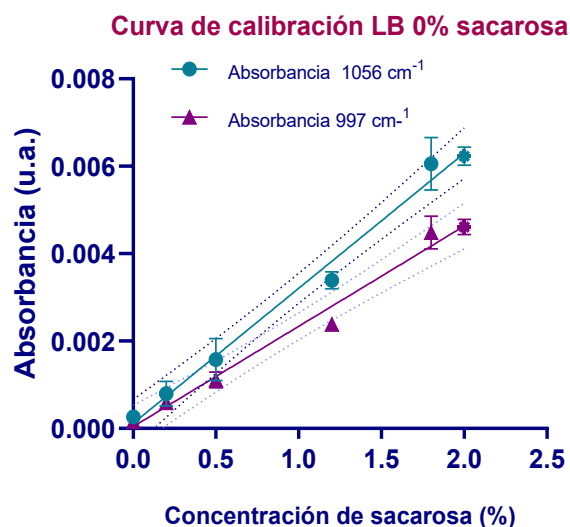
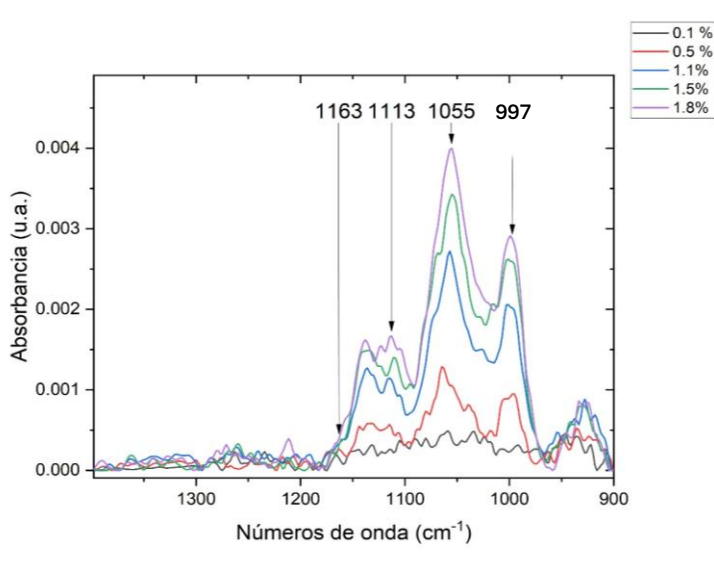


Figura 8. A) Identificación de la región espectral de las bandas relacionadas con la sacarosa en el medio de cultivo a diferentes concentraciones. B) Curva de calibración de la sacarosa como línea base 0% de sacarosa mediante la detección de dos de sus bandas infrarrojas: 1056 cm^{-1} (verde) y 997 cm^{-1} (morada). La absorbancia aumenta con el incremento de la concentración de sacarosa.

El objetivo de realizar una curva de calibración descendente (desde 2% con línea base al 2%) es simular y validar la depleción esperada de sacarosa en el medio de cultivo por consumo bacteriano, complementando la curva ascendente (0 - 2%) que establece la relación lineal base-absorbancia. Esto permite cuantificar directamente la disminución de concentraciones en muestras reales de metabolitos (24 - 96 h), interpolando valores en el rango bajo donde ocurre el consumo microbiano.

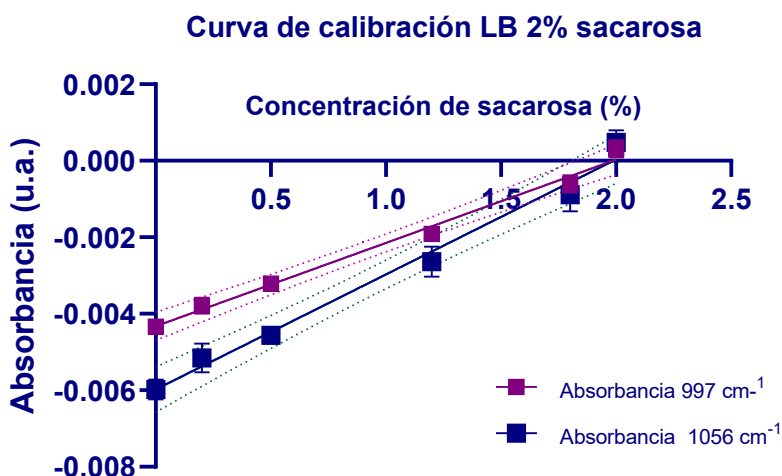


Figura 9. Curva de calibración descendente a partir de un medio con concentración de 2% como línea base.

Finalmente, para las muestras de metabolitos de las 24 a las 168 horas, los negativos podrían estar indicando la interferencia de nuevos metabolitos bacterianos (por ejemplo, ácidos orgánicos, lípidos) que alteran las bandas de sacarosa, o fallos repetidos en background; no necesariamente error de detección, sino superposición espectral (Figura 10). La primera calibración ascendente valida el método, pero la descendente y tiempo-dependiente requiere sustracción diferencial (espectro inicial menos tiempo t) para mostrar disminución real por consumo bacteriano (Semeraro *et al.*, 2023)

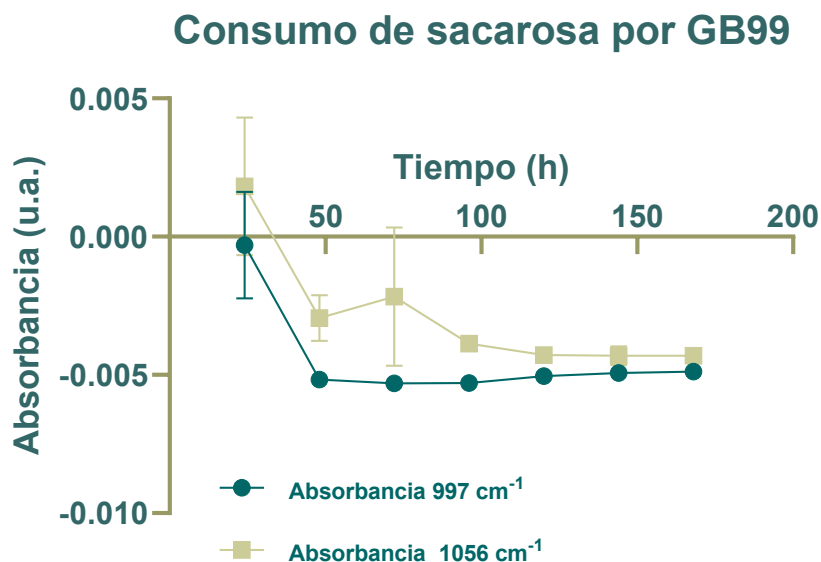


Figura 10. Absorbancia en función del tiempo del consumo de sacarosa por la cepa GB99 en medio MM9 a diferentes tiempos, con dos bandas de absorción representadas.

8.4. Ensayos de toxicidad

8.4.1. Fitotoxicidad en *Arabidopsis thaliana*

El ensayo de fitotoxicidad en *Arabidopsis thaliana* se realizó para evaluar la seguridad agronómica de los metabolitos de GB99 (concentrados Mc vs sin concentrar Ms) y determinar su rango óptimo de concentración (dosis tóxica vs promotora) sobre el crecimiento radicular y desarrollo foliar, identificando concentraciones seguras para la aplicación agrícola en café sin comprometer su fisiología vegetal. Por lo cual, se germinaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* en placas de agar con medio Murashige Skoog (MS) y se aplicaban los metabolitos de GB99: metabolitos concentrados (Mc) y metabolitos sin concentrar (Ms) a concentraciones del 10, 30 y 50%. Las variables evaluadas incluyeron germinación, elongación radicular, área foliar y presencia de clorosis durante 21 días de incubación a 23 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz.

Para la primera parte, en cuanto viabilidad de las semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) se obtuvo un porcentaje del 93% de viabilidad, lo que confirmó que el lote de semillas utilizado era adecuado para los ensayos de fitotoxicidad y que las respuestas observadas podían atribuirse principalmente al efecto de los metabolitos de la cepa GB99 y no a problemas intrínsecos de germinación, es decir, de semillas no viables. Por otro lado, el uso de medio MS, incubación controlada (23 °C, fotoperiodo 16/8 h) y la evaluación de germinación y longitud de raíz, sigue el enfoque descrito por Liu *et al.* (2023) para estudiar fitotoxicidad en *Arabidopsis*, donde la tasa de germinación y el crecimiento radicular se utilizan como indicadores tempranos de estrés químico.

Bajo estas condiciones controladas (preenfriamiento, desinfección superficial y siembra en agar-agua), se estableció un punto de partida confiable para evaluar la influencia de los tratamientos sobre la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas.

