



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE
HONGOS FITOPATÓGENOS**

Tesis para obtener el título de

LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
YESSICA OSORIO SÁNCHEZ

DIRECTOR: Dr. EDGARDO ALFREDO SEPÚLVEDA SÁNCHEZ
HIDALGO

CO-DIRECTOR: M. EN C. CARMEN SANJUANA DELGADO
RAMÍREZ



OCTUBRE 2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la universidad que me acogió todos estos años, principalmente a la Facultad de Ciencias Biológicas, a sus docentes que fueron parte de mi formación académica.

Al CICESE, institución que me recibió desde el año 2019. Gracias al Dr. Edgardo Sepúlveda y la M. en C. Carmen Delgado por enseñarme tanto, por la comprensión, el apoyo y el conocimiento que me brindaron en todo el camino. Ellos sin duda son una clave importante en el inicio y ahora el final de este trabajo.

A la Dra. Ana Laura Ramos, por explicarme con paciencia y asesorarme en parte del escrito de la presente tesis, gracias por su valiosa aportación.

DEDICATORIA

Este trabajo lo he logrado principalmente por el acompañamiento de mis padres Fabiola y Angel, quienes siempre me han mostrado su apoyo en cada aventura que decido emprender. Sin ellos en definitiva esta etapa hubiera sido aún más difícil, pero mis padres siempre me han llenado de amor, de comprensión, pero sobre todo la libertad responsable de dejarme construir mi propio camino es lo que hoy me trajo hasta aquí.

A mis hermanos Angel y Diego, quienes son mis compañeros de vida, quiero que sepan que también fueron y son un impulso para forjar mi futuro.

A Lupita, quien en toda la carrera me apoyo sin condiciones, me cuida y me escucha, pero sobre todo por su comprensión de cada día, lo hemos logrado juntas, este trayecto fue más bonito porque ella se convirtió en mi hermana.

A todos los demás compañeros y amigos que encontré en el camino, dentro y fuera de la facultad, perdonen que nos los mencioné a cada uno, pero si leen esto, saben que ocupan un lugar especial, los grupos de estudio, los desayunos, las clases y las salidas de campo, fueron especiales por ustedes.

Agradezco el apoyo de los docentes que siempre me apoyaron y me impulsaron a seguir en esta profesión, por todo el conocimiento que me brindaron y por las anécdotas de vida que me compartieron.

A las personas que encontré en el camino desde el año 2019 en la ciudad de Ensenada y las que se unieron en el 2021, en el laboratorio donde pase mi estancia de prácticas y tesis, pero también el lugar donde encontré personas valiosas y queridas.

A todos los que de cerca o de lejos se interesaron con amor y me brindaron apoyo.

Esto es dedicado a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 CARACTERÍSTICAS DE ACTINOBACTERIAS.....	10
1.2 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA ESPORULACIÓN	11
1.3 REGULACIÓN GENÉTICA DE PRODUCTOS SECUNDARIOS	13
1.4 LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	14
1.5 SÍNTESIS DE MATABOLITOS SECUNDARIOS	15
1.6 SÍNTESIS DE POLICÉTIDOS.....	17
1.7 IMPORTANCIA DE LAS ACTINOBACTERIAS COMO PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS.....	20
1.8 ACTINOBACTERIAS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES EN AGRÍCOLTURA.....	23
2. ANTECEDENTES	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. HIPÓTESIS	29
6. METODOLOGÍA.....	29
6.1 MANTENIMIENTO Y RESGUARDO DE AISLADOS.....	29
6.2 HONGOS FITOPATÓGENOS SELECCIONADOS PARA EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO: Particularidades de hongos fitopatógenos usados en ensayos de antagonismo bajo condiciones <i>in vitro</i>	30
6.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE DIVERSOS HONGOS FITOPATÓGENOS.....	33
6.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS SOBRE DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS MEDIANTE ENSAYOS DUALES	34
6.5 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ACTINOBACTERIAS SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS	34

6.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS	35
7. RESULTADOS	36
7.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	36
7.2 INHIBICIÓN ANTAGÓNICA EN LOS ENSAYOS DUALES	37
7.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS.....	50
7.4 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS	55
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES.....	65
10. BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1. Esquema del ciclo reproductivo de esporulación en actinobacterias	11
FIG.2. Modelo del control de la división celular en la esporulación	12
FIG.3. Esquema de la síntesis de ácidos grasos	17
FIG.4. Esquema de la síntesis de policétidos	19
FIG.6. Estructuras químicas de los cuatro antibióticos obtenidos por el género <i>Streptomyces</i>	22
FIG.7. Evaluación cualitativa de actividad antagónica de aislados de actinobacterias sobre diversos hongos fitopatógeno.....	36
FIG.8.Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>L. brasiliensis</i>	38
FIG.9.Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>L. gilanesis</i>	39
FIG.10. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>Diaporthe</i> sp.	40
FIG.11. Evaluación de actividad antagónica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>N. parvum</i>	41
FIG.12. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>N. australe</i>	42
FIG.14.Evaluación de actividad antagónica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>B. dothidea</i>	44
FIG.15. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>D. mutila</i>	45
FIG.16. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> raza 1	46
FIG.17. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> raza 2.	47
FIG.18. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobactaerías sobre <i>Fusarium solani</i>	48
FIG.20. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre <i>L. brasiliensis</i>	50
FIG.21.Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre <i>N. parvum</i>	52
FIG.22.Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> raza 1.	53

FIG.23. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *Alternaria* sp..... 54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de actinobacterias seleccionadas para pruebas cualitativas	30
Tabla 2. Listado e información sobre las cepas de hongos fitopatógenos usados en ensayos de antagonismo	33
Tabla 3. Evaluación del efecto antagónico de actinobacterias sobre hongos fitopatógenos en ensayos duales.	49
Tabla 4. Efecto antagónico de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre cuatro cepas de hongos fitopatógenos.....	54
Tabla 5. Resultados del porcentaje de inhibición de los compuestos de sobrenadantes de las seis cepas de actinobacterias.	59

RESUMEN

En Baja California la agricultura es una de las principales actividades económicas, sin embargo, esta se ve afectada por enfermedades causadas por diferentes hongos fitopatógenos. Existen diferentes estrategias para mitigar el daño de patógenos en los cultivos, una alternativa es usar actinobacterias, ya que tienen la capacidad de producir diversos metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue caracterizar una colección de actinobacterias nativas de Baja California para identificar cepas con actividad antagonica sobre diversos hongos fitopatógenos. Primero, se determinó el porcentaje de inhibición de seis cepas de actinobacterias sobre doce hongos fitopatógenos. Los resultados indicaron que las todas tienen actividad antagonica. Posteriormente, se caracterizó el efecto de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y difusibles (DOCs) producidos por cuatro de los aislados sobre *L. brasiliensis*, *N. parvum*, *Alternaria* sp. y *F. oxysporum* f.s. *lycopersici*. En la evaluación de VOCs todas las cepas presentaron algún porcentaje de inhibición sobre los hongos, pero la mayor inhibición se observó en la cepa *Allostreptomyces* sp. rbES339 sobre *Alternaria* sp. Al evaluar la producción de DOCs nuevamente todas las cepas mostraron inhibición sobre los hongos, siendo la cepa *Streptomyces* sp. rbES173 la que tuvo la mayor inhibición sobre *N. parvum*. Es importante señalar que no en todos los ensayos de antagonismo las actinobacterias se comportaron de manera similar, ya que mostraron cambios en la morfología de su colonia en cada ensayo e interacción; lo que nos propone una perspectiva para seguir caracterizando la interacción entre ambos microorganismos.

Evaluación de metabolitos secundarios de actinobacterias con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS DE ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias pertenecen al dominio Bacteria, filo actinobacteria y clase actinobacteria. Son un grupo de bacterias Gram positivas, con un alto contenido de guanina más citosina (G+C) en sus genomas. Antes se consideraba que éstas eran una transición entre hongos y bacterias por su similitud en el crecimiento y la esporulación, pero esta comparación solo es superficial (Ait Barka et al., 2015). Se caracterizan por presentar olor a “tierra” el cual se debe a la producción de un metabolito volátil, llamado geosmina (Dangi et al., 2014).

Muchas actinobacterias presentan un crecimiento apical en forma de hifas, producen micelio y su reproducción es esporular. La mayoría son fisiológica y ecológicamente aeróbicas, aunque pueden ser heterótrofas o quimioautótrofas, se consideran saprofitas y tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes nutricionales. (Barka et al., 2016). Están distribuidas cosmopolitamente, en cuerpos terrestres representan entre el 20% y el 60% de la población microbiana total, pero pueden ser encontradas en ambientes acuáticos dulces y marinos. *Streptomyces*, es el género más amplio, habitan principalmente en suelos semi-áridos, donde la retención de agua es menor, con un pH alcalino y una temperatura entre los 25°C y 30°C (Kennedy et al., 2009; Hakvåg et al., 2008; Leiva et al., 2004).

Durante la mayor parte de su ciclo de vida las actinobacterias están en latencia, en forma de esporas, esperando a que se presenten las condiciones necesarias para iniciar su crecimiento. Su ciclo reproductivo inicia con una diferenciación celular, continua con la germinación de esporas, cuando las condiciones nutricionales son adecuadas comienza la generación del micelio. Enseguida se presenta un crecimiento de la colonia y se desarrolla un micelio aéreo y finalmente, cuando se

presentan condiciones de escasez nutricional, las hifas se fragmentan y dan origen a nuevas esporas (Barka et al., 2016) (FIG.1). Las actinobacterias pueden formar esporas unicelulares o en cadena, las cuales son consideradas importantes en su taxonomía. Estas son albergadas en esporangios flagelados o no flagelados, que producen pigmentos que se conocen como polímeros melanoides que son similares a las sustancias húmicas encontradas en el suelo (Manivasagan et al., 2013; Barka et al., 2016; (Salwan & Sharma, 2020).

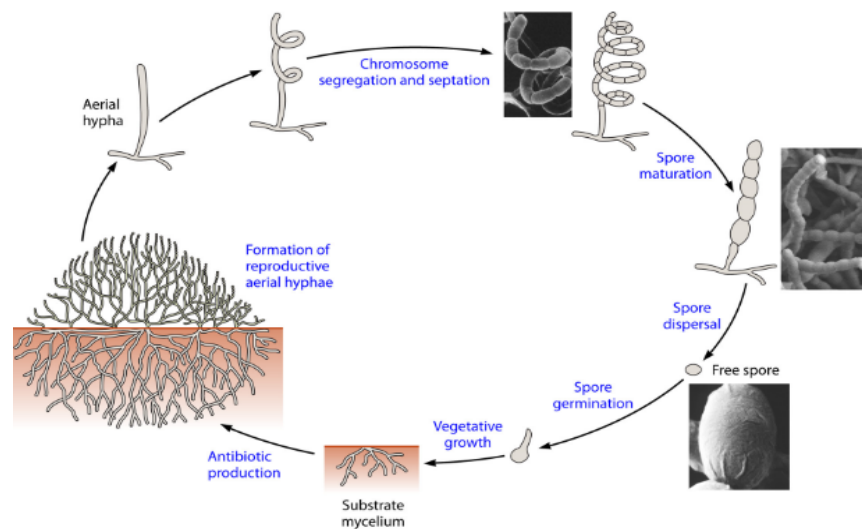


FIG. 1. Esquema del ciclo reproductivo de esporulación en actinobacterias (Barka et al., 2015).

1.2 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA ESPORULACIÓN

Durante el ciclo reproductivo de *Streptomyces* existen dos rondas de muerte celular programada (MCP). Después de la germinación de esporas, una vez que se desarrolla el micelio se lleva a cabo la primera ronda, que afecta el material formado durante el crecimiento vegetativo temprano. A continuación, se presenta la segunda ronda de MCP, en la que las hifas vegetativas o del sustrato se lisan para formar el micelio aéreo. Las hifas aéreas, que tienen un aspecto esponjoso, terminarán por diferenciarse para formar cadenas de esporas (Barka et al., 2016). Una de las

principales características de las hifas aéreas es que tienen un tamaño mayor que las hifas vegetativas, adicionalmente están rodeadas por una vaina que más tarde se convertirá en parte de la cubierta de las esporas. Se ha propuesto que la vaina envolvente crea un canal a lo largo de la hifa externa que facilita el transporte de nutrientes, lo que sugiere que los nutrientes y otros metabolitos pueden difundirse desde las hifas vegetativas hasta las puntas de crecimiento de las hifas aéreas (Barka et al., 2016).

Los genes que se requieren para la formación de las hifas aéreas se denominan *bld* en referencia al fenotipo “calvo” de mutantes que carecen de la formación de estas; mientras que las mutantes cuyo desarrollo está bloqueado en una etapa anterior a la esporulación se denominan *whi* debido a que no producen el pigmento gris de la spora (Barka et al., 2016). Las hifas aéreas crecen por extensión de la punta, cuando se genera la suficiente biomasa aérea, se transmite una señal para detener el crecimiento y seguir con la esporulación que esta probablemente relacionada con las proteínas reguladoras, *WhiA* y *WhiB* (Barka et al., 2016).