La germinación de *Arabidopsis thaliana* se vio ligeramente afectada por los metabolitos sin concentrar (Ms) a las 72 h, con porcentajes del 77.7%, 83.3% y 88.8% para las concentraciones al 10%, 30% y 50%, respectivamente, comparado con el 100% del control con agua. Estos resultados indican que los Ms ejercen un efecto moderado sobre la germinación, más compatible con un retraso o inhibición parcial que con una toxicidad aguda, y sugieren que, en el rango de concentraciones evaluado, las semillas conservan en su mayoría la capacidad de germinar. En contraste, cuando los metabolitos fueron concentrados mediante rotavapor utilizando metanol (Mc), la germinación se redujo notablemente en presencia del metanol (como control) y del tratamiento Mc 10% a un 66.6 %, mientras que Mc 30 y 50% alcanzaron porcentajes de 100 y 94.4%, respectivamente, lo que evidencia una interacción compleja entre la concentración de metabolitos y los residuos de solvente (Figura 11).

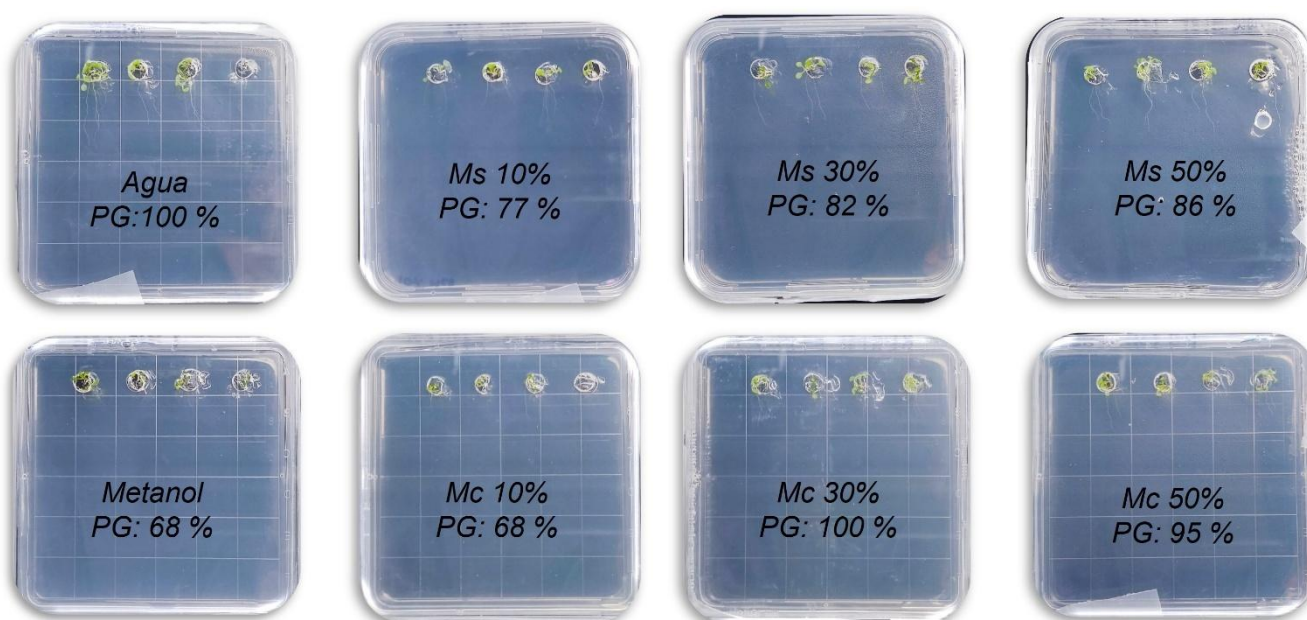


Figura 11. Germinación de *A. thaliana* en medio MS. Metabolitos secundarios (Ms, parte superior), Metabolitos secundarios concentrados (Mc, parte inferior). 3 dpg (después de la germinación)

Evaluación de crecimiento y desarrollo (21 días después)

Tras 21 días de incubación, las diferencias entre tratamientos se hicieron más evidentes en el crecimiento radicular y el desarrollo de la parte aérea. En las placas tratadas con los metabolitos concentrados por rotavapor (Mc) se observó una marcada inhibición del crecimiento de la raíz, ausencia de elongación radicular y presencia de clorosis en tejidos foliares, así como plántulas con desarrollo foliar deficiente, lo que es indicativo de un efecto fitotóxico severo asociado a la alta concentración de compuestos y/o al posible daño causado por el metanol remanente (Downie et al., 2004; Ramírez et al., 2006). Por el contrario, en las placas tratadas con metabolitos sin concentrar (Ms) se obtuvo un comportamiento mucho más favorable: si bien las concentraciones más bajas mostraron ligeras variaciones respecto al control, el tratamiento Ms 30 % destacó por presentar un mayor crecimiento radicular y de área foliar a lo largo del periodo experimental, sin evidencias claras de clorosis ni malformaciones en la parte aérea (Figura 12)

(Tabla 1). Este patrón sugiere que, a concentraciones por debajo o igual al 30%, la mezcla de metabolitos de GB99 puede ejercer un efecto estimulante sobre el crecimiento de raíces, compatible con respuestas tipo hormesis descritas para compuestos microbianos que, en dosis bajas se da el efecto positivo, pero en dosis altas hay un efecto negativo (Małkowski *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos coinciden con reportes que señalan la doble naturaleza del género *Burkholderia*, en el que coexisten cepas con potencial fitotóxico y cepas con capacidad de promover el crecimiento vegetal. Diversos estudios han mostrado que ciertas especies de *Burkholderia* pueden mejorar el crecimiento de *Arabidopsis* mediante la producción de compuestos volátiles, polisacáridos o metabolitos secundarios que modulan rutas hormonales y de defensa, favoreciendo la elongación radicular y la tolerancia a estrés abiótico (Ledger *et al.*, 2016). También se ha documentado que metabolitos antimicrobianos como la pirrolnitrina y otros compuestos halogenados pueden resultar fitotóxicos a concentraciones elevadas, generando daño oxidativo, alteraciones en membranas y afectaciones en la fotosíntesis, efectos similares a los observados en este trabajo para los tratamientos con Mc, donde se registró inhibición casi total del crecimiento radicular y síntomas de clorosis.

La comparación entre Ms y Mc resalta la importancia de considerar tanto la concentración como el método de obtención de los metabolitos en la evaluación de agentes de biocontrol. En condiciones cercanas a las del cultivo original, representadas por los Ms aplicados sin concentración adicional, los metabolitos de GB99 no solo no comprometen la viabilidad de *A. thaliana*, sino que, a una concentración de 30%, pueden asociarse a un incremento en la longitud de la raíz respecto al control, lo que los perfila como candidatos compatibles con el crecimiento de plantas no objetivo. En cambio, las formulaciones concentradas mediante solventes orgánicos muestran un claro potencial fitotóxico, lo que sugiere que, para un uso seguro en agricultura, deben evitarse concentraciones excesivas o procesos de formulación que incrementen la proporción de compuestos activos y residuos de solvente por encima de la tolerancia de las plantas.

En conjunto, estos resultados destacan la relevancia de los ensayos de fitotoxicidad como etapa esencial en la caracterización de cepas con potencial biopesticida. La integración de datos de germinación, crecimiento radicular y estado visual de las plántulas permitió identificar que el tratamiento más adecuado es el uso de metabolitos sin concentrar, particularmente a 30%, donde se obtiene un equilibrio favorable entre actividad antifúngica (demostrada frente a *Fusarium solani*) y ausencia de efectos adversos significativos sobre *A. thaliana*. De esta manera, la información generada orienta el diseño futuro de formulaciones basadas en GB99, enfatizando la necesidad de optimizar la dosis y el proceso de preparación de los metabolitos para maximizar su eficacia como agentes de biocontrol y minimizar su impacto fitotóxico en cultivos de interés agrícola. Asimismo, se decidió continuar trabajando solo con los metabolitos sin concentrar de acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla 1. Área total de la planta (roseta y primera flor) después de la aplicación de los metabolitos secundarios en *A. thaliana*. 21 dpi (después de la inoculación).

Tratamientos	Área total (cm ²)
Agua	7.711
10 %	8.0665
30 %	12.768
50 %	8.6605

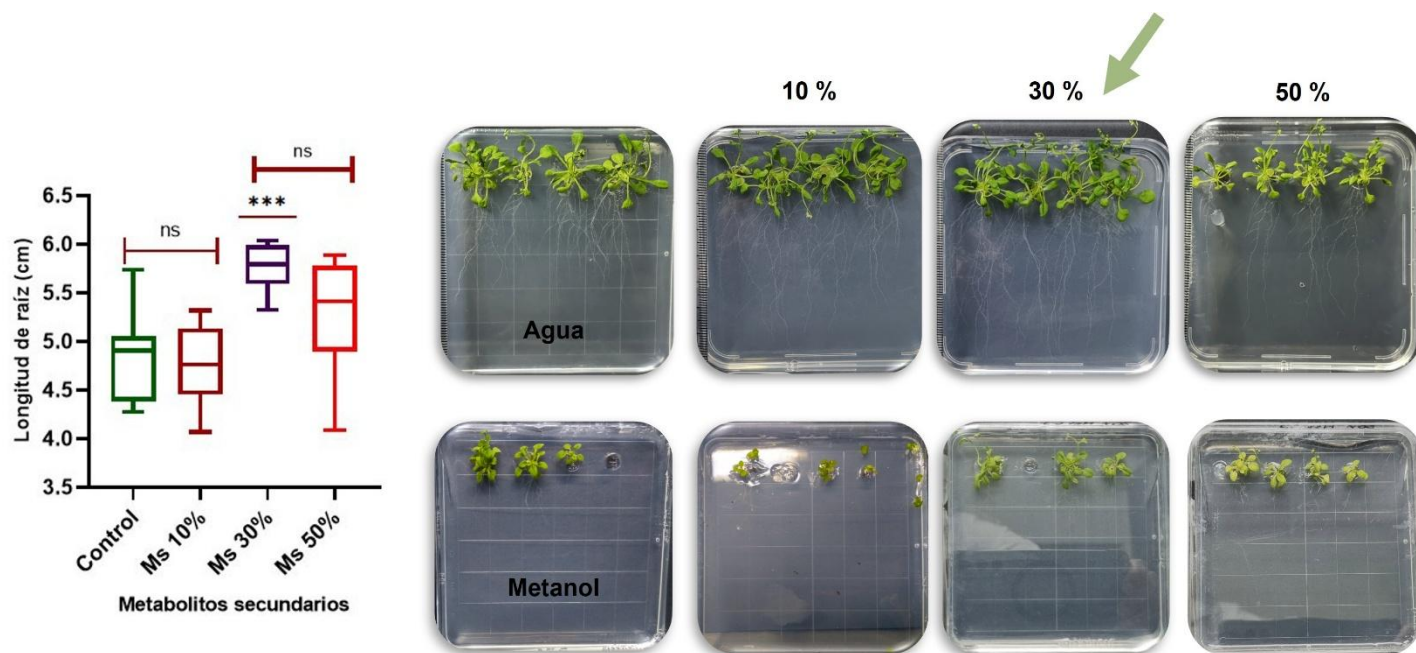


Figura 12. Medición de la longitud de raíces de *A. thaliana* tratadas al 10, 30 y 50 % de los metabolitos secundarios sin concentrar. Representación gráfica del test de Kruskal-Wallis con sus respectivas significancias. La línea horizontal dentro de la caja representa la media, el cuadrado de color la media $\pm$ el desvío estándar.

8.4.2. Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad en eritrocitos (hemólisis en agar sangre) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la viabilidad por Azul de Tripano y Metabolismo de Sales de Tetrazolio (MTT) son fundamentales en la investigación de metabolitos microbianos (especialmente para uso en el campo, como probióticos, biocontroladores o diagnóstico) porque permiten determinar la seguridad, patogenicidad y el impacto inmunológico de dichos metabolitos sobre el huésped.

Ensayo de hemólisis

Para el ensayo de hemólisis se trabajó con agar - sangre suplementado con sangre humana en donde se colocaron 30 μ L de cada tratamiento sobre el agar y se determinaron los

halos de hemólisis. El uso de medio agar sangre para ensayos de citotoxicidad radica en conocer la capacidad de ciertos agentes, en este caso, de los metabolitos para lisar (destruir) los eritrocitos (glóbulos rojos) presentes en el medio, liberando hemoglobina. Este fenómeno, conocido como hemólisis, es una medida directa de la citotoxicidad sobre la membrana celular, permitiendo evaluar el daño *in vitro* de forma visual (Sæbø *et al.*, 2023). Mediante este ensayo se pudo observar que los metabolitos de GB99 no produjeron halos de hemólisis (γ -hemólisis) en agar sangre, indicando la ausencia de actividad lítica sobre eritrocitos humanos. Los controles se comportaron como se esperaba: *Staphylococcus aureus* mostró β -hemólisis (completa) y *Escherichia coli* mostró γ -hemólisis (ausente), sin embargo, la cepa GB99 productora de estos metabolitos confirma la producción natural de hemolisinas (saponinas, lipasas) dando como resultado positivo (β -hemólisis) como mecanismo de virulencia. Demostrando que el proceso de obtención de los metabolitos podría eliminar estos compuestos generando una fracción segura para aplicación agrícola directa (Figura 13).

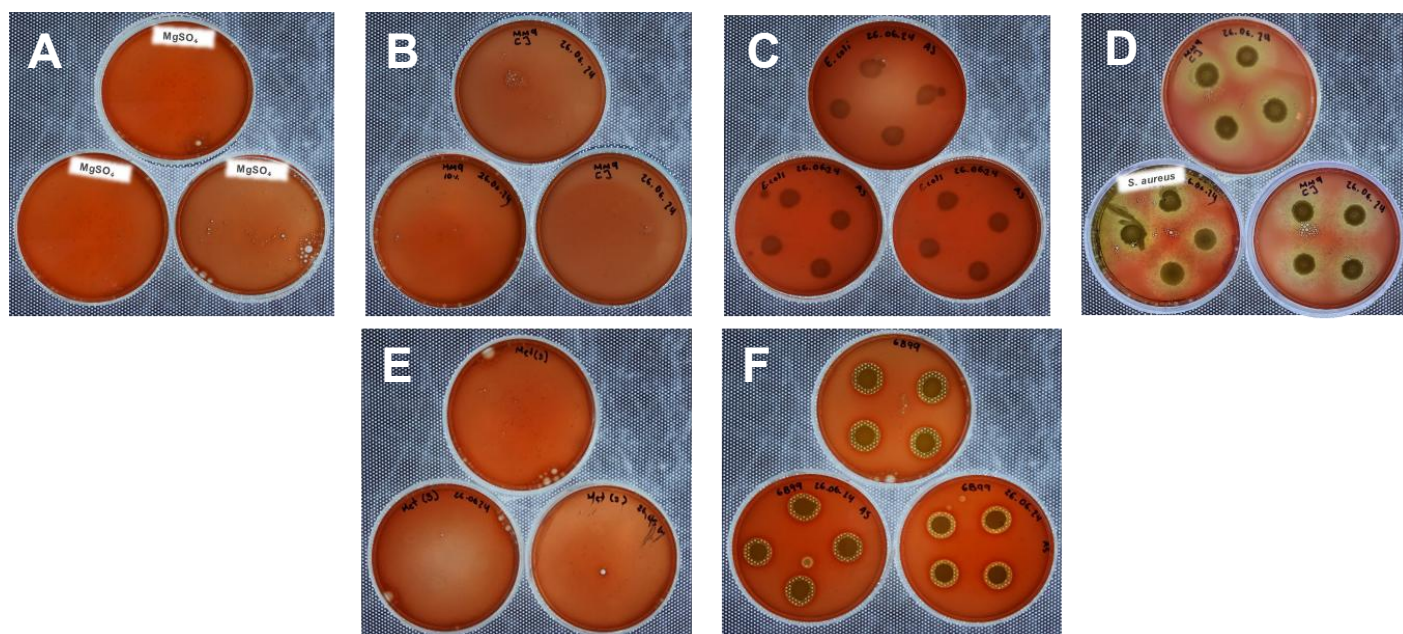


Figura 13. Ensayo en agar sangre. A) $MgSO_4$ (-), B) MM9 (-), C) *E. coli* (-), D) *S. aureus* (β -hemólisis, control +), E) Metabolitos (-) y F) GB99 (β -hemólisis). Fotografía del tercer día.

Viabilidad en célula mononucleares de sangre periférica (PBMC)

El ensayo de viabilidad metabólica por MTT (metabolismo de sales de tetrazolio) reveló diferencias cualitativas claras entre tratamientos. El control negativo (RPMI) mostró coloración púrpura intensa (formazan), indicando alta actividad de deshidrogenasas mitocondriales. Tanto la dosis comercial (0.1 mg/mL) como la dosis letal (0.5 mg/mL) de Alto® 100SL produjeron coloración amarilla pálida, evidenciando inhibición completa del metabolismo celular. Los metabolitos al 30% mostraron color púrpura atenuado (menor intensidad vs. control), sugiriendo viabilidad celular reducida pero no abolida (~70 - 80% estimado visualmente) (Figura 14).