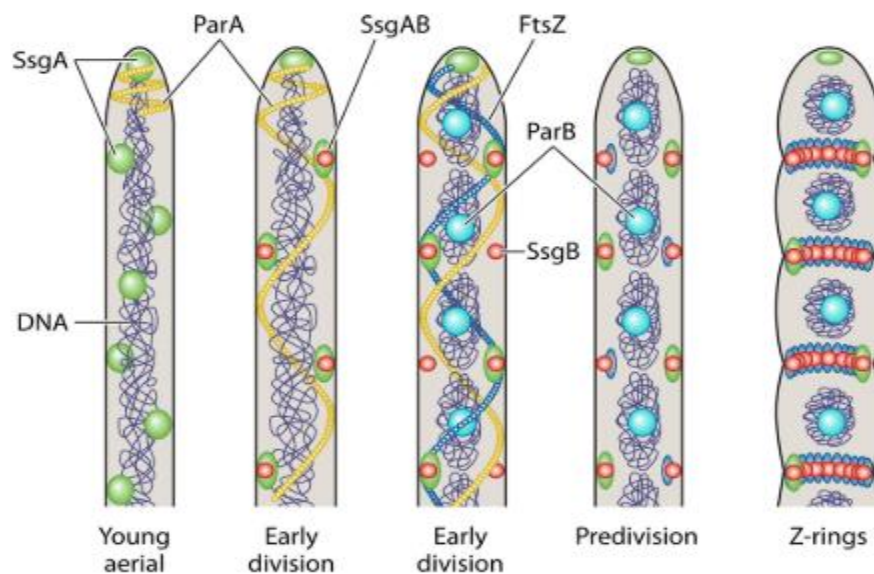


FIG.2. Modelo del control de la división celular en la esporulación (Tomado de Barka et al., 2016)

La mayoría de las bacterias tienen una división por fisión binaria y este proceso involucra la formación del anillo citocinético, cuyo ensamblaje se forma por la polimerización de miles de copias del homólogo de tubulina FtsZ. En *Streptomyces*, sus largas hifas aéreas se empiezan a diferenciar en cadenas de esporas en un evento de división celular con una coordinación única, produciendo cadenas distintivas de FtsZ que eventualmente conduce a una producción de cadena de esporas haploides (Grantcharova et al., 2005). Cuando inicia la esporulación SsgA se encuentra en las hifas aéreas jóvenes, las proteínas SsgB y FtsZ permanecen de manera difusa en la etapa de división temprana, ParA se agrupa en la punta de la hifa aérea joven. Posteriormente SsgA y SsgB se localizan entre sí y ParA se empieza a difundir como filamento a lo largo de la hifa aérea en la etapa temprana de división, más adelante se forma el complejo ParB sobre los cromosomas no condensados. FtsZ se ensambla en forma de espiral. En la etapa de la pre-división celular el SsgB localiza a FtsZ, para más tarde formar anillos Z en la etapa de esporulación. (Barka et al., 2016) (Fig.2).

Todas las proteínas y genes mencionados anteriormente de manera integral son importantes no solo para el crecimiento de las hifas y la esporulación también están involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, lo que se debe a que durante la diferenciación de hifas vegetativas a hifas aéreas es donde se producen estos compuestos.

1.3 REGULACIÓN GENÉTICA DE PRODUCTOS SECUNDARIOS

Las actinobacterias tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con funciones antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, insecticidas y herbicidas (Aggarwal et al. 2016). Por lo que en su genoma pueden encontrarse una gran diversidad de genes que codifican para las vías de síntesis de estos compuestos (Pusztahelyi et al. 2015). La producción de antibióticos y de otros metabolitos secundarios está relacionada con el inicio del desarrollo del ciclo reproductivo de *Streptomyces*. Esta correlación puede darse en

la primera etapa de MCP. La N-acetil glucosamina (GlcNac) derivada de la pared celular actúa como una señal para el inicio del desarrollo y como una molécula inductora de la producción de antibióticos (Rigali et al., 2006., Rigali et al., 2008; Barka et al., 2016). Las condiciones nutricionales no favorables activan la señal de GlcNac, la cual acelera el crecimiento y la producción de antibióticos; por el contrario, cuando se encuentran en medios ricos, las concentraciones de GlcNac bloquean el desarrollo acelerado y la producción de antibióticos (Barka et al., 2016). La glucosamina-6-fosfato (GlcN-P-6) es un derivado de GlcNac que actúa como un regulador alostérico perteneciente a la familia GntR DasR, la cual es un regulador global para la producción de antibióticos y sideroforos. Es probable que la regularización en la señalización nutricional dependiente de GlcNac este regulada por el nivel intracelular de GlcN-P-6, la cual se une como ligando a GntR familia del regulador DasR , lo que lleva a una desrepresión del control de la producción de antibióticos que es mediado por DasR (Barka et al., 2016).

Por otro lado, las actinobacterias son capaces de producir pigmentos gracias a la melanina, los cuales pueden ser desde colores rojos, amarillos, azules, negros, verdosos, rosados, según la cepa, el medio utilizado y la edad del cultivo (Barka et al., 2016). Estos pigmentos no son necesarios para su crecimiento; sin embargo, son significativos para su supervivencia y competitividad (Barka et al., 2016; Salwan y Sharma, 2020).

1.4 LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios (MS)son moléculas de bajo peso molecular que no son esenciales en el ciclo de vida de los organismos, sin embargo, son requeridos cuando se encuentran en condiciones no favorables para su desarrollo, ya que mantienen un papel importante en la protección de las plantas contra los patógenos (Buddhika y Abersinghe, 2021).

Dentro de estas moléculas existen pigmentos, toxinas, péptidos ribosomales, péptidos no ribosomales, policétidos, ácidos grasos, antibióticos, entre otros. Se ha

demostrado que los microorganismos asociados a las plantas, principalmente las bacterias endófitas o rizosféricas y los hongos son productores de gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales son importantes para la interacción con otros microorganismos del suelo. Estos MS inducen a reacciones de defensa de las plantas, generando una resistencia sistémica a la infección por patógenos y eventualmente se construye un suelo supresor de crecimiento de patógenos (Buddhika y Abeysinghe, 2021).

1.5 SÍNTESIS DE MATABOLITOS SECUNDARIOS

Aunque las síntesis de ácidos grasos, policétidos y péptidos no ribosomales puedan tener reacciones y moléculas intermediarias similares o iguales, sus vías de síntesis son diferentes. En el caso de los ácidos grasos, su producto resultante (Acyl ACP) puede servir de sustrato para la síntesis de policétidos y también este ácido graso será parte de otras vías importantes como la formación de fosfolípidos, lípido A, hemolisina y N-acil homoserina lactonas (Weissman, 2009).

La formación de FA (Fatty Acid), a través de la síntesis de ácidos grasos, por sus siglas en inglés FAS (Fatty Acids Synthesis) constituye el primer paso para la formación de la membrana lipídica, esencial para las células. Su síntesis se divide en dos etapas: iniciación y elongación cíclica. El primer paso inicia con la reacción de carboxilación de la Acetil-CoA, la cual es catalizada por la enzima Acetil CoA carboxilasa (ACC), esta reacción de carboxilación consume ATP y el sustrato principal es malonil-CoA. Posteriormente malonil CoA es transacilada hacia la ACP mediante la enzima malonil CoA:ACP transacilasa (FabD) formando el producto de malonil-ACP transacilasa.

A diferencia de los animales y hongos cuya síntesis de ácidos grasos la llevan a cabo enzimas multifuncionales, las bacterias y plantas sintetizan los ácidos grasos con enzimas monofuncionales (Geiger et al. 1991). Las enzimas multifuncionales, tienen diferentes sitios de múltiple actividad, que se encuentran generalmente dentro de una sola cadena de péptidos y son utilizados para catalizar más de una

reacción enzimática. Por otro lado, las enzimas monofuncionales, son proteínas diferentes para cada reacción. Antes de mencionar la segunda etapa de la síntesis, es importante resaltar algunas características de la proteína de ACP, por su nombre en inglés (acyl carrier protein), la cual es una proteína transportadora de grupo de acilo, de aproximadamente 80 aminoácidos, cumple la función de transporte sin desarrollar catálisis sobre la molécula transportadora. Su grupo prostético, está formado por una molécula de fosfopanteína, que es similar estructuralmente a la Coenzima A y este grupo prostético funciona como un brazo articulado móvil (Pérez & Noriega, 2016). La etapa de elongación está formada por varios ciclos de reacciones, en donde cada ciclo cuenta con una condensación, una primera reducción, una deshidratación y una segunda reducción. Primero ocurre la condensación de acetyl-ACP y malonyl-ACP catalizada por la primera enzima de condensación (FabB) o FabF, lo que conduce a la formación de acetoacetyl-ACP con liberación de CO₂. En la primera reducción el acetoacetyl-ACP es reducido usando NADPH por la enzima β-cetoacetyl-ACP reductasa (FabG) a D-3-hydroxybutyryl-ACP. A continuación, este producto es deshidratado a crotonyl-ACP, en esta reacción participa la enzima 3-hydroxyacyl-ACP deshidratasa (FabZ). Por último, en la segunda reducción el crotonyl-ACP es reducido por NADPH a butyryl-ACP y la última enzima participante es Enoyl-ACP reductasa (FabI) (López-Lara y Otto-Geiger, 2019) (Figura 4).

Cuando se completa cada ciclo de condensación y reducción de cadena, la cadena de acilo en crecimiento se transfiere nuevamente a la cetosintasa para iniciar el siguiente ciclo (Gago. G. et al.,2011).

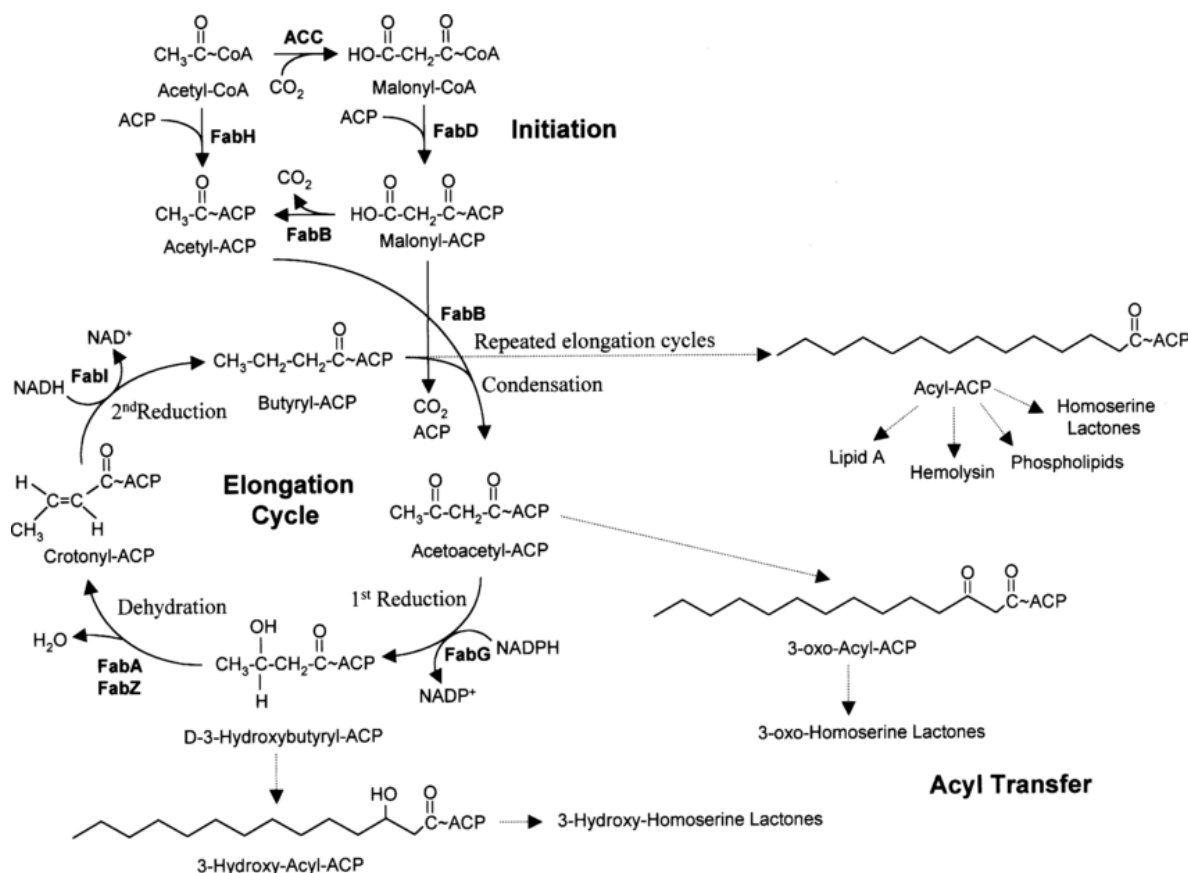


FIG.3. Esquema de la síntesis de ácidos grasos (Tomado de Hoang et al., 2002).

1.6 SÍNTESIS DE POLICÉTIDOS

Los policétidos son metabolitos secundarios producidos por hongos, plantas y principalmente por actinobacterias, poseen una gran diversidad estructural potenciales para la producción de: antibióticos, antifúngicos, antioxidantes, entre otros. Dentro de los antibióticos más reconocidos derivados de los policétidos se encuentra la eritromicina A, un antibacteriano macrólido, que ha estado en uso clínico por 53 años (Washington y Wilson, 1985). Más de un tercio de los medicamentos aprobados entre 2005 y 2007 fueron productos derivados de los policétidos y muchos de ellos siguen en desarrollo (Weissman, 2009).

Es importante mencionar que la síntesis de ácidos grasos y policétidos, son procesos similares, pero difieren en que: los policétidos (PKs), son un grupo estructuralmente más diverso, sus unidades iniciadoras y extensoras pueden ser

más diversas, el grado de reducción en los ácidos grasos siempre es total, mientras que en los PKs es variable en cada paso de extensión, los policétidos tienen numerosos centros quirales, por las estructuras de las unidades extensoras que tienen posibles cadenas laterales (Morgado, 2015).

Estos metabolitos son sintetizados a partir de precursores acil-CoA mediante las enzimas monofuncionales policétido sintetasas (PKSs), que van formando unidades de ácidos carboxílicos. El nivel de organización de estas enzimas está estructurado en dos niveles: por módulos y por dominio, cada enzima contiene hasta dos o tres módulos y cada uno de estos módulos está compuesto por tres dominios esenciales. Tienen un proceso similar a la síntesis de ácidos grasos, se considera que las enzimas de la síntesis de ácidos grasos son una variante de las policétido sintetasas. Un módulo es una estructura formada por los dominios de unión y activación enzimáticas.