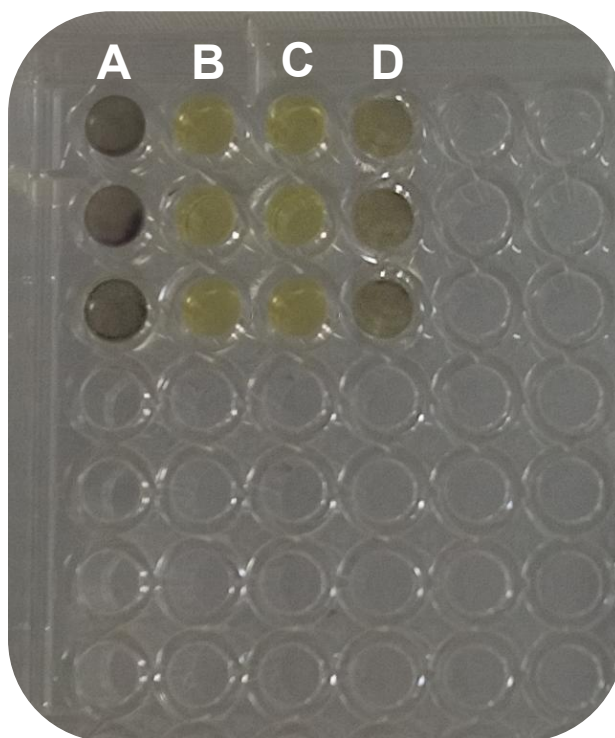


Figura 14. Ensayo MTT cualitativo de viabilidad celular en PBMC's expuestas 24 h a diferentes tratamientos. (a) Control negativo (RPMI), (b) Alto® 100SL 0.1 mg/mL (dosis comercial), (c) Alto® 100SL 0.5 mg/mL (dosis letal), (d) Metabolitos GB99 30 %. Cada tratamiento por triplicado. Escala de color MTT: púrpura = viable, amarillo = no viable.

La evaluación de viabilidad por exclusión de Azul de Tripano en PBMCs sugiere la selectividad de los metabolitos GB99. El análisis ANOVA de 1 vía ($F = 1234.5$, $p < 0.0001$) seguido de Tukey reveló diferencias altamente significativas entre tratamientos. Mientras Alto® 100SL (0.1

- 0.5 mg / mL) indujo necrosis completa (0% viabilidad, $p < 0.0001$ vs control), los metabolitos al 30% preservaron $78.3 \pm 0.4\%$ viabilidad celular ($p < 0.0001$ vs Alto®, $p < 0.0001$ vs control), representando 13 veces mayor viabilidad que el fungicida comercial (Figura 15). Esta selectividad sugiere mecanismos de acción específicos contra hongos (*F. solani*) sin afectar eucariotas superiores, contrastando con inhibidores de ergosterol como el ciclobutrifol que comprometen membranas celulares (Tapia, 2005; DI, 2016).

Los ensayos de citotoxicidad realizados validan hasta ahora el perfil de seguridad de los metabolitos de GB99 para desarrollo como biopesticida. La ausencia de hemólisis (γ -hemólisis) contrasta con metabolitos antifúngicos citotóxicos como pirrolnitrina de *Burkholderia cepacia* (β -hemólisis, Horn *et al.*, 1996), indicando que GB99 produce compuestos con actividad antifúngica sin dañar eritrocitos humanos.

El ensayo MTT cualitativo demostró que los metabolitos al 30% preservan actividad metabólica mitocondrial en PBMC's (~70 - 80% vs. control), mientras que Alto® 100SL inhibe completamente la respiración celular a concentraciones de campo (0.1 mg / mL) y letal (0.5 mg / mL). Esta diferencia refleja el mecanismo de acción: inhibidores de ergosterol (fungicidas azoles) vs. metabolitos secundarios de origen bacteriano. La viabilidad por Azul de Tripano ($78.3 \pm 0.4\%$) confirma baja citotoxicidad de metabolitos vs. fungicida (0%), comparable a estudios donde extractos de *Burkholderia* spp. mantienen $> 75\%$ viabilidad en linfocitos humanos (Compant *et al.*, 2008). La baja citotoxicidad observada para los metabolitos de GB99 contrasta con la alta toxicidad del fungicida químico de referencia y se alinea con lo reportado para otros biocontroladores exitosos. La selectividad (actividad antifúngica con baja toxicidad en células de mamífero) es un indicador positivo para el desarrollo de biopesticidas más seguros.

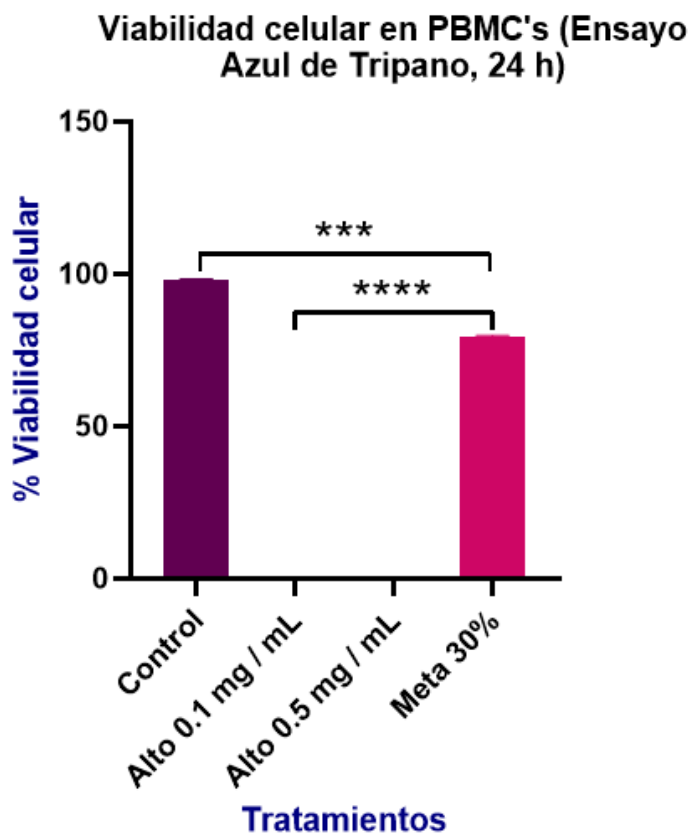


Figura 15. Viabilidad PBMC's (24h, n=3). ANOVA 1 vía ($p < 0.0001$) + Tukey. Control: $98.9 \pm 0.3\%$ vs metabolitos 30%: $78.3 \pm 0.4 \%$ ($p < 0.0001$). Metabolitos 30%: $78.3 \pm 0.4 \%$ ($p < 0.0001$ ambos).

8.4.3. Toxicidad aguda en *Eisenia andrei*

Realizar ensayos de toxicidad aguda en *Eisenia andrei* es fundamental porque permite evaluar el impacto ecológico de estas sustancias en organismos no blancos, garantizando la seguridad ambiental antes de su aplicación en campo. Aunque los metabolitos sean de origen natural, no garantiza su inocuidad sobre la fauna edáfica esencial, como las lombrices de tierra, las cuales son bioindicadores clave de la salud del suelo y los ciclos de nutrientes. El ensayo de toxicidad aguda realizado con lombrices adultas *Eisenia andrei* (0.3 - 0.6 g, n=10 por replicado × 3) validó adecuadamente el sistema experimental, evidenciando 0% mortalidad en el control

negativo (agua destilada) y cumpliendo todos los parámetros fisicoquímicos requeridos por la guía OCDE 207 (1984) (20 – 22 °C, 60 - 80% humedad relativa, oscuridad).

En la tabla 2 se muestra el número de lombrices tanto vivas como muertas al comienzo y al final del ensayo, así como el porcentaje de mortalidad que se atribuye a cada concentración. Como se observa, el Furadan® a dosis aplicada por el proveedor indujo 26.67 % mortalidad con signos característicos del carbofurano: lentitud locomotora, edema clitelares y comportamiento evasivo (agrupación en un rincón del recipiente, rechazo de la materia orgánica). Estos hallazgos coinciden con la LC_{50} de 2025 ppm reportada por Moreno-Jurado (2017) donde se evidenció un cambio alto en cuanto a falta de movimiento, pigmentación en el cuerpo y quemaduras de un 60% y un 20% para cambio moderado, mientras que la dosis letal de Furadan® incrementó dramáticamente la mortalidad al 73.33 %, acompañada de hemorragias externas, adelgazamiento corporal y necrosis sistémica (Figura 16).