Los tres dominios esenciales son: Beta sintasa (KS), Acil transferasa (AT), Tioesterasa (TE) y el de la proteína portadora de acilo (ACP) (Cabrera et al., 2017). Y cada dominio lleva una función específica para la elongación de la cadena del policétido. El dominio AT se encarga de atraer los monómeros que se incorporaran a la cadena, en el dominio ACP ocurre el ensamblaje, ACP está unido a 4-fosfopanteteína, la cual enlaza al grupo tiol, con los monómeros que se van añadiendo a la cadena. Un grupo tiol, es un compuesto formado por un átomo de azufre y uno de hidrógeno. Por último, el dominio KS, cataliza la reacción de condensación de tipo tiol-Claisen descarboxilativa de los sustratos provenientes de AT y el precursor unido al dominio ACP. La amplia diversidad de policétidos que existen en la naturaleza dependen gran parte de la presencia de dominios accesorios, estos dominios opcionales pueden ser: ceto-reducción (KR), deshidratación (DH) o enoil-reducción (ER). Dentro de cada enzima debe de haber al menos un dominio de terminación (TE) o reducción (Red) que indican el final de la elongación del policétido. Por último, lo que determina la estructura final del metabolito es el número de módulos y tipo de dominios (Mejía Ponce, 2017).

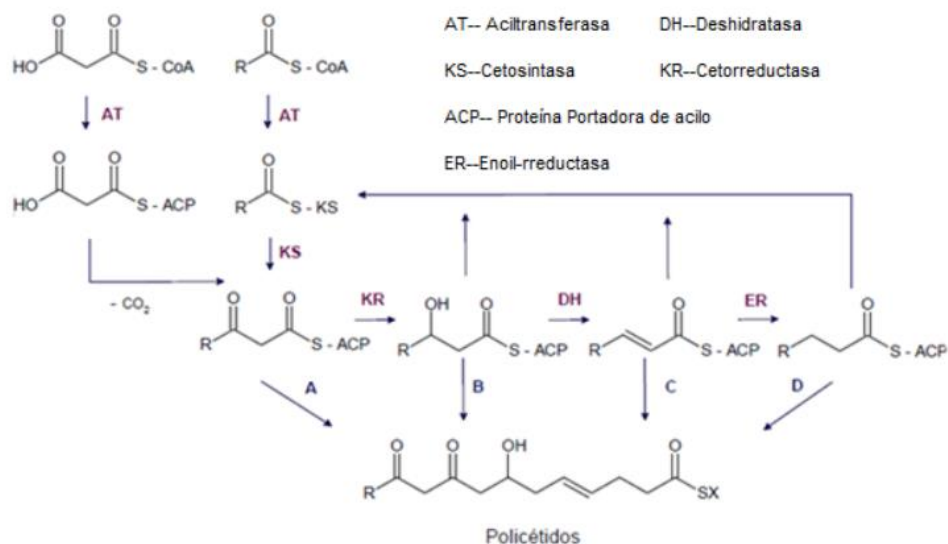


FIG.4. Esquema de la síntesis de policétidos (Tomado de Cabrera et al., 2017)

Los sistemas de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) de manera estructural son enzimas grandes multimodulares y cada módulo está constituido por tres dominios catalíticos: adenilación (A), acarreador peptidil (PCP), condensación (C) necesarios para completar el ciclo de elongación en la síntesis de péptidos catalizados. El dominio de adenilación se encarga del reconocimiento y activación del aminoácido que está relacionado al ácido hidroxilo, después de que el sustrato es activado para la transferencia y activación del mismo acarreador peptidil. El dominio de condensación se encarga de la formación del enlace carbono-nitrógeno y el aminoácido activado.

Los dominios A tienen una longitud aproximada de 550 aminoácidos, se encuentran dentro de la superfamilia ANL (acil-CoA sintetasas), el sitio catalítico tiene un bolsillo de unión que recibe al monómero que se activará por una reacción de adenilación con una molécula de ATP. Cuando el monómero fue seleccionado, adenilado y activado, se transfiere y se une covalentemente al dominio de Tiolación (T) o PCP, el cual tiene un aproximado de 80 aminoácidos de longitud, al igual que la ACP,

poseen las mismas características, su única diferencia es que las PCP son acarreadoras de péptidos.

El dominio de condensación con un aproximado de 450 aminoácidos, cataliza la formación de los enlaces peptídicos, entre los monómeros que fueron transportados por los dominios T. (Duban et al., 2022). Para finalizar, un dominio de tioesterasa (Te) cataliza la liberación del péptido no ribosómico neorformado del complejo enzimático. El péptido puede ser liberado por hidrólisis y producir ACV (ácido aminoadípico-cisteína-valina) el cual es un precursor de la penicilina o puede ser una reacción intramolecular y producir un péptido cíclico (Duban et al., 2022).

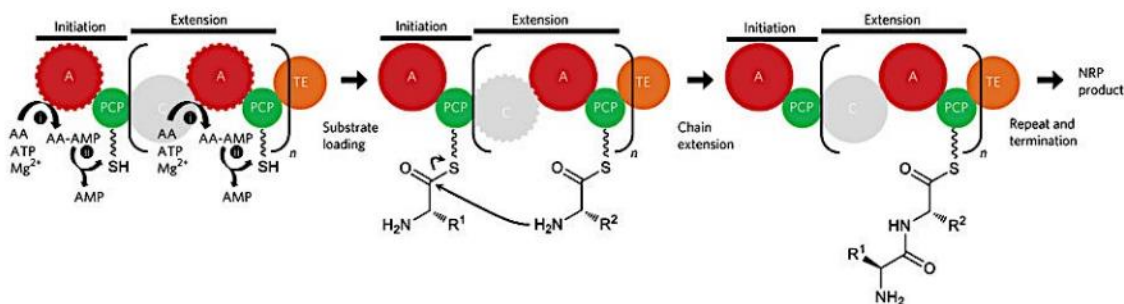


FIG.5. Representación de la síntesis de NRPS (Tomado Cabrera et al., 2017)

1.7 IMPORTANCIA DE LAS ACTINOBACTERIAS COMO PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS

El género *Streptomyces* es uno de los principales géneros dentro de las actinobacterias en la producción de antibióticos. Están reportados alrededor de 10,000 metabolitos secundarios bioactivos producidos por actinobacterias, de los cuales 7,600 compuestos son producidos por las especies del género *Streptomyces* (Dangi et al., 2014). Dentro de estos se encuentran el cloranfenicol y la tetraciclina, entre otros antibióticos importantes para la industria farmacéutica (Martínez et al., 2017).

Los antibióticos son sintetizados a partir de los precursores del metabolismo primario, como lo son la glucólisis, el catabolismo de ácidos grasos y proteínas. El ácido hexurónico insaturado y una amino-caprolactama también son utilizados como precursores para la biosíntesis de diferentes antibióticos. Los antibióticos

como la nistatina, jadomicina, tetraciclina y sus derivados utilizan como precursores acetil Co-A, malonil y NADPH. La biosíntesis de estos antibióticos consume suficiente energía en el proceso lo que implica la utilización del sistema multiproteico NADPH (Salwan & Sharma, 2020). Las estructuras moleculares de los antibióticos incluyen β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, glucopéptidos, quinolonas, oxazolidinonas y sulfonamidas (Salwan & Sharma, 2020).

El cloranfenicol, obtenido a partir de una cepa de *Streptomyces venezuelae*, es un agente antimicrobiano, único entre los compuestos naturales, ya que contiene un grupo nitrobenzeno unido a un grupo propanol y un grupo amino conectado a un derivado del ácido dicloroacético. El cloranfenicol es una de las moléculas más simples (Fig. 3), por lo que es el primer antibiótico, cuya síntesis fue desarrollada para una producción a gran escala. El mecanismo de acción principal de este antibiótico es la inhibición de la síntesis de proteínas de diversas bacterias al bloquear la elongación de la cadena de péptidos por la unión al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S (Morales G. et al., 2007).

En el caso de la tetraciclina, también inhibe la biosíntesis proteica, uniéndose en las subunidades ribosomales 70S y 80S impidiendo que el RNA mensajero llegue al interior de la subunidad 30S del ribosoma, evitando la unión del aminoacil en el sitio del receptor y provocando el bloqueo de la cadena polipeptídica.

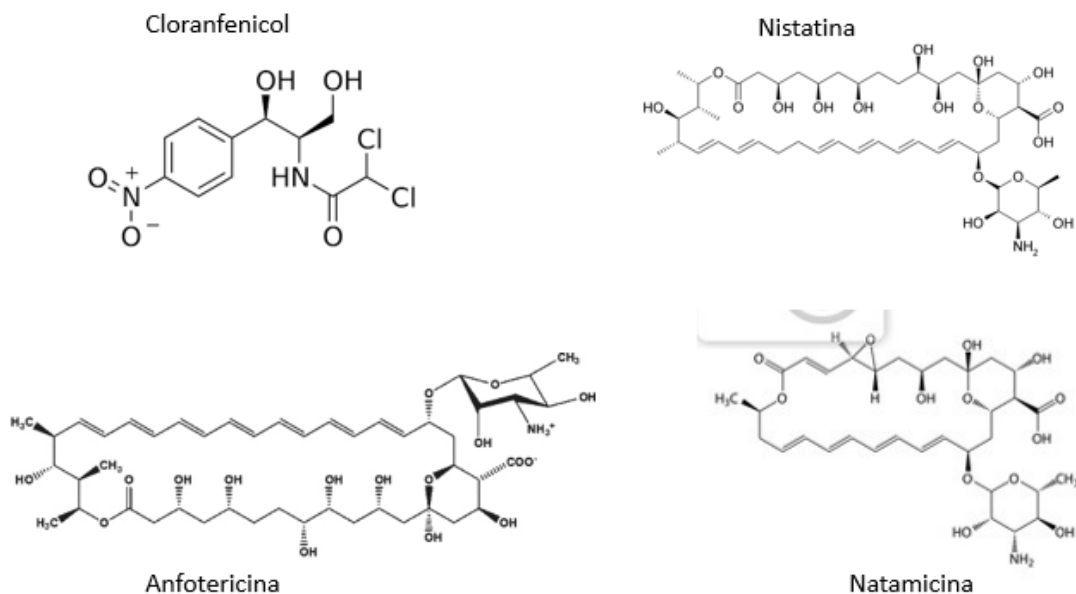


FIG.6. Estructuras químicas de los cuatro antibióticos obtenidos por el género *Streptomyces* (Tomado de diversas fuentes de internet)

A partir de otras especies del género *Streptomyces* se han obtenido importantes compuestos antifúngicos, como el caso de la nistatina, la cual se aísla de *Streptomyces noursei*. Esta molécula posee propiedades fúngicas y fungistáticas, su mecanismo de acción consiste en unirse a los esteroides de la membrana celular, formando canales iónicos en las mismas, provocando la permeabilidad de la membrana y la salida de los elementos intracelulares. Otros compuestos antifúngicos producidos por este tipo de bacterias son la anfotericina B y la natamicina que son obtenidas de *S. natalensis* (Koontz Marcy, 2003). Su mecanismo de acción consiste en producir un cambio en la permeabilidad de la membrana, provocando pérdida del contenido citoplasmático y provocando la muerte de la célula. Debido a lo anterior, las actinobacterias representan, hasta ahora, el recurso microbiológico más importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, esto considerando que solo se han descubierto un pequeño porcentaje de estos, si se considera la gran diversidad existente (Tena et al.,2015).

1.8 ACTINOBACTERIAS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES EN AGRICULTURA

En la rizósfera se encuentran una gran cantidad de bacterias, muchas de los cuales son capaces de colonizar las raíces y la endósfera de las plantas. Estos microorganismos son importantes para promover el crecimiento y prevenir enfermedades. Algunas de estas bacterias reciben el nombre de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) e inducen el crecimiento de las plantas y al mismo tiempo las protegen de distintos patógenos por mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos son la solubilización de minerales tales como el fósforo, potasio, el zinc, la producción de fitohormonas, entre algunos otros; mientras que entre los mecanismos indirectos incluyen la producción de antibióticos, sideróforos o de enzimas degradadoras de la pared celular, así como la competencia por nutrientes, e inducción de la respuesta resistencia sistémica de la planta (Olanrewaju et al., 2017).

Con respecto a la actividad antagónica las actinobacterias pueden inhibir el crecimiento de los patógenos a través de diversos mecanismos, mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV), antibiosis, colonización y competencia por nutrientes y minerales como el hierro, zinc, potasio, azufre, etcétera (Berg, 2009).

En agricultura las PGPR pueden usarse directamente para la formulación de productos, o los metabolitos secundarios con actividad antifúngica que sintetizan son empleados para elaborar agroquímicos y ser utilizados en los cultivos para el control de plagas o enfermedades (Aggarwal et al. 2016; Olanrewaju and Babalola 2019; Vurukonda et al. 2018; Buddhika y Abeysinghe, n.d.). Se ha reportado que las actinobacterias endófitas, son capaces de promover el crecimiento de las plantas y protegerlas de diversas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Tokala et al., 2002; Taechowisan et al., 2003; Tian et a., 2004; Cao et al., 2000). Adicionalmente, se ha observado este tipo de bacterias son encontrados en la

rizósfera de las plantas y pueden tener un efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos, como *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. (Lahdenpera et al., 1991).

En diferentes reportes se ha evaluado la actividad antagónica de actinobacterias del género *Streptomyces* en condiciones *in vitro* mediante el establecimiento de ensayos duales ensayos *in vitro* contra hongos que afectan a los cultivos más importantes de hortalizas y algunos otros de gran importancia en México y el mundo como lo son los viñedos.

De manera comercial se distribuyen productos formulados a base de cepas de *Streptomyces*, por ejemplo, Actinovate ®, el cual su base son esporas de *Streptomyces lydicus* WYEC 108. Este es un aislado de suelo, y de acuerdo a la ficha técnica esta cepa puede colonizar las raíces de las plantas, compitiendo con los patógenos por el espacio y produciendo compuestos antifúngicos. Cuando se utiliza en forma de pulverizado en el suelo o tratamiento de semillas, el producto controla hongos fitopatógenos, tales como, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytm*, entre otros (Novozymes ®, 2022).

Por otro lado, la empresa Plant Health Care: México, maneja diferentes productos para el beneficio y cuidado de las plantas. Uno de ellos es PHC BioPak-F, un fertilizante biológico en polvo, soluble en agua formulado a base de *Streptomyces griseoviridis* que ofrecen a la planta una resistencia sistémica contra hongos patógenos del suelo (© PHC Mexico, 2022).