La cepa GB99 viva mostró 50 % mortalidad con enrojecimiento corporal y adelgazamiento severo, similar al 45 y 60% de mortalidad por contacto directo reportado para *Burkholderia ceparum* BC1 (Sánchez-Contreras, 2019). Estos efectos reflejan mecanismos de virulencia bacteriana directa característicos de *Burkholderia* spp. (Devine *et al.*, 2025). confirmando que la toxicidad radica en estructuras celulares viables, no en metabolitos. Por otro lado, el tratamiento de medio MM9, el cual es el medio donde crece la cepa de estudio, se observó una mortalidad de 23.33% el cual puede ser atribuible principalmente al estrés osmótico inducido por sus sales inorgánicas del medio.

Finalmente, los metabolitos de GB99 a concentraciones del 10, 30, 50 y 100% exhibieron mortalidad prácticamente nula (3.33%), donde la única lombriz fallecida en el tratamiento al 10% podría atribuirse a variabilidad biológica individual o la manipulación durante el experimento. Fisiológicamente, las lombrices tratadas con los metabolitos mostraron movilidad conservada, apariencia normal y ligera ganancia de biomasa ("gorditas"), evidencia clara de ausencia de estrés fisiológico (Figura 16). Comparativamente, las lombrices tratadas con los metabolitos

preservaron > 95 % de supervivencia en *Eisenia andrei* frente al 26.67 % de mortalidad inducida por Furadan® a dosis de campo, destacando su perfil ecoseguro superior.

Como lombriz modelo clave en lombricultura y bioindicador de suelos sanos (ISO 11268-2), esta selectividad posiciona a los metabolitos de GB99 como alternativa sostenible que protege fauna edáfica benéfica mientras mantiene eficacia antifúngica demostrada contra *Fusarium solani*.



Figura 16. Aspecto morfológico de *Eisenia andrei* (48 h exposición, OCDE 207). (A) Control agua. (B) Furadan® dosis recomendada. (C) Furadan® dosis letal. (D) GB99. (E) MM9. (F - I) Metabolitos de GB99 10, 30, 50 y 100%. n=30 lombrices / tratamiento.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de *Eisenia andrei*

Tratamiento	t = 0 h		t = 48 h	
	Vivas	Vivas	Muertas	% mortalidad
Agua	30	30	0	0
Furadan (dosis aplicada)	30	22	8	26.67
Furadan (dosis letal)	30	8	22	73.33
GB99	30	15	15	50.00
Medio MM9	30	23	7	23.33
Met 10%	30	29	1	3.33
Met 30%	30	30	0	0.00
Met 50%	30	30	0	0.00
Met 100%	30	30	0	0.00

8.5. Ensayos *ex vivo* en hojas de café

Los metabolitos de GB99 demostraron eficacia antifúngica comparable al fungicida comercial ALTO 100® en ensayo *ex vivo* con hojas de *Coffea arabica*, preservando la funcionalidad vascular foliar.

La metodología estandarizada de desinfección secuencial (hipoclorito de sodio 5% por 15 min, etanol 70% 20 seg, tres enjuagues estériles) eliminó eficientemente contaminantes epifíticos sin inducir hipersensibilidad, manteniendo la integridad tisular de hojas sanas de *Coffea arabica*. La herida estandarizada de 4 mm en el peciolo y el inóculo cuantificado de *F. solani* (1×10^8 esporas / mL, 40 μ L) aseguraron reproducibilidad del proceso patogénico, replicando condiciones agroclimáticas óptimas para la colonización fúngica.

El control negativo (agua destilada) confirmó ausencia de necrosis progresiva, validando la viabilidad foliar post desinfección. Manchas necróticas preexistentes (senescencia natural) no evolucionaron durante 31 días, descartando artefactos experimentales. El control positivo (*Fusarium solani*) indujo 28 % de superficie afectada (necrosis) y se observaba más el inicio de colonización sin necrosis extensiva. ALTO 100® aplicado con *Fusarium* incrementó la afectación al 35%, evidenciando necrosis extendida peciolo - ápice y amarillamiento de la nervadura central, indicando fallo protector del fungicida comercial y posible sinergia patógeno - químico que compromete el sistema vascular foliar. Crucialmente, los metabolitos al 30% se observó una afectación del 32%, sin embargo, preservó la coloración normal de la nervadura y no presentó lesiones en las hojas. La eficacia comparable a ALTO 100® (un 3% a favor de metabolitos) sin fitotoxicidad vascular confirma el perfil biofungicida: control patógeno efectivo + preservación fisiológica foliar. Es decir, la ausencia de hipersensibilidad por parte de los metabolitos (0% necrosis en hojas no inoculadas) valida su seguridad fitotóxica (Figura 17 - 18) (Ali *et al.*, 2026).

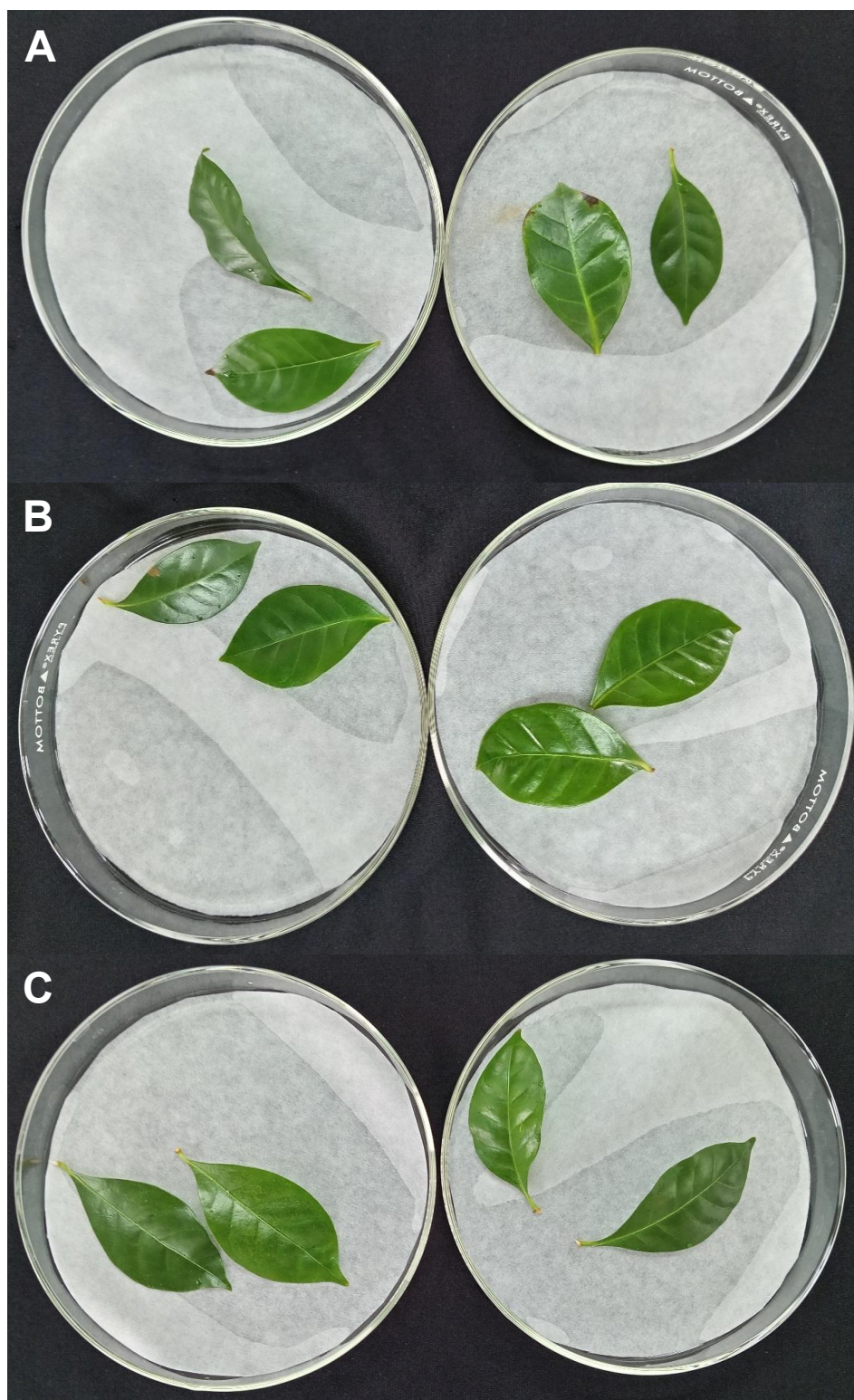


Figura 17. Ensayo ex vivo con hojas de café después de 21 días. A) Control negativo (agua). B) ALTO 100®. C) Metabolitos 30 %.