Otro producto utilizado es Avicta ®, en este caso se trata de un producto formulado a base a partir de un mebabolito secundario, la abamectina, derivado de *Streptomyces avermitilis*; el cual muestra actividad nematicida contra nematodos de los géneros *Helycotilenchus* spp., *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Criconemoides* spp., *Tylenchorchynus* spp. Y *Xiphinema* spp., en etapas tempranas de cultivo (© Syngenta 2022).

2. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha tenido interés en los microorganismos que viven en la rizósfera de las plantas, sobre todo en las actinobacterias, ya que se encuentran de manera abundante y se caracterizan por su capacidad antagónica sobre fitopatógenos (Tena et al.,2015).

Debido a ello se han realizado diversas investigaciones para identificar y caracterizar actinobacterias con potencial para usarse en agricultura. Por ejemplo, Evangelista-Martínez et al., (2017) evaluaron la actividad antifúngica de las moléculas bioactivas de *Streptomyces* mediante ensayos *in vitro*, algunas de las cepas evaluadas presentaron actividad antagónica sobre *Fusarium solani*, *F. oxysporum f. sp lycopersici* y *Phytophthora capsici*.

En 2019, Sánchez-García et al., (2019) realizaron muestreos en dos condiciones de suelo (cultivado y no perturbado) entre enero y febrero, en diferentes municipios del estado de Guanajuato. A partir de las muestras de suelo rizosférico colectadas se aislaron actinobacterias, las cuales se evaluaron de manera *in vitro* para determinar su efecto antagónico sobre tres cepas de hongos fitopatógenos, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici* y *F. oxysporum f. sp lycopersici*. De las cepas evaluadas, tres tuvieron un rango de inhibición entre el 60% a 80% en los tres fitopatógenos con los que se realizó la confrontación.

Camero et al., (2020) buscaron identificar actinobacterias para el control de patógenos *Pestalotiopsis sp.*, *Collectotrichum gloesporioides* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* que afecta el cultivo de guanábana en Nayarit. Obtuvieron nueve cepas de actinobacterias, con los aislados obtenidos llevaron a cabo una evaluación antagónica *in vitro* mediante el establecimiento de ensayos duales. Los resultados de este ensayo mostraron que tres especies de *Streptomyces* presentaron actividad antagónica contra dos de los fitopatógenos evaluados.

Por otro lado, Trinidad Cruz et al., (2021) aislaron 41 cepas de actinobacterias, provenientes del suelo rizosférico de una huerta de aguacate var. Hass del municipio de Ziracuaretiro, Michoacán. Posteriormente para estos aislados obtenidos se evaluó su capacidad de inhibición sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro*. De los aislados evaluados el 15% de inhibió en el crecimiento de este fitopatógeno que es causante de la enfermedad conocida como antracnosis.

En Baja California, Delgado Ramírez et al., (2021) realizaron una bioprospección de muestras del suelo de la rizósfera de *Solanum hindsianum* de 12 diferentes sitios. A partir del análisis de las muestras se obtuvieron 343 cepas bacterianas, de las cuales 15 fueron identificadas como actinobacterias. Para el total de los aislados se evaluó la actividad antagónica sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) en condiciones *in vitro* y posteriormente mediante ensayos en planta. De los aislados evaluados dos cepas de actinobacterias pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (rbES158) y *Glutamibacter* (rbES331) en condiciones *in vitro* mostraron una actividad antagónica y obtuvieron porcentajes de inhibición de entre un 15% y 50%. Interesantemente, al evaluar su actividad de biocontrol sobre FOL en ensayos con plantas, 2 cepas tuvieron un efecto letal al desarrollar 33% y 66% de letalidad sobre las semillas. Es por ello que en este trabajo se busca continuar la caracterización de cepas de actinobacterias obtenidas y determinar su actividad antagónica, así como identificar los mecanismos de acción mediante los que inhiben a los hongos fitopatógenos.

3. JUSTIFICACIÓN

En Baja California la agricultura es una de las principales actividades económicas, la cual enfrenta grandes problemas debido al daño causado por fitopatógenos. Una alternativa de control de enfermedades es mediante el uso de actinobacterias, ya que estas pueden producir diversos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, lo cual las convierte en una opción para disminuir el uso de agroquímicos en la agricultura. Sin embargo, para garantizar su efectividad de biocontrol sobre fitopatógenos es necesario identificar microorganismos adaptados a las condiciones climáticas del sitio geográfico donde se van a aplicar o aislar y sintetizar metabolitos secundarios específicos con actividad antimicrobiana que permitan formular productos para usar en cultivos agrícolas.

Considerando lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización de diferentes cepas de actinobacterias nativas de Baja California, con potencial para actuar como agentes de control biológico sobre hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica en este estado. Como parte de la caracterización, se identificarán aquellas que puedan inhibir el mayor número de hongos fitopatógenos que afecten cultivos de importancia económica, considerando bajo qué condiciones de crecimiento se producen los compuestos de efecto antagónico más efectivos, tomando en cuenta que cada hongo fitopatógeno tiene diferentes estilos de vida y puede poseer diferentes mecanismos de resistencia.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de compuestos difusibles y volátiles de actinobacterias asociadas a *Solanum hindsianum* sobre distintos hongos fitopatógenos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cepas de actinobacterias que producen compuestos volátiles y no volátiles con actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos de importancia económica en México.
- Determinar el efecto antifúngico de los compuestos difusibles contra diferentes hongos fitopatógenos.
- Determinar el efecto antifúngico de los metabolitos secundarios de los compuestos volátiles contra diferentes hongos fitopatógenos.

5. HIPÓTESIS

- Los metabolitos secundarios sintetizados por actinobacterias asociadas a *S. hindsianum* tienen actividad antifúngica diferenciada sobre diferentes hongos fitopatógenos.

6. METODOLOGÍA

6.1 MANTENIMIENTO Y RESGUARDO DE AISLADOS

Fueron seleccionados 15 cepas de actinobacterias de la colección de Delgado-Ramírez (2020), las cuales fueron recuperadas de suelo de la rizósfera de *Solanum hindsianum* de muestras colectadas en Baja California Sur y Baja California. Hasta el momento de su caracterización las esporas se mantuvieron almacenadas en el laboratorio de fitopatología del CICESE, en glicerol al 35% y a -20°C. (Tabla 1). Las 12 cepas de hongos se encontraban resguardadas en el laboratorio de Fitopatología del CICESE, en glicerol al 30% y almacenadas a 4°C.

Para recuperar los resguardos de hongos se colocó un disco de micelio en cajas Petri de Agar Dextrosa Papa (PDA), posteriormente estas se incubaron por 5 días a 30°C. Para recuperar las actinobacterias, se plaquearon 10µl de suspensión de esporas en placas Petri de PDA y se incubaron por cinco días a 27°C. Transcurrido este tiempo se obtuvieron las esporas, colocando 500µl de agua sobre el cultivo de actinobacterias, posteriormente con un algodón estéril se frotaba el micelio y enseguida las esporas se llevaban a tubos eppendorf de 1.5ml con 700µl de agua y 700µl de glicerol al 35%.

Tabla 1. Lista de actinobacterias seleccionadas para pruebas cualitativas

Muestra	Cepa	Inhibición	Pruebas colorimétricas					Medio de cultivo
			K	P	Qui	Sid	AIA	
M1	rbES165	+	-	+	-	-	+	YPD
M2	rbES171	+	-	-	-	-	+	ISP4
M3	rbES161	+	-	-	+	-	+	YPD
M3	rbES164	+	-	-	-	-	-	YPD
M3	rbES166	+	-	-	+	-	+	YPD
M3	rbES160	+	-	+	-	-	-	ISP4
M4	rbES158	+	+	+	-	+	-	GYA
M4	rbES173	+	-	-	+	-	+	YPD
M5	rbES174	+	-	-	+	-	+	KB
M6	rbES159	+	-	-	-	-	-	YPD
M8	rbES175	+	-	-	-	-	+	KB
M11	rbES331	+	-	-	-	-	+	TY/GYA
M12	rbES338	+	-	-	-	-	+	TY/YPD
M12	rbES339	+	-	-	-	-	+	TY/YPD

6.2 HONGOS FITOPATÓGENOS SELECCIONADOS PARA EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO: Particularidades de hongos fitopatógenos usados en ensayos de antagonismo bajo condiciones *in vitro*

En el estado de Baja California vid y tomate se encuentran entre los principales cultivos establecidos (Méndez-Medina, 2016; Delgado-Ramírez, 2020). Durante el ciclo de vida del cultivo se ven afectados por diferentes enfermedades que disminuyen su rendimiento.

Debido a que las cepas de actinobacterias son aislados nativos de Baja California se determinó evaluar su efecto sobre fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia de este estado. Para ello fueron seleccionadas 12 cepas de hongos como hongos fitopatógenos para realizar los ensayos de antagonismo los cuales

fueron aislados de cultivos establecidos en diferentes regiones del estado (Tabla 1) Ocho de estos son especies asociadas como agentes causales de enfermedades de la madera de vid, siete de ellas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, identificadas como, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *Lasiodiplodia brasiliensis*, *L. gilanensis*, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum*, *N. luteum*, *D. mutila*. En cuanto a los géneros pertenecientes a esta familia se sabe que ocasionan tienen gran habilidad de pasar de endófito a patógeno en plantas que están bajo estrés (Mondragón-flores, 2021). Otro de los aislados evaluados pertenece a la familia Diaportheaceae (*Diaporthe* sp.), esta especie se asocia con la enfermedad conocida como muerte regresiva por Phomopsis en vid. Adicionalmente fueron elegidas tres especies de hongos que causan enfermedades en el cultivo de tomate, dos de ellas asociadas con la pudrición radicular (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 y *F. solani*) y la otra cepa desencadena tizón tardío (*Alternaria* sp.).

Con respecto a los hongos que afectan al cultivo de vid se ha reportado, que cepas del género *Lasiodiplodia* son cosmopolitas y tiene una gran variedad de hospederos, desde plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Picos Muñoz et al., 2015). Además, ocasionan enfermedades como gomosis, tizón de la hoja, pudrición de la raíz en plantas maderables y en los cultivos (Pitt y Hocking, 2009; Shahbaz et al., 2009).

En cuanto a las cepas del género *Neofusicoccum* se han reportado diferentes especies, siendo *N. australe* uno de los patógenos más importantes dentro de *Botryosphaeriaceae* que afectan a la vid y otras especies frutales. Algunos estudios han demostrado que en ensayos de patogenicidad con *N. australe* y *N. stellenboschiana* en manzano, ciruelo, olivo y vid, causan desde lesiones menores, lesiones intermedias y grandes (Mojeremane et al., 2020). Otras especies como *N. luteum* y *N. parvum* también han sido identificados en viñedos del país (Tapia et al., 2020). Respecto a *B. dothidea* se reporta que daña a la pitahaya (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton y Rose) provoca en los tallos manchas circulares color

marrón que posterior se vuelven cafés, después avanza a los tejidos internos del tallo, se empiezan a desprender partes del tallo dejando huecos, en estos huecos se pueden observar picnidios y pseudotecios del hongo (Valencia-botín & Livera-muñoz, 2005).

La enfermedad de pie negro es afectada por diferentes tipos de hongo incluido *B. dothidea*, esta se hace presente en los viñedos de todo el mundo. Algunos de los síntomas principales son vasos oscurecidos, las plantas enfermas empiezan a mostrar pérdida de vigor, troncos pequeños, entrenudos cortos, reducción en el follaje total y tamaño de las hojas, las cuales muestran clorosis intervenal y necrosis (Abreo et al.,2013).

Cepas del género *Diplodia*, suele generar los siguientes síntomas en plantas enfermas, amarillamiento, tizones que cubren parcialmente la superficie de la epidermis de hojas. En base a las descripciones de (Leyva et al., 2011) sus picnidios son globosos de color marrón y conidios fusiformes del mismo color, estas observaciones fueron encontradas en asilados de granos de avena. El hongo fitopatógeno *D. mutila*, está asociado a la enfermedad del brazo muerto en el cultivo de vid, y este afecta la productividad y la rentabilidad del cultivo (Flores, 2005). Algunos de los síntomas de la enfermedad de brazo muerto que ocasiona *Diplodia mutila*, es la marchitez, clorosis en las hojas y pudrición en los frutos en algunos casos, cuando la enfermedad está muy avanzada, se pueden afectar las inflorescencias y el fruto se llega a deshidratar por completo (Flores, 2005). Otro de los hongos que afectan la madera de vid son cepas del género *Diaporthe*, las cuales se encuentran afectado principalmente los cultivos de cítricos, un ejemplo es *Diaporthe Caulivora*, esta especie es causante del cancro del tallo que predomina en los cultivos de soja (Sánchez, M.C.; Ridao, A. del C. & Colavita, 2015).

Tabla 2. Listado e información sobre las cepas de hongos fitopatógenos usados en ensayos de antagonismo

Cepa	Especie	Hospedero	Origen	Referencia
Manuel 1.0	<i>Diaporthe</i> sp.	Vid	Ensenada, Baja California	Rangel-Montolla, 2021
Phum	<i>Phaeacremonium</i> sp.	Vid	Ensenada, Baja California	Rangel-Montolla, 2021
MXBCCS01	<i>Lasiodiplodia gilanensis</i>	Vid	Ensenada, Baja California	Rangel-Montolla, 2021
MXBCL28	<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>	Vid	Ensenada, Baja California	Rangel-Montolla, 2021
UC2098	<i>Neofusicoccum luteum</i>	Vid	Valle de Temecula, USA	Urbez-Torres et al., 2006
UC16	<i>Neofusicoccum australe</i>	Vid	Valle de Temecula, USA	Urbez-Torres et al., 2006
14P4	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Vid	Parras, Coahuila	Rangel-Montolla, 2021
UCD1965SB	<i>Diplodia mutila</i>	Vid	California, USA	Urbez-Torres et al., 2006
RJM22	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Vid	Chihuahua, Chihuahua	Rangel-Montolla, 2021
Fol R1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	Ensenada, Baja California	Armenta-López, 2013
Fol R2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	Ensenada, Baja California	Armenta-López, 201
Fols	<i>Fusarium solani</i>	Tomate	Ensenada, Baja California	Ceparío de fitopatología
Alt. 1	<i>Alternaria</i> sp.	Tomate	Ensenada, Baja California	Ceparío de fitopatología

6.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE DIVERSOS HONGOS FITOPATÓGENOS

Para determinar la actividad antagónica de las 15 cepas de actinobacterias seleccionadas. Primero se realizó un ensayo cualitativo, en el cual en placas Petri con PDA se inocularon 10 µL de una solución de esporas de cuatro cepas diferentes de actinobacterias (Guevara-Avenida et al., 2018). Posteriormente en el centro de la placa se colocó un disco de micelio de 7 mm, de cada uno de los hongos

fitopatógenos. Las placas se incubaron a 30°C por 5 días. Las cepas de actinobacteria que mostraron actividad antagónica mediante la formación de un halo de inhibición fueron seleccionadas para continuarse caracterizando.