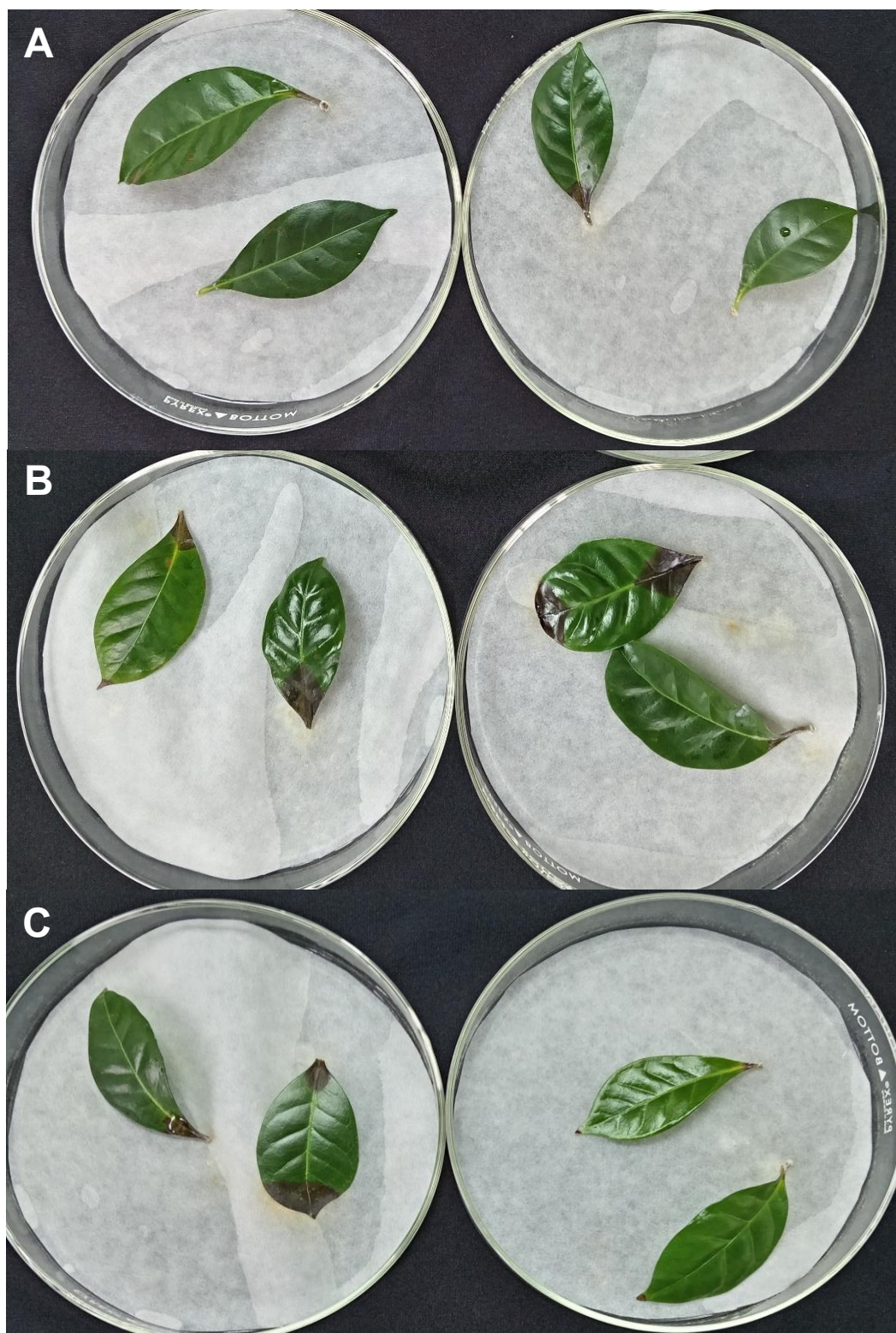


Figura 18. Ensayo ex vivo con hojas de café después de 21 días. A) Control positivo (*F. solani*). B) ALTO 100® + *F. solani*. C) Metabolitos 30 % + *F. solani*.

9. CONCLUSIONES

- ❖ La cepa *Paraburkholderia* sp. GB99 produce metabolitos secundarios con actividad antifúngica contra *Fusarium solani* siendo su producción óptima a las 96 horas de cultivo en medio MM9 suplementado con sacarosa al 2%, correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento bacteriano.
- ❖ Los metabolitos secundarios de GB99 inhiben eficazmente el crecimiento de *F. solani* *in vitro*.
- ❖ La evaluación de fitotoxicidad en *Arabidopsis thaliana* indica que los metabolitos sin concentrar, especialmente a una concentración del 30%, son seguros para el modelo vegetal.
- ❖ Los ensayos de citotoxicidad de hemólisis y en PBMCs junto con el ensayo de toxicidad aguda en *Eisenia andrei* evidenciaron un perfil de seguridad alto y selectivo.
- ❖ En el modelo *ex vivo* con hojas de café, los metabolitos de GB99 al 30% reducen la severidad de la infección por *F. solani* de manera comparable a un fungicida químico comercial, pero con la ventaja crucial de no inducir daños fitotóxicos.
- ❖ En su conjunto, esta investigación proporciona evidencia científica sólida que sustenta el potencial de los metabolitos de *Paraburkholderia* sp. GB99 como base para el desarrollo de un biofungicida específico, eficaz y ambientalmente seguro para el manejo integrado de *Fusarium solani* en cafetales.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar la identificación y caracterización química de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica por HPLC-MS.
- ❖ Desarrollar una metodología que permita optimizar la producción de los metabolitos en biorreactor piloto
- ❖ Realizar ensayos in planta a nivel invernadero y campo (parcelas demostrativas en cafeto), midiendo rendimiento y calidad.
- ❖ Combinar los metabolitos de GB99 con otros controles biológicos y establecer monitoreo para optimizar frecuencias de aplicación.
- ❖ Desarrollar y evaluar formulaciones que permitan conservar y mantener los metabolitos un determinando tiempo de vida.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Areqi, A. H., Chliyah, M., Touati, J., Ali, O., Sghir, F., Touhami, A. O., ... & Douira, A. (2015). Effect of endomycorrhizae on decline of the coffee plants (*Coffea arabica*) caused by *Fusarium solani*. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology, and Chemistry*, 4(2), 397-404.
- Ali, G. S., El-Sayed, A. S., Patel, J. S., Green, K. B., Ali, M., Brennan, M., & Norman, D. (2016). *Ex vivo* application of secreted metabolites produced by soil-inhabiting *Bacillus* spp. efficiently controls foliar diseases caused by *Alternaria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 478-490.
- Bach, E., Passaglia, L. M. P., Jiao, J., & Gross, H. (2022). Burkholderia in the genomic era: from taxonomy to the discovery of new antimicrobial secondary metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(2), 121-160.
- Blanco, Erika Lorena, & Castro, Yulimar. (2021). Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 6-16. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>
- Bolívar-Anillo, Hernando José, Contreras-Zentella, Martha Lucinda, & Teherán-Sierra, Luis Guillermo. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 19(2), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Cadena, F. A., Quelali, L., & Mamani, A. M. (2021). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo del café (*Coffea arabica*) en la Estación Experimental de Sapecho. *Apthapi*, 7, 2145.
- Canet Brenes, G., Soto Viquez, C., Ocampo Thomason, P., Rivera Ramírez, J., Navarro Hurtado, A., Guatemala Morales, G. & Villanueva Rodríguez, S. (2015). La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y el Caribe. Obtenido de: <https://hdl.handle.net/11324/2792>.
- Carreras-Villaseñor, N., Rodríguez-Haas, J. B., Martínez-Rodríguez, L. A., Pérez-Lira, A. J., Ibarra-Laclette, E., Villafán, E., ... & Sánchez-Rangel, D. (2022). Characterization of two *Fusarium solani* species complex isolates from the ambrosia beetle *Xylosandrus morigerus*. *Journal of Fungi*, 8(3), 231.
- Cervantes Álvarez, I. (2016). Diversidad y filogenia de *Burkholderia* sp. aisladas en diferentes regiones del estado de Puebla. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla <https://hdl.handle.net/20.500.12371/2511>
- Chodkowski, J. L., & Shade, A. (2020). Exometabolite dynamics over stationary phase reveal strain-specific responses. *MSystems*, 5(6), 10-1128.
- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clement, C., & Ait Barka, E. (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS microbiology reviews*, 32(4), 607-626.
- Cortez-Lázaro, A. A., Vázquez-Medina, P. J., Caro-Degollar, E. M., García Evangelista, J. V., Cortez-Lázaro, R. A., Rojas-Paz, J. L., Legua-Cardenas, J. A., Fernandez-Herrera, F., Pesantes-Rojas, C. R., Ocrospoma-Dueñas, R. W., Oliva-Cruz, S. M., Manes-Cangana, G. A., Romero Bozzetta, J. L., & Leiva Espinoza, S. T. (2025). Global trends in *Trichoderma* secondary

metabolites in sustainable agricultural bioprotection. *Frontiers in microbiology*, 16, 1595946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1595946>

Coz Torres, G. H. (2019). Influencia del pH y calcio, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp., aislados en cultivos agrícolas de importancia en la región San Martín.