6.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS SOBRE DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS MEDIANTE ENSAYOS DUALES

La cuantificación de la actividad antagónica de cepas de actinobacterias se realizó mediante la implementación de ensayos duales. Se determinó el efecto antagónico de seis cepas de actinobacterias sobre 12 hongos fitopatógenos.

En el establecimiento de este ensayo se usaron placas con medio PDA, en las cuales se colocó un disco de micelio del hongo correspondiente a una distancia de 2 cm del borde de la placa y en el extremo opuesto se colocaron 10µl de una suspensión de esporas. En los ensayos de interacción entre las cepas de *L. brasiliensis*, *D. mutila* primero se realizó la inoculación la cepa de actinobacteria y 24 horas después se inóculo el hongo. Mientras que contra las hongos *Diaporthe* sp., *N. parvum*, *N. luteum*, *N. australe* y *Fusarium oxysporum* raza 2, primero fue inoculado el hongo y dos días después la cepa de actinobacteria.

Este ensayo realizaron tres repeticiones, además las placas se incubaron por siete días a una temperatura de 30°C. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de inhibición usando la fórmula reportada por Ezziyyani et al., (2004): $PI=(R-r)/R \times 100$ donde R es la medida total de la placa control y r es la medida de hongo fitopatógeno cuando está en interacción con la bacteria.

6.5 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ACTINOBACTERIAS SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS

Para determinar la producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica producido por las cepas de actinobacterias, se utilizó un sistema doble placa (Giorgio et al., 2015); el cual consiste en inocular en una placa un disco de micelio de 7mm del hongo y en otra placa inocular siete gotas de 10 µL de una suspensión

de esporas de las actinobacterias correspondientes. Posteriormente las placas se unen de tal forma que el hongo en la parte inferior y las gotas de las cepas de actinobacterias en la parte superior. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento, enseguida las placas se incubaron por 7 días a 30°C. Después de este tiempo se determinó el porcentaje de inhibición usando la fórmula $PI=(R_xr)/R_x100$ (Ezziyani et al., 2004); además se compararon los cambios en la morfología del hongo y las actinobacterias

6.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS

Para determinar la producción de compuestos de sobrenadantes con actividad antifúngica producida por las cepas de actinobacterias se empleó un ensayo de sobrenadantes (Giorgio et al., 2015). En este ensayo se determinó el efecto de los compuestos producidos por las seis actinobacterias sobre los cuatro hongos fitopatógenos.

En matraces de 50 ml con medio de cultivo TY se inocularon 15µl del inóculo de esporas de cada actinobacteria. Los cultivos se incubaron a 125 rpm a 28°C durante seis días.

Transcurrido el tiempo de incubación se filtró cada inóculo usando filtros de jeringa de PTFE 0.20 µm. A continuación, se prepararon placas a partir del 25% del sobrenadante obtenido y medio de cultivo PDA al 75%. Una vez solidificadas las placas, se colocó en el centro un disco de micelio de 7 mm de cada cepa de hongo fitopatógeno. Las placas se mantuvieron en incubación por siete días a 30°C y enseguida se cuantificó el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo usando la fórmula descrita en la metodología anterior.

7. RESULTADOS

7.1 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

En el ensayo de identificación cualitativa antagónica se identificó que, de las 15 cepas inoculadas, seis cepas de actinobacterias: rbES158, rbES161, rbES173, rbES328, rbES331, rbES339 mostraron inhibición antagónica contra nueve hongos fitopatógenos, ejemplos de *L. brasiliense*, *F. oxysporum f.s. lycopersici* raza 1 (FIG.7.). Por lo cual fueron seleccionadas para continuar con los siguientes ensayos de antagonismo.

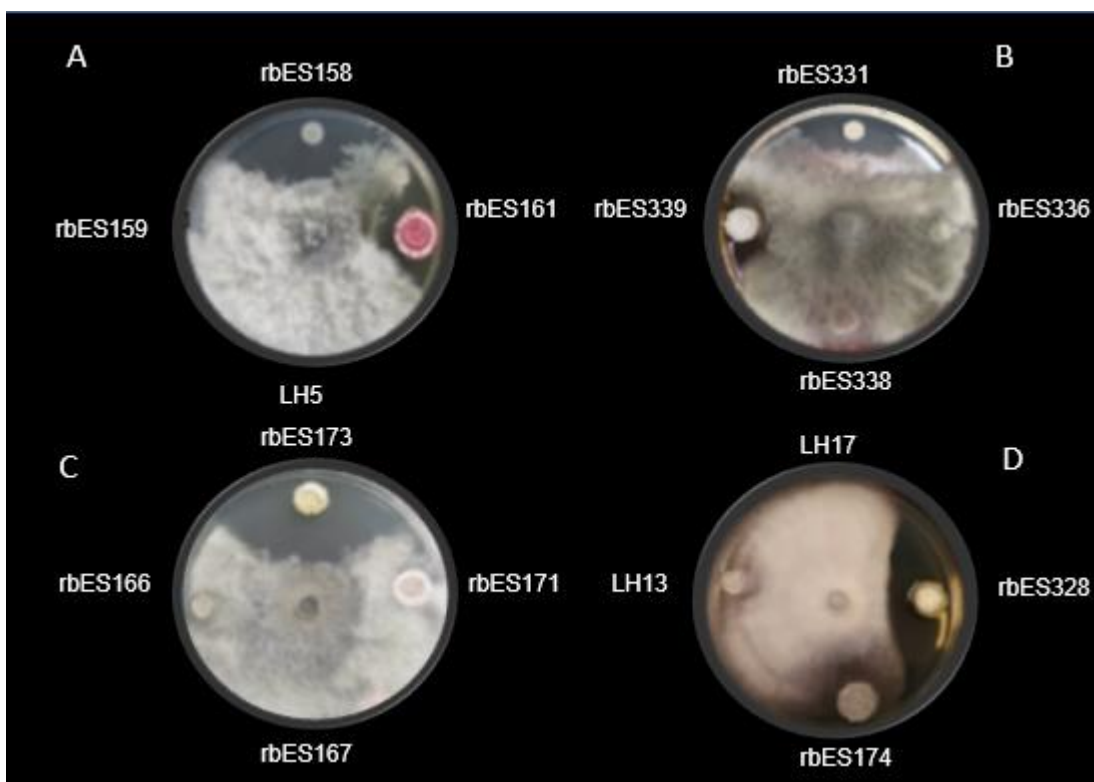


FIG.7. Evaluación cualitativa de actividad antagónica de aislados de actinobacterias sobre diversos hongos fitopatógeno. A) B) C) *L. brasiliensis* , D) *Fusarium oxysporum f.s. lycopersici* raza 1

7.2 INHIBICIÓN ANTAGÓNICA EN LOS ENSAYOS DUALES

Para los ensayos duales de antagonismo las seis cepas de actinobacterias antes seleccionadas se contrapusieron contra diferentes hongos fitopatógenos de la madera y del suelo. En las primeras siete cepas de hongos fitopatógenos que se muestran en la tabla 1, se puede observar que la mayoría de los aislados de actinobacterias tuvieron un efecto antagónico contra los diferentes hongos fitopatógenos.

El aislado rbES173, tuvo un mayor efecto antagónico cuantitativo contra cinco hongos, tres de la madera (*N. australe*, *B. dothidea*, *D. mutila*) y dos del suelo (*F. oxysporum f.sp. lycopersici*, *Alternaria sp.*) a diferencia de las demás cepas. Sin embargo, al menos una de las cepas seleccionadas tuvo un efecto antagónico contra uno de los hongos fitopatógenos. En el caso de del aislado rbES158 tuvo niveles bajos de inhibición en este ensayo, su mayor porcentaje de inhibición lo obtuvo contra *F. oxysporum f.sp. lycopersici* raza 2 y el más bajo con *N. australe*.

En la evaluación de las seis cepas de actinobacterias sobre *L. brasiliensis* se obtuvieron porcentajes de inhibición que van desde el 12 hasta el 31.3 %, siendo la cepa rbES339 la que obtuvo el valor más alto.

En este ensayo se observó que de los hongos fitopatógenos evaluados *L. brasiliensis* tienen un crecimiento rápido, y fue una de las cepas de hongos fitopatógenos que mostró diversos cambios en la morfología de la colonia dependiendo de la cepa de actinobacteria contra la que fue evaluada (FIG 8). Los cambios observados en las colonias de *L. brasiliensis* incluyen: poca formación de micelio aéreo observado en la interacción con las seis cepas, producción de un pigmento rosado que solo mostró al estar en interacción con las actinobacterias rbES158 y rbES173; melanización del micelio al estar en confrontación con cinco de los aislados (rbES161, rbES173, rbES328, rbES331 y rbES339).

Por otro lado, las seis actinobacterias evaluadas al estar en confrontación con *L. brasiliensis* mostraron buena esporulación, excepto la cepa rbES158. Además, la colonia de la cepa rbES161 mostró un mayor crecimiento en comparación con las otras actinobacterias. Para la cepa rbES331 se observó un menor aumento de la colonia y esporulación y aún con ello fue una de las cepas que tuvo mayor inhibición. Otra variación observada fue la producción de un pigmento café el cual se difundió en el medio por dos de los aislados la cepa rbES328 y rbES339.

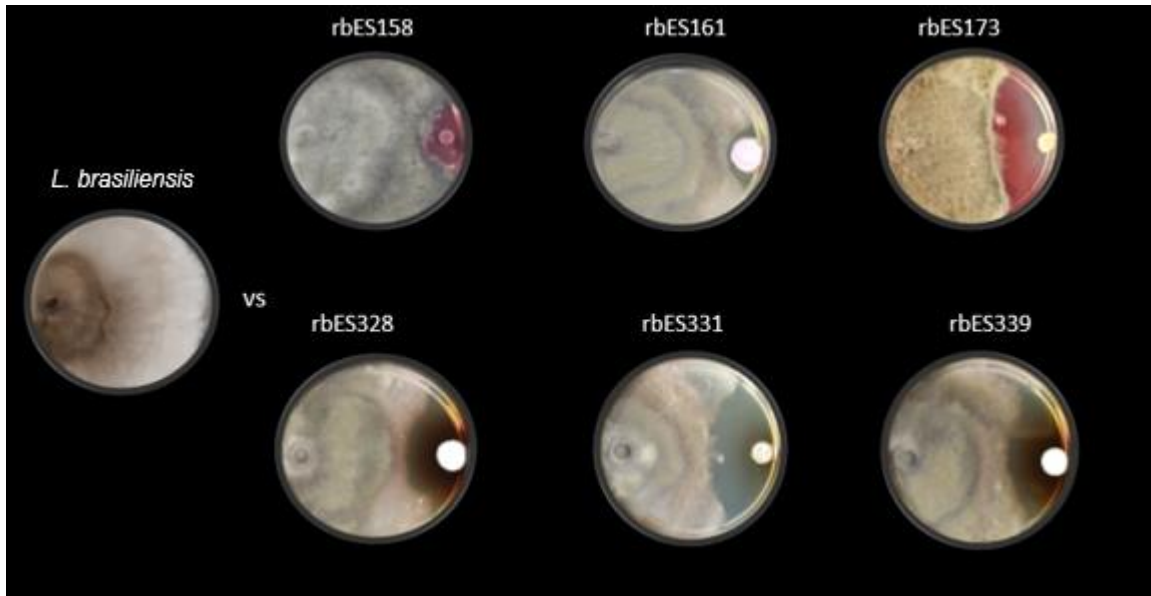


FIG.8.Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *L. brasiliensis*.

En el caso de *L. gilanensis* (FIG 9), al confrontarlo con las 6 cepas de actinobacterias, se observó que, la rbES328 fue la que produjo un impacto más significativo, obteniendo más del 40% de inhibición (Tabla 3), aunque interesantemente el hongo no mostró cambios morfológicos relevantes. Otro porcentaje representativo es el de la cepa rbES339, con un 36% (Tabla 3) de actividad antagónica, además indujo la producción de micelio aéreo del hongo y en el caso de la actinobacteria, esta sintetizó de un compuesto café. Por otro lado *L. gilanensis* al tener interacción con las cepas rbES158, rbES173, rbES328, rbES331 y rbES339, presentó cambios morfológicos como: cambio en la coloración del micelio de un color gris claro a café así como la producción de un compuesto rojo.