Cruz Sarmiento, O. (2025). *Susceptibilidad y control del Damping-off en plantulas de café* (Master's thesis, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas).

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., & Stoffelen, P. I. E. T. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), 465-512.

Davis, A. P., Tosh, J., Ruch, N., & Fay, M. F. (2011). Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical journal of the Linnean Society*, 167(4), 357-377.

Demain, A. L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology advances*, 18(6), 499-514.

DI, C. G., Bb, M. S., & Ea, Á. J. (2016). Ecotoxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa* L. de antibacterianos con riesgo ambiental. *Rev. toxicol*, 33, 59-66.

Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M., & Haslam, R. (2004). Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Phytochemistry*, 65(16), 2305-2316.

Escamilla-Prado, E., Escamilla-Femat, S., Gómez-Utrilla, J. M., Andrade, M. T., Ramos-Elorduy, J., & Pino-Moreno, J. M. (2012). Uso tradicional de tres especies de insectos comestibles en agroecosistemas cafetaleros del estado de Veracruz. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 15(2), S101-S109.

Estrada-de los Santos, P., Rojas-Rojas, F. U., Tapia-García, E. Y., Vásquez-Murrieta, M. S., & Hirsch, A. M. (2016). To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1303-1314.

Fang, A., Pierson, D. L., Mishra, S. K., & Demain, A. L. (2000). Growth of *Streptomyces hygroscopicus* in rotating-wall bioreactor under simulated microgravity inhibits rapamycin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(1), 33-36.

Fang, A., Wong, G. K., & Demain, A. L. (2000). Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophyllin and nigericin. *The Journal of Antibiotics*, 53(2), 158-162.

Flores Colorado, Oscar Eder, Cervantes Canales, Jair, García-Lamont, Farid, & Ruiz Castilla, José Sergio. (2023). Identificación de las principales enfermedades de la planta del café (*Coffea arabica*) a través de visión artificial. *Ciencia ergo sum*, 30(3), e212. <https://doi.org/10.30878/ces.v30n3a8>

Gamboa-Becerra, R., Lopez-Lima, D., Villain, L., Breitler, J. C., Carrion, G., & Desgarennnes, D. (2021). Molecular and environmental triggering factors of pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* isolates involved in the coffee corky-root disease. *Journal of Fungi*, 7(4), 253.

García Nieto, D. (2020). Estudio del efecto antagónico de idiolitos bacterianos contra *rhizopus stolonifer* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11247>

Guevara-González IC, Carreño-López R, Caso-Vargas LR, Marín-Cevada V. Caracterización de cepas rizosféricas pertenecientes al género *Paraburkholderia* sp. aisladas de la sierra norte del Estado de Puebla. Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]. 2021;6(22):54–75. Available from: <https://drive.google.com/file/d/1Az52KkAPGR5iWM9g5IJw075RtQj33rlk/view>

Hernández-Lauzardo, Ana Niurka, Bautista-Baños, Silvia, Velázquez-del Valle, Miguel Gerardo, & Hernández-Rodríguez, Annia. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009&lng=es&tlng=es.

Hwang, J., Chilton, W. S., & Benson, D. M. (2002). Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia. *Biological control*, 25(1), 56-63.

International Coffee Organization. (2024). *Informe anual de familias productoras de café*. ICO. <https://www.ico.org>

Islas Jiménez, C. (2021). Estudio de efecto antagónico de una cepa bacteriana contra *Fusarium oxysporum* en jitomate *Solanum lycopersicum* L. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11786>

Izzeddin, N., & Medina, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3), 8-12.

Jiménez, R., & Naty, M. (2009). Marchitez del chile poblano (*Capsicum annuum* L): identificación molecular del agente causal, detección en semillas, histopatología y alternativas de control.

Jiménez-Gómez, I. (2019). Búsqueda y evaluación de antifúngicos producidos por el género *Burkholderia* dirigidos contra hongos patógenos en cultivo de café [Maestría Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]

Ledger, T., Rojas, S., Timmermann, T., Pinedo, I., Poupin, M. J., Garrido, T., Richter, P., Tamayo, J., & Donoso, R. (2016). Volatile-Mediated Effects Predominate in *Paraburkholderia phytofirmans* Growth Promotion and Salt Stress Tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01838>

Leon-Ttacca, B., Arestegui-Cantoral, Y., Tarula-Gutierrez, B., Orellana-Cornejo, C., Luis-Vilcamiza, J., & Flores-Pelaez, P. (2024). Biocontrol de *Penicillium digitatum* con metabolitos secundarios de hongos endófitos en frutos de mandarina. *Agronomía Mesoamericana*, 55682-55682.

Leyva Mir, G. (2010). Principales enfermedades del café (*Coffea arabica*). *Agro Productividad*, 3(2), 12-23.

- Liu, Y., Zhou, Y. Y., Luo, S. H., Guo, K., Zhang, M. W., Jing, S. X., ... & Li, S. H. (2023). Labdane diterpenoids from the heartwood of *Leucoscepttrum canum* that impact on root growth and seed germination of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 206, 113531.
- López-Lima, D., Carrión, G., Sánchez-Nava, P., Desgarennes, D., & Villain, L. (2020). Fungal diversity and *Fusarium oxysporum* pathogenicity associated with coffee corky-root disease in Mexico. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 52(1), 276-292.
- Małkowski, E., Sitko, K., Szopiński, M., Gieroń, Ż., Pogrzeba, M., Kalaji, H. M., & Zieleźnik-Rusinowska, P. (2020). Hormesis in Plants: The Role of Oxidative Stress, Auxins and Photosynthesis in Corn Treated with Cd or Pb. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2099. <https://doi.org/10.3390/ijms21062099>
- Mamani-Huayhua, G., Leon-Ttacca, B., Palao-Iturregui, L. A., & Borja-Loza, Y. R. (2021). Biocontrol of coffee yellow rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) with *Trichoderma* sp. endophyte strains.
- Mao, D., Bushin, L. B., Moon, K., Wu, Y., & Seyedsayamdost, M. R. (2017). Discovery of scmR as a global regulator of secondary metabolism and virulence in *Burkholderia thailandensis* E264. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(14), E2920-E2928.
- Maxiselly, Y., Atiningsih, F. G., Rasiska, S., Hutapea, D., Bakti, C., Wahyudin, A. A., & Maharani, Y. (2025). Morphological diversity of arabica coffee (*Coffea arabica*) by in-situ exploration in three agroecosystems West Java, Indonesia. *Coffee Science-ISSN 1984-3909*, 20, e202345-e202345.
- Merino Espinoza, I. (2020). Evaluación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de un cepario obtenido de suelo rizosférico de diferentes regiones del estado de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/10381>
- Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., & Calle-Osorno, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41(111), 32-44.
- Mesa-Vanegas, Ana María, Marin, Alexander, & Calle-Osorno, Jaime. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 32-44. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Mora, J. R. (2001). *Control biológico de la pudrición radicular por Fusarium oxysporum en semilleros de café usando endomicorriza y Trichoderma harzianum* (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2013.).
- Moreno Jurado, M. L. (2017). *Evaluación de la toxicidad y mortalidad de carbofurán y carbendazim empleando como bioindicador Eisenia andrei* (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra).
- Mulatu, A., Megersa, N., Teferi, D., Alemu, T., & Vetukuri, R. R. (2023). Biological management of coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides*) using antagonistic *Trichoderma* isolates. *Frontiers in plant science*, 14, 1113949. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1113949>
- Mullins, A. J., & Mahenthiralingam, E. (2021). The hidden genomic diversity, specialized metabolite capacity, and revised taxonomy of *Burkholderia* sensu lato. *Frontiers in microbiology*, 12, 726847.

No, O. T. (2006). 208: Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section, 2*.

Olvera-Vargas, L. A., Contreras-Medina, D. I., & Aguilar-Rivera, N. (2020). Cálculo de grados días de *Hypothenemus hampei* a través de imágenes satelitales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 543-554.