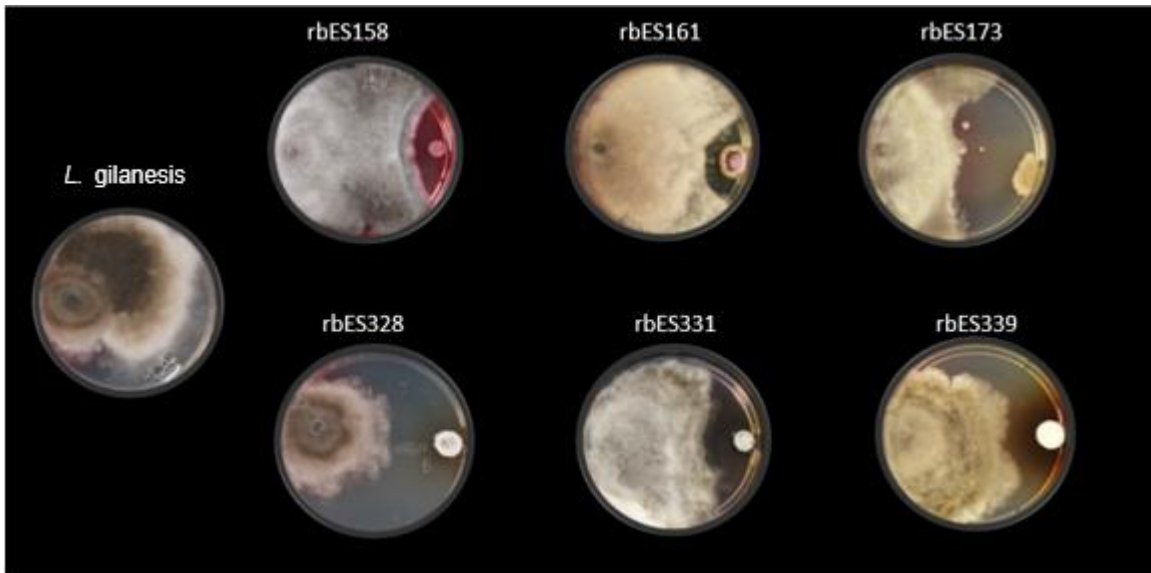


FIG.9.Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *L. gilanesis*

Es importante mencionar que para los experimentos con el aislado ambiental del hongo fitopatogéno *Diaporthe sp.* se inoculó dos días antes de inocular la actinobacterias, pues tiene un crecimiento lento. En la confrontación con este aislado, las cepas obtuvieron un porcentaje de inhibición del 24.37 al 39.3%, siendo la cepa rbES331 la que tuvo el porcentaje más alto. El hongo fitopatogéno al tener una interacción con las seis cepas presento cambios en la coloración pasando de un tono blanquecino a un color gris y a un color café conforme se va acercando a la actinobacterias, también el micelio se mostró aplanado. Otra cosa de interés que se observó fue que la cepa rbES328 produjo una pigmentación café, mayor a la que mostraron las cepas rbES331 y rbES339, sin dejar de lado que éstas dos cepas fueron las que mostraron el mayor porcentaje de inhibición (Tabla 3).

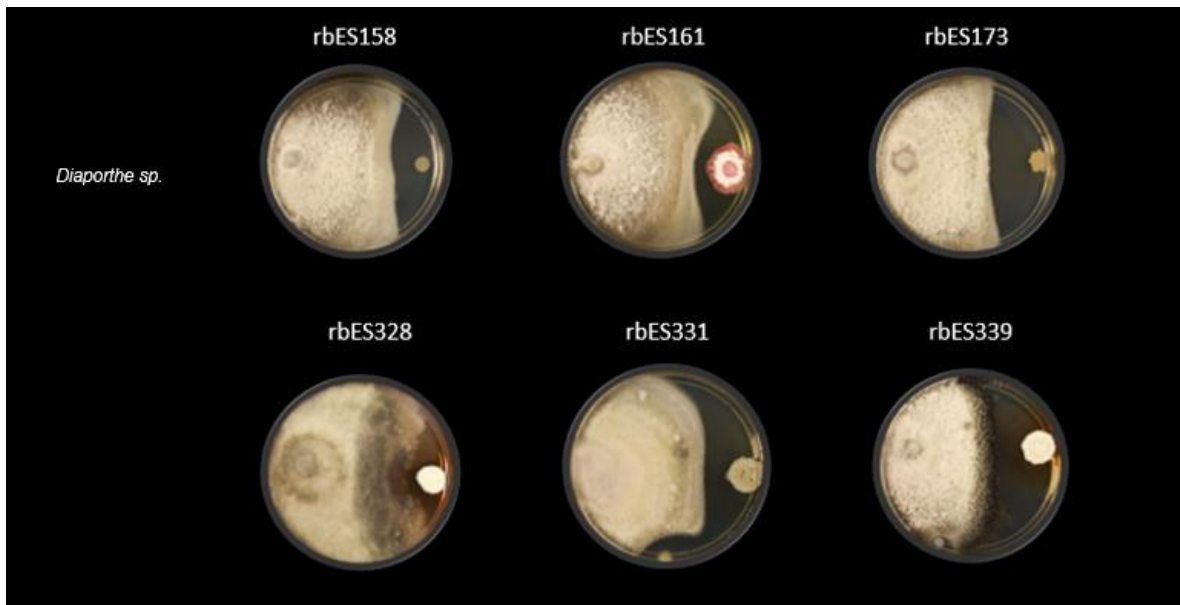


FIG.10. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *Diaporthe* sp.

En la confrontación de *N. parvum* contra las seis cepas de actinobacterias se observaron porcentajes interesantes de inhibición que van desde 13.95 hasta un 33.64% (Tabla 3). En la placa control de este hongo se observó abundante micelio aéreo gris claro. Mientras que con la interacción con las cepas de actinobacterias *N. parvum* mostró poca formación de micelio aéreo y la colonia plana. Contra las cepas rbES328, rbES331 y rbES339 el hongo mostró un crecimiento de micelio aéreo en una coloración más beige. También, es de interés señalar el cambio en las actinobacterias, como la pigmentación café que produjeron, y en el caso de la cepa rbES161 presentó una mayor colonización en el agar.

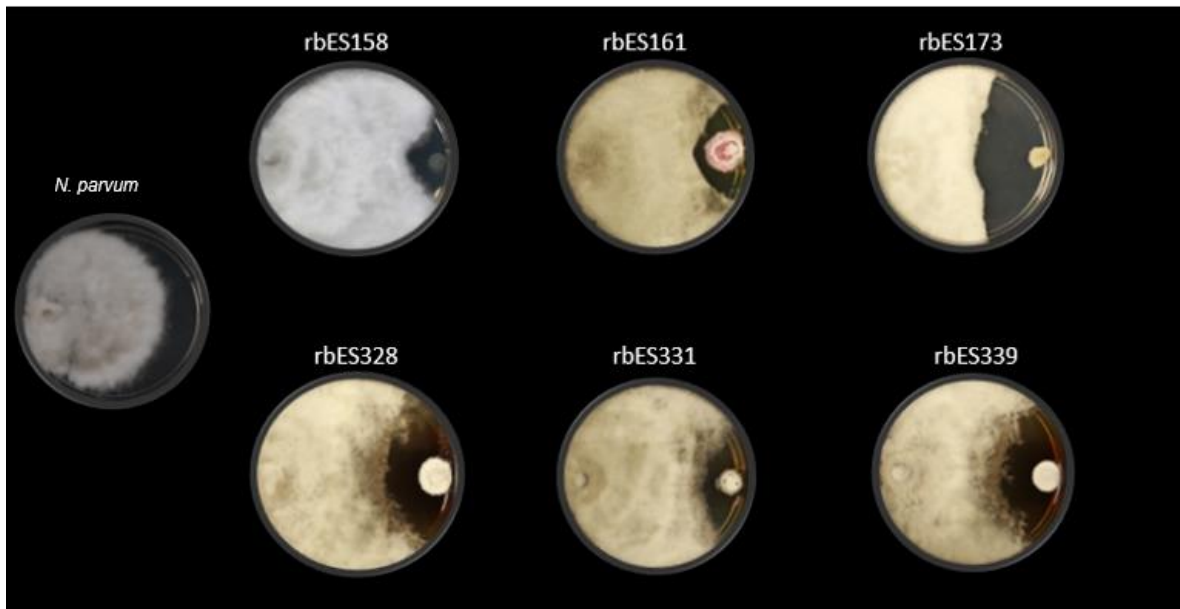


FIG.11. Evaluación de actividad antagónica de seis cepas de actinobacterias sobre *N. parvum*

En la figura 12 se observa que el crecimiento de *N. australe* en el control no es uniforme, lo cual es su forma de crecimiento habitual en PDA. La cepa que presentó menor porcentaje de inhibición fue la cepa rbES161 con un valor de 10.2% (Tabla 3). Por el contrario, la cepa con mayor porcentaje de inhibición fue la rbES173 la cual presenta un impacto inhibitorio de 45.74% (Tabla 3). Este hongo fitopatógeno al ser confrontado con las cepas de actinobacterias, presentó un crecimiento uniforme similar al control, pero con halos visibles que marcaban su desarrollo. En las actinobacterias también se observaron cambios en la pigmentación, un ejemplo es: la cepa rbES161 presentó un pigmento amarillo en el agar al redor de su sitio de inoculación y las cepas rbES328, rbES331 y rbES339, presentaron la pigmentación café.

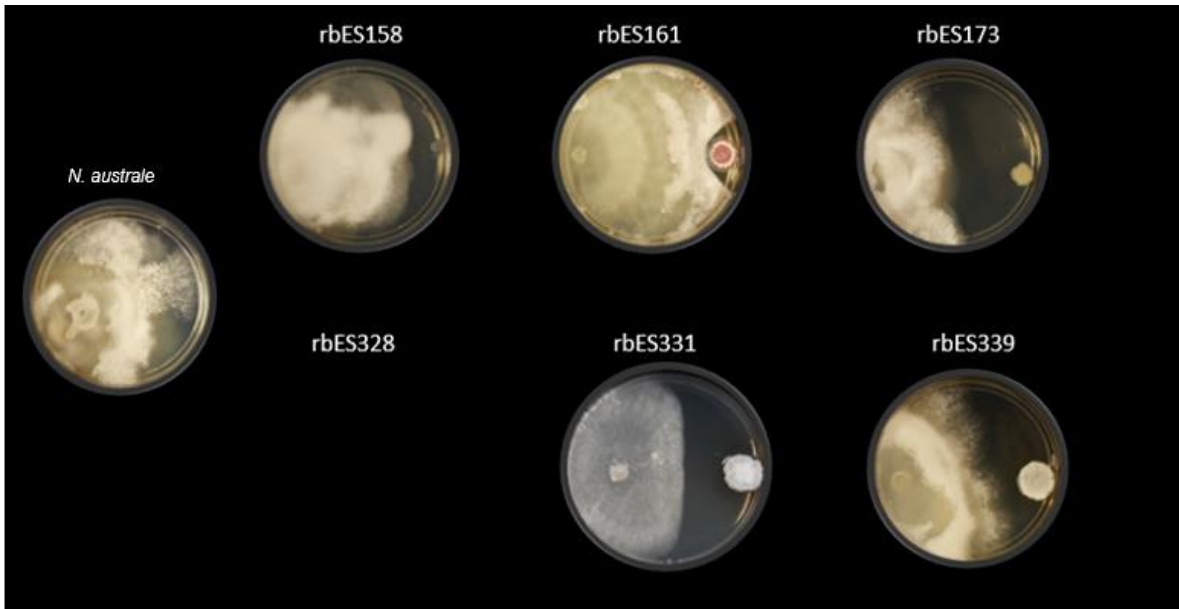


FIG.12. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *N. australe*.

En los ensayos duales contra el hongo fitopatogéno *N. luteum*, este patógeno se inoculó dos días antes que la actinobacteria. La confrontación con la cepa rbES161 tuvo como resultado un porcentaje de inhibición de 31.33% (Tabla 3) siendo la segunda cepa con mayor inhibición, mientras que la confrontación con la cepa rbES158 actúo con 15.85% de inhibición (Tabla 3), el aislado con el mayor efecto antagónico fue la cepa rbES331, presentando un valor de 39.20%. El desarrollo del micelio en el hongo crece de una manera plana y se marca claramente el límite del crecimiento. En la confrontación con la cepa rbES158, la actinobacteria mostró un claro halo de inhibición, sin q esporulación en comparación con las demás cepas, principalmente con el aislado rbES161.

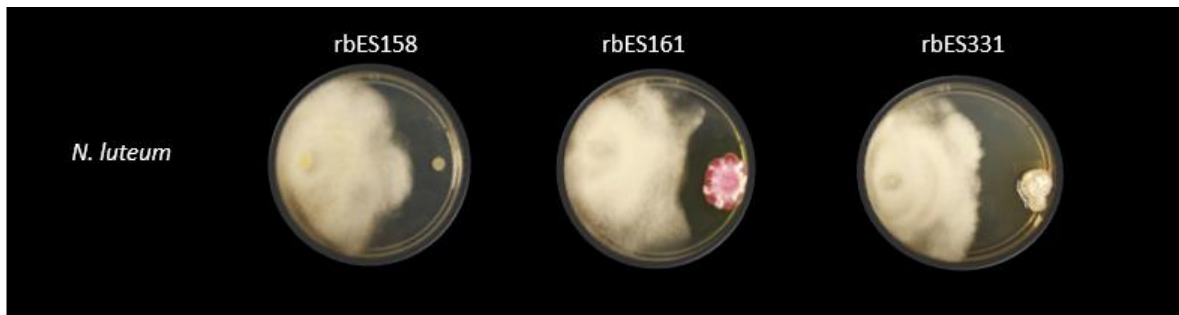


FIG.13. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *N. luteum*.

Al evaluar la actividad antagónica de las actinobacterias sobre *B. dothidea* (FIG.14) se observaron diferentes cambios, por ejemplo, la cepa rbES158 obtuvo el porcentaje de inhibición más bajo (10.97 %), además el hongo mostro una similitud en la morfología de la colonia con el control y es la cepa con un menor porcentaje de inhibición (Tabla 3). El mayor porcentaje de inhibición fue con la cepa rbES173 con un 19.28% (Tabla 3),

Las cepas rbES161, rbES328, rbES331 y rbES339 tuvieron porcentajes desde los 15.1% hasta 17.04%. El hongo fitopatógeno presentó cambios en el pigmento del micelio, pasando a un gris más oscuro conforme se acercaba a la actinobacteria. Las cepas de actinobacterias también presentaron cambios, como fue el caso del aislado rbES328 (FIG. 14) donde parece una clara de huevo, teniendo una esporulación amarilla en la parte de en medio y blanca alrededor de esta. La cepa rbES173 si bien no tuvo una gran esporulación como en el caso de la mayoría de las cepas, fue la que mejor porcentaje de inhibición presentó.