Organización Internacional del Café. (2024). *Perspectivas del mercado del café 2023/24*. ICO. <https://www.ico.org/documents/cy2023-24/cmr-2324-e.pdf>

Parra González, Evis, Centeno Briceño, Sara, & Araque Calderón, Yasmina. (2009). Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 103-109. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200007&lng=es&tling=es.

Pérez, R., González, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60.

Petrova, Y. D., Zhao, J., Webster, G., Mullins, A. J., Williams, K., Alswat, A. S., ... & Mahenthiralingam, E. (2022). Cloning and expression of *Burkholderia polyynae* biosynthetic gene clusters in *Paraburkholderia* hosts provides a strategy for biopesticide development. *Microbial Biotechnology*, 15(10), 2547-2561.

Prabhu, S., Poorniammal, R., & Dufossé, L. (2025). Microbial Metabolites: A Sustainable Approach to Combat Plant Pests. *Metabolites*, 15(6), 418. <https://doi.org/10.3390/metabo15060418>

Ramírez, I., Dorta, F., Espinoza, V., Jiménez, E., Mercado, A., & Peña-Cortés, H. (2006). Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of Arabidopsis, tobacco, and tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(1).

Rosales-Hernández, D., Adriano-Anaya, L., Salvador-Figueroa, M., Velázquez-Ovalle, G., & Moreno-Castillo, B. (2024). Evaluación en campo de bioactivadores de resistencia vegetal para el control de la roya del café. *IBCIENCIAS*, 7(1), 18-24.

Ruíz Andrade, G. (2024). Estudio del efecto antagónico de *Paraburkholderia* sp. GB99 contra hongos patógenos en cultivo de café. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/26902>

Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. A. (2023). Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2914.

Sáez Gómez, K. (2015). Distribución del género *Fusarium* y *Aspergillus* en ambientes naturales de Puebla y Tlaxcala. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/12572>

Semeraro, P., Giotta, L., Talà, A., Tufariello, M., D'Elia, M., Milano, F., ... & Valli, L. (2023). A simple strategy based on ATR-FTIR difference spectroscopy to monitor substrate intake and metabolite release by growing bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 302, 123031.

Serrato-Díaz, L. M., Mariño, Y. A., Gonzalez, J. D. J., Goenaga, R., & Bayman, P. (2024). Coffee Fruit Rot: The previously unrecognized role of *Fusarium* and its interactions with the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Phytopathology*[®], 114(6), 1320-1332.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2024). *Panorama agroalimentario 2024: Café*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/siap/documentos/panorama-agroalimentario-2024>

Tan, H. (2020). *Smallholder coffee farming worldwide: Statistics and trends*. International Coffee Organization.

Tapia, C. (2005). Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Medwave*, 16(4), 5.

Unigarro, C. A., Cayón Salinas, D. G., León-Burgos, A. F., & Flórez-Ramos, C. P. (2025). Flowering and Fruiting of *Coffea arabica* L.: A Comprehensive Perspective from Phenology. *Plants*, 14(21), 3396. <https://doi.org/10.3390/plants14213396>

United States Department of Agriculture. (2024). *Coffee: World markets and trade 2023/24*. USDA Foreign Agricultural Service. <https://www.fas.usda.gov/data/coffee-world-markets-and-trade>

United States Department of Agriculture. (2024). *Global coffee export and import statistics 2023/24*. USDA. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>

Vega Aguilar, S. (2015). Aislamiento e Identificación de especies pertenecientes al género *Burkholderia*, en tres regiones del Estado de Puebla.

Vignola, R., Watler, W., Poveda Coto, K., Vargas Céspedes, A., Mora Aguilar, M., & Rivera Vargas, P. (2018). Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de café en Costa Rica. *Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica: San José, Costa Rica*.

12. ANEXOS

ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO

MM9 modificado Para 1 litro de medio	
Compuesto	Cantidad
Citrato férrico (6 g/l)	1 mL
Goodies	2.5 mL
Solución 10x M9	100 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O 1M	1.0 mL
*Sacarosa 2%	
Goodies	
ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	30 mg
BO ₃ H ₃	300 mg
CoCl ₂	200 mg
CuCl ₂ H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ 6 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ 2 H ₂ O	30 mg
Solución 10X MM9	
Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

*Fuente de carbono utilizada en los experimentos

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

*Siempre que se requiera en medio sólido

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

*Siempre que se requiera en medio sólido

ANEXO II. IMÁGENES DEL ENSAYO *EX VIVO* EN HOJAS DE CAFÉ

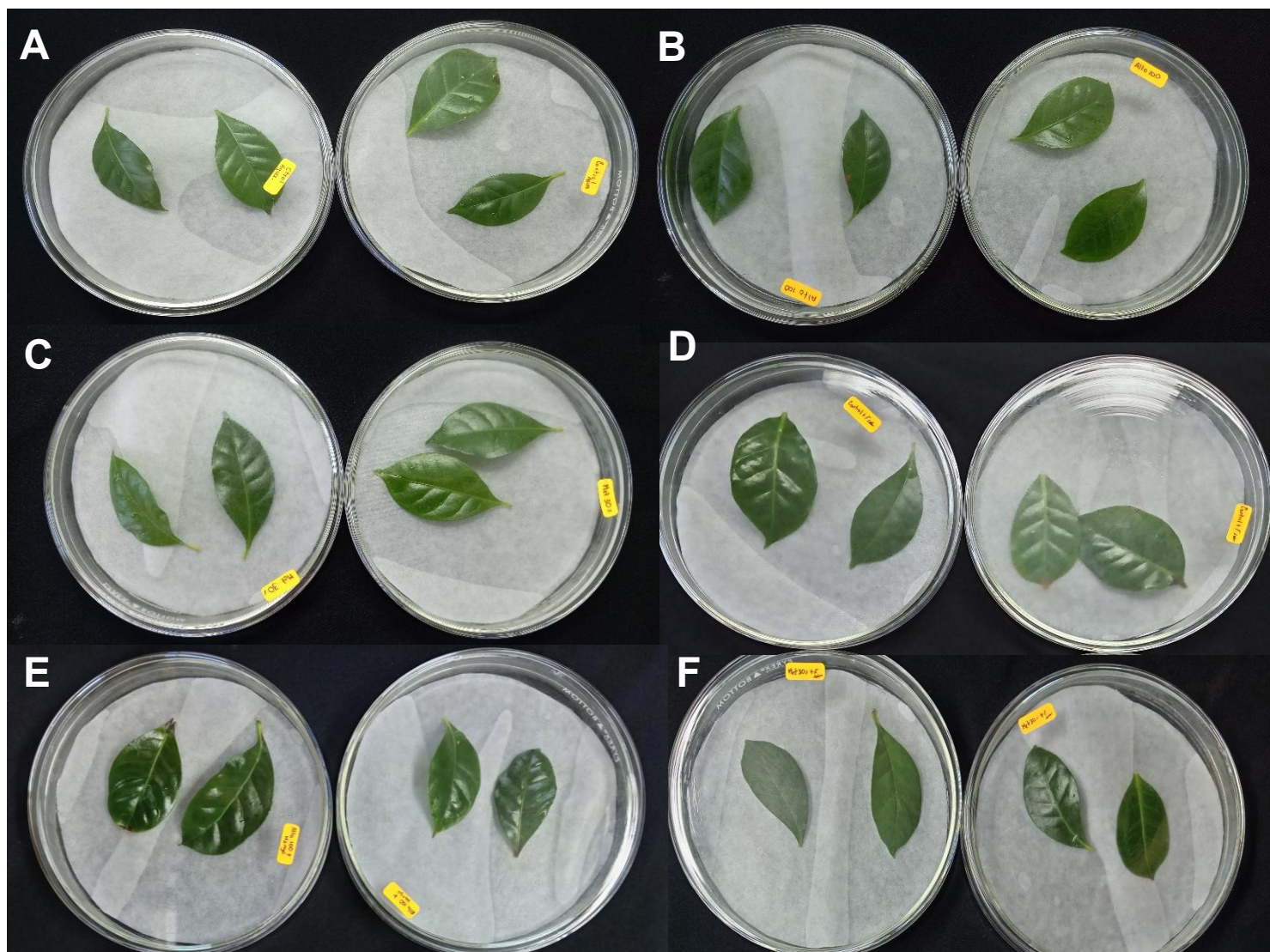


Figura 19. Ensayo *ex vivo* en hojas de café día cero. A) Control negativo (agua). B) ALTO 100®. C) Metabolitos 30 %. D) Control positivo (*F. solani*). E) ALTO 100® + *F. solani*. F) Metabolitos 30 % + *F. solani*.