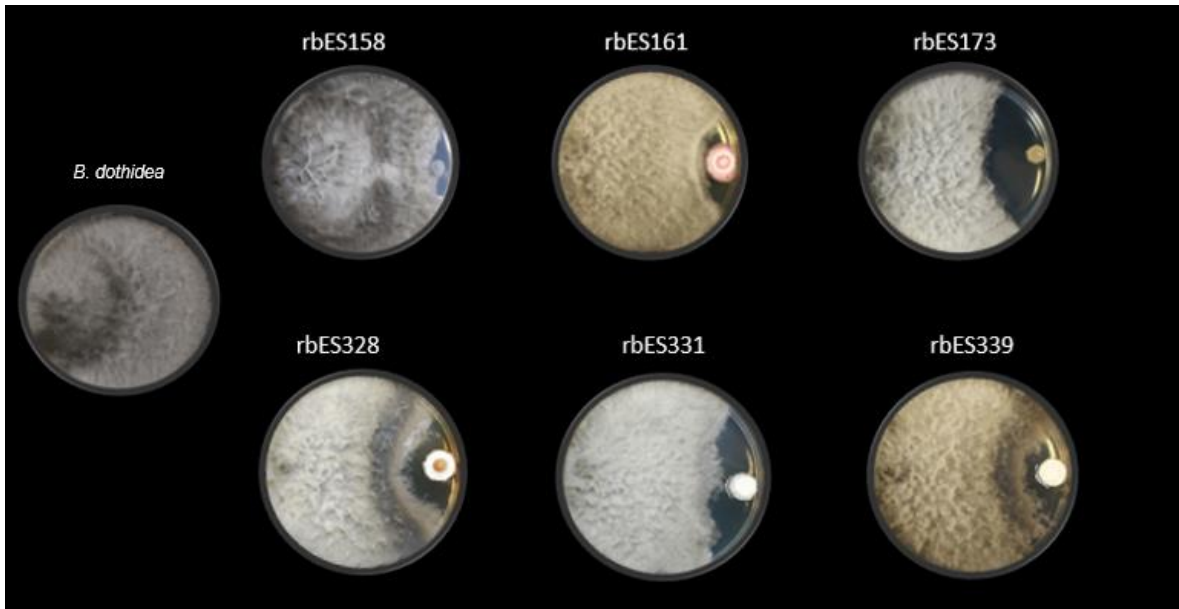


FIG.14.Evaluación de actividad antagónica de seis cepas de actinobacterias sobre *B. dothidea*

En la evaluación antagónica sobre *D. mutila*, el porcentaje con mayor inhibición fue la cepa rbES173 (43.33%, Tabla 3), seguido de un segundo mayor porcentaje de la cepa rbES328 (40.88, Tabla 3), pasando a un porcentaje menor de 28.50% por la cepa rbES158.

D. mutila (FIG. 15) presentó cambios morfológicos en la pigmentación del micelio con referencia a el control, un ejemplo claro es con la cepa rbES161 donde el color del micelio se presentó más oscuro, en un tono amarillo, que puede ser un reflejo del pigmento amarillo que produjo la cepa rbES161. Las cepas rbES173, rbES328, rbES331 y rbES339 tienen un crecimiento parecido al control, pero con un color del micelio en un gris claro por último la cepa rbES328 produjo un compuesto con un pigmento amarillo. Como anteriormente se muestra la cepa rbES328 presentó una esporulación en forma de clara de huevo, lo mismo que con el aislado rbES161, solo cambiando sus tonos de colores rosas y blanco.

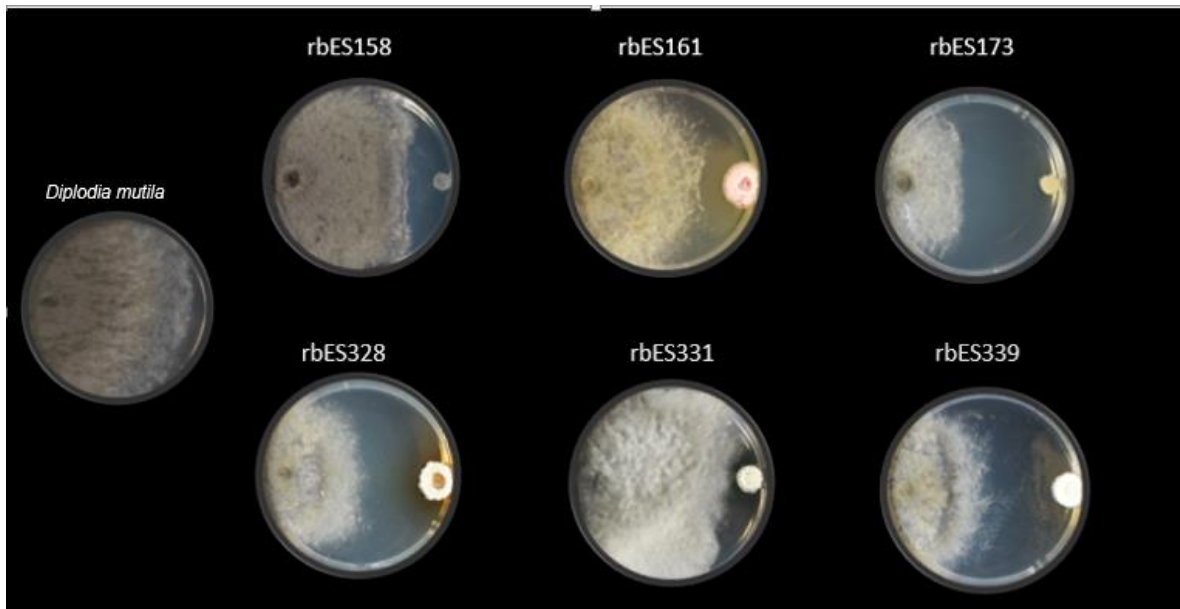


FIG.15. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *D. mutila*

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 normalmente no crece con un micelio aéreo, tiene un pigmento entre blanco o rosado y logra cubrir la placa de PDA después de 6 a 7 días de incubación (FIG. 16).

La contraposición con la cepa rbES173 es la de mayor efecto inhibitorio (31.23%, Tabla 3), la segunda cepa con mayor porcentaje de inhibición fue rbES158 con un 28.57%. Los aislados rbES328 y rbES339 actuaron con un porcentaje de inhibición del 25.28% y 17.45% respectivamente. El crecimiento del micelio en la contraposición con los aislados, se presentó de manera más rosado, en el caso de algunas cepas, de manera uniforme pero con las líneas marcadas, el micelio en la mayoría de los casos creció de manera extendida, abarcando los diferentes lados de la placa. Las cepas de actinobacteria produjeron un pigmento amarillo como en el caso de la rbES173 donde este pudo ser el causante de un mayor porcentaje inhibitorio. Todas las cepas lograron obtener una inhibición contra el fitopatógeno, de manera interesante la contra posición con la cepa rbES158, se notó un cambio en el pigmento del hongo fitopatógeno, con un rosa fuerte que es característico cuando está en condiciones de estrés.

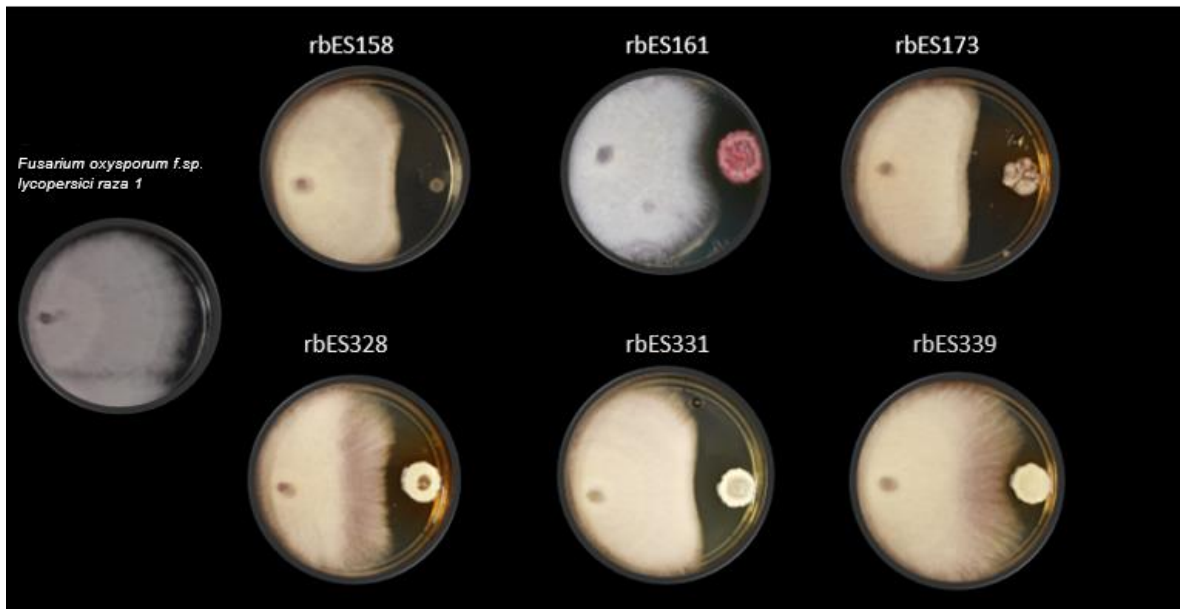


FIG.16. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 1

Los porcentajes de inhibición para la contraposición entre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 2 y los aislados de actinobacterias, fueron valores desde 35.53% a 49.52% (Tabla 3). El micelio del hongo fitopatógeno con la confrontación rbES339 creció de manera gruesa y con abundante micelio aéreo, mostrando un color naranja intenso y al final del crecimiento mostró una pigmentación café. En general se presentaron cambios en la pigmentación y el patrón de colores en este aislado fúngico (FIG. 17). Con otro aislado el hongo fitopatógeno mostró un crecimiento similar que, con *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* la raza1, el micelio se nota más alargado y con un crecimiento uniforme. Los aislados de actinobacterias también presentaron pigmentos diferentes a su esporulación.

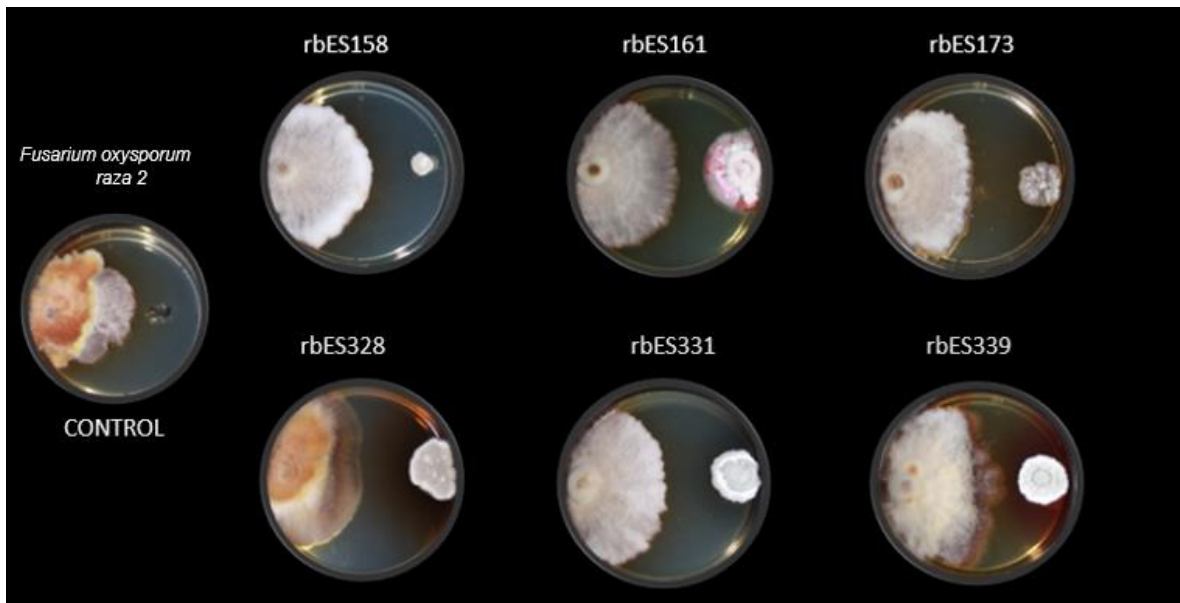


FIG.17. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 2.

Fusarium solani fue inhibido desde un valor de 17.36 a 27.16%. El fitopatógeno en contraposición con la cepa de mayor inhibición rbES328 presentó cambios morfológicos, como: un menor crecimiento hacía el frente, el micelio tiene una leve separación del micelio inicial, así como un color blanco sin más cambios en su pigmentación. También con los aislados rbES158 y rbES161, rbES173, rbES339 se observa que el fitopatógeno creció de manera uniforme y en un solo color, hasta que tuvo un acercamiento con los aislados de actinobacterias, la pigmentación del micelio cambio a un color negro. La cepa rbES339 mostró una esporulación demasiado avanzada, en el caso de algunas cepas, produjeron algún pigmento que cambio el color del agar alrededor de estas.

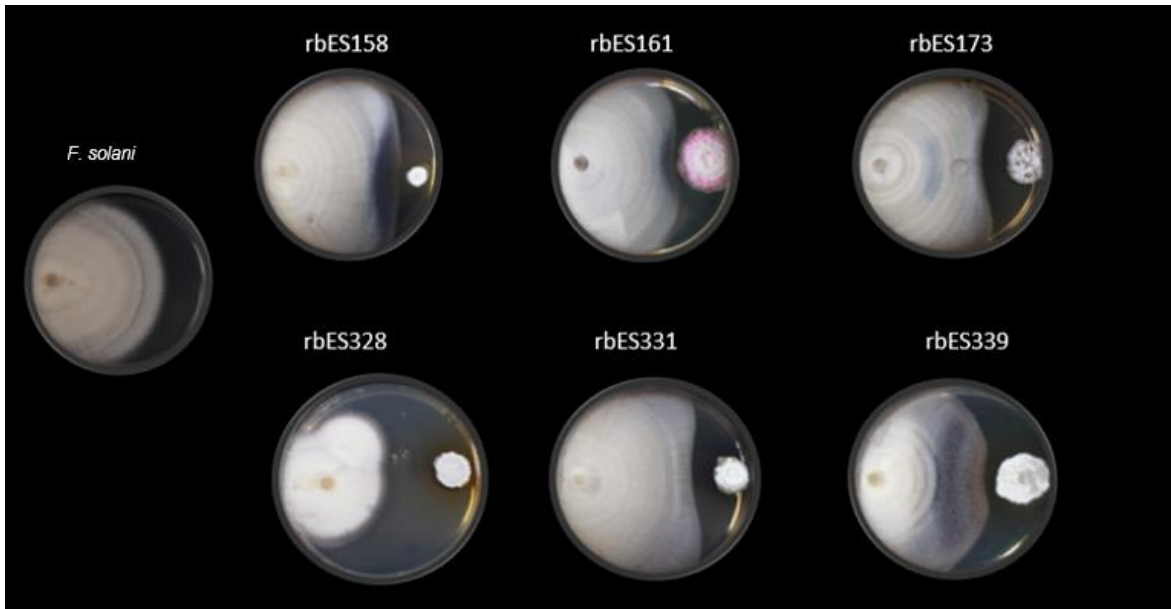


FIG.18. Evaluación de actividad antagonica de seis cepas de actinobacterias sobre *Fusarium solani*.

El aislado del hongo fitopatógeno *Alternaria* sp. logró ser inhibido con diversos valores, empezando por el valor de la cepa rbES158 con un porcentaje de 38.98% (Tabla 3), otro de los notables porcentajes son las cepas rbES339 con un valor de 36.23%, rbES331 con un porcentaje de inhibición de 41.39% (Tabla 3) y el porcentaje más destacado de la cepa rbES173 (48.72%, Tabla 3). En algunas contraposiciones el fitopatógeno creció de manera muy similar al control en el color, con un crecimiento del micelio uniforme y menor. En algunos casos la cepa creció uniforme, en el centro tiene una coloración gris y en las orillas con una coloración de un tono más intenso, marcando una diferencia clara entre el micelio de los primeros días de crecimiento y el micelio nuevo (FIG. 19). La particularidad por ejemplo con la cepa rbES331, fueron cambios en la pigmentación del micelio, a colores entre blancos, grises claros y oscuros. Con respecto a las cepas de actinobacterias la cepa rbES331 creó un compuesto de color negro alrededor de la misma e irradiando hacia el hongo fitopatógeno, al igual la cepa rbES339 tiene una pigmentación que café que irradia hacia los lados y hacía el hongo, abarcando todo alrededor. De manera interesante la cepa rbES158 presentó esporulación a diferencia de las otras contraposiciones con otros fitopatógenos, de igual manera el aislado rbES173 presentó una gran esporulación.

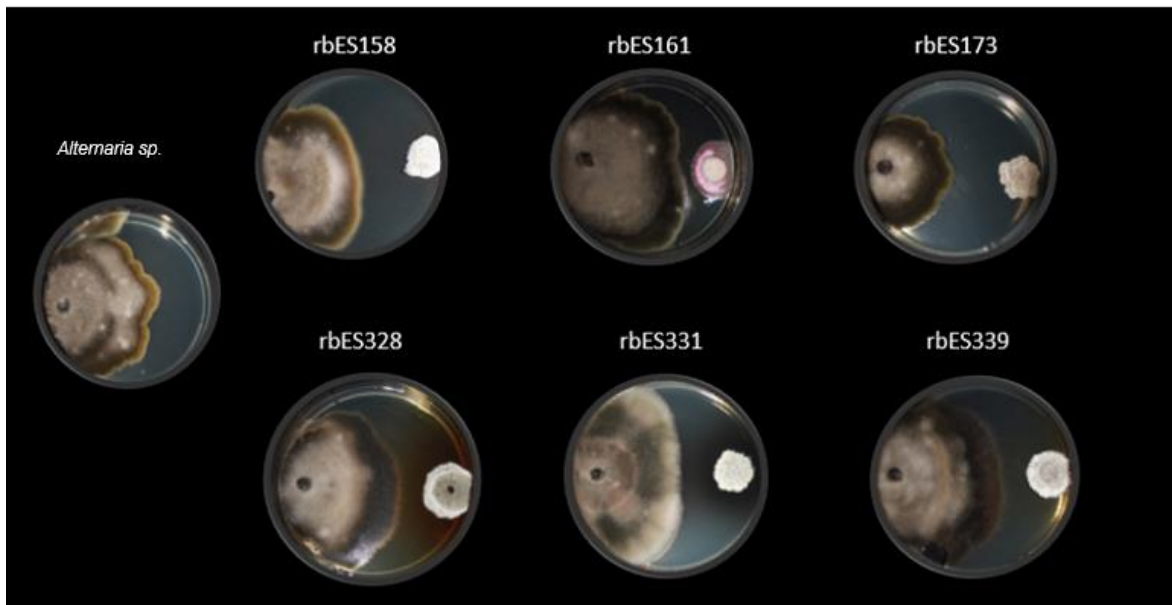


FIG.19. Evaluación de actividad antagonística de seis cepas de actinobacterias sobre *Alternaria sp.*

Tabla 3. Evaluación del efecto antagonístico de actinobacterias sobre hongos fitopatógenos en ensayos duales.

Actinobacteria	Porcentaje de inhibición en ensayos duales											
	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. gilanensis</i>	<i>Diaporthe sp</i>	<i>N. parvum</i>	<i>N. australe</i>	<i>B. dothidea</i>	<i>D. mutila</i>	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici raza 1</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>N. luteum</i>	<i>F. oxysporum f.sp. lycopersici raza 2</i>	<i>F. solani</i>
rbES158	21.39	25.75	26.46	15.85	14.3	10.97	28.5	28.57	38.98	15.85	43.35	17.37
rbES161	12	12.3	35.6	13.95	10.2	16.3	38.98	21.41	30.2	31.3	35.53	17.36
rbES173	21.59	23.5	37.1	33.64	45.74	19.28	43.33	31.23	48.72	0	42.9	20.13
rbES328	20.22	41.25	24.37	32.42	28.57	17.04	40.38	25.28	34.49	0	39.88	27.16
rbES331	26.57	11.11	38.5	22.84	42.2	15.1	13.85	26.99	41.39	39.2	49.52	21.2
rbES 339	31.33	36.35	39.3	22.25	37.86	16.28	42.34	17.45	36.23	16.55	39.04	21.34

7.3 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS

El efecto de los compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias fue evaluado sobre solo cuatro de las cepas de hongos previamente evaluados (*L. brasiliensis*, *N. parvum*, FOL raza 1 y *Alternaria* sp.). En este ensayo los mayores efectos de inhibición se observaron al realizar la evaluación sobre *Alternaria* sp. y el menor sobre *N. parvum*.

En la evaluación de las actinobacterias sobre *L. brasiliensis* se obtuvieron porcentajes de inhibición que van desde un 17.38 hasta un 29.21 %, siendo el aislado rbES331 el que obtuvo valor más alto (FIG. 20). En este ensayo se observaron cambios en la morfología de la colonia del hongo cuando estuvo en interacción con las diferentes actinobacteria. En la placa control *L. brasiliensis* presentó micelio aéreo abundante y uniforme en color gris claro; sin embargo, cuando está en interacción con las diferentes actinobacterias se observó que la colonia muestra un micelio color blanquecino o rosa, un poco ramificado y poco micelio aéreo.

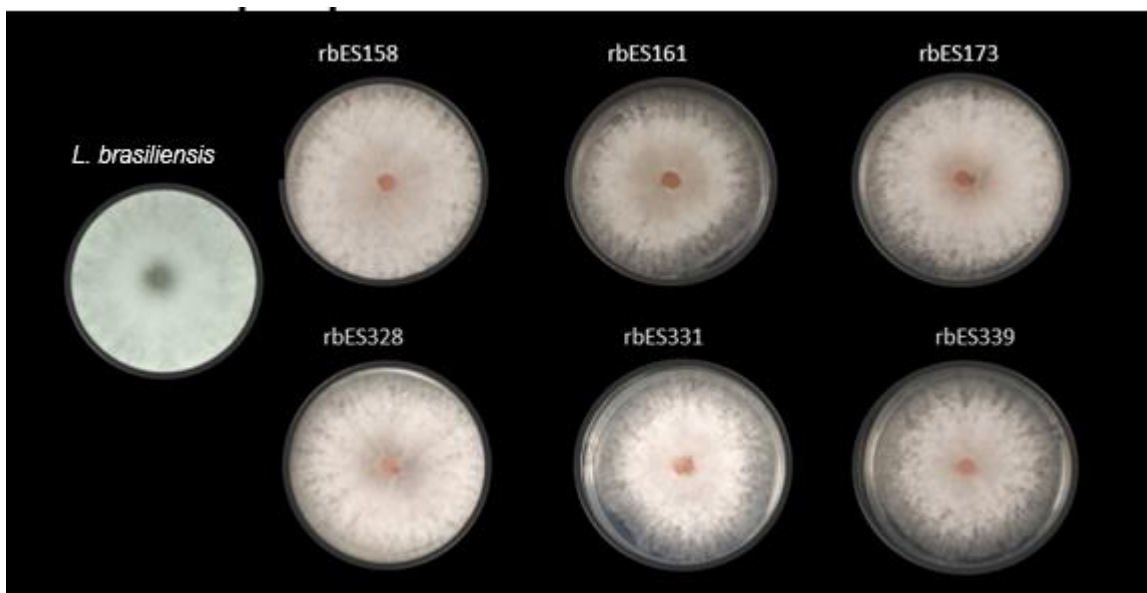


FIG.20. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *L. brasiliensis*.

En la contraposición de *N. parvum* (FIG. 21) con las diferentes cepas de actinobacterias se obtuvieron porcentajes de inhibición que van desde 19.01% (Tabla 4) por parte del aislado rbES328, mientras que el porcentaje de inhibición del aislado rbES331 tuvo un valor de 20.58% (Tabla 4) y la cepa rbES339 un porcentaje de inhibición de 22.54%. Con un valor inhibitorio de 23.52%, la cepa rbES161 fue la que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. El hongo *N. parvum*, mostró diferentes cambios morfológicos al exponerse a diferentes cepas, en algunos casos, el micelio muestra un crecimiento homogéneo y después va cambiando su morfología, presentando un desarrollo disperso. Con la cepa rbES161, el micelio creció disperso y sin abundancia, tuvo una expansión inclinada hacía un lado de la placa, este aislado tuvo el mayor porcentaje de inhibición (23.52%, Tabla 4). En la cepa rbES173 el desarrollo del micelio es abundante en un principio, se nota un cambio en el pigmento, un blanco más fuerte y también se ven los aros de crecimiento. Por otro lado el aislado rbES328 mostró un menor efecto antagónico con un porcentaje de 19.01% (Tabla 4) y el micelio del hongo no muestra crecimiento de manera abundante por lo tanto el color blanco no es tan fuerte. Se puede observar que la pigmentación del micelio de *N. parvum* (FIG. 21), cuando se contrapone con el aislado de actinobacteria rbES331 torna una tonalidad amarilla, a comparación de las otras contraposiciones. Adicionalmente el micelio creció de forma abundante y aérea, de una forma desigual, dejando espacios. La cepa rbES339 provocó cambios morfológicos más notorios en el fitopatógeno, que se observan con un micelio creciendo de manera discontinua, con menos volumen y en algunas zonas de manera aérea.

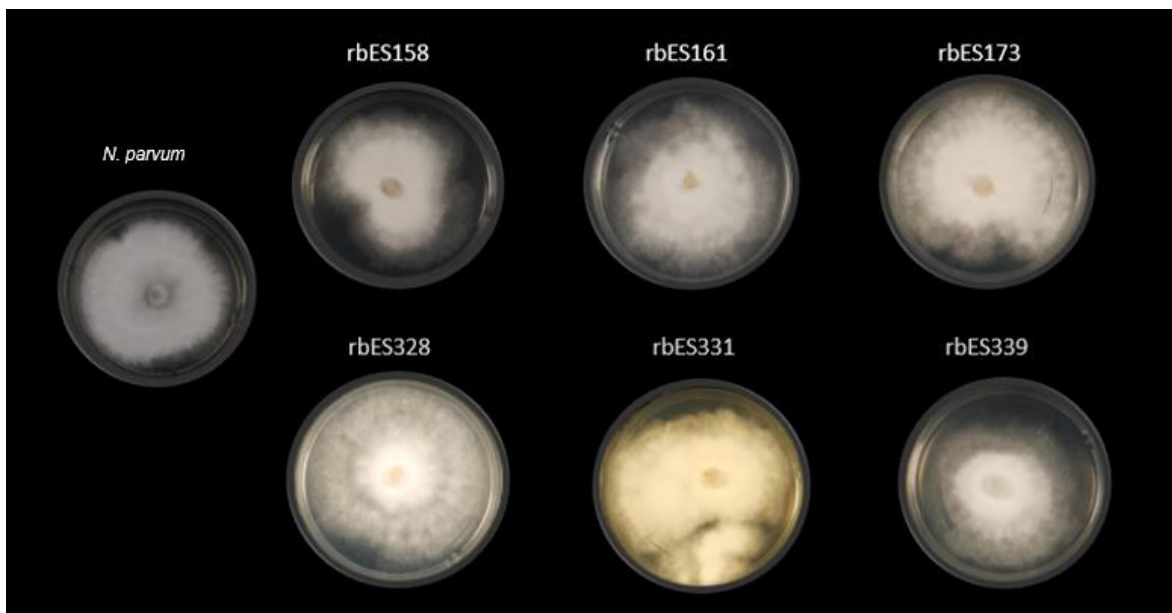


FIG.21.Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *N. parvum*.

En la evaluación de los compuestos volátiles producidos por las seis cepas de actinobacterias contra *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* raza 1 se obtuvieron porcentajes de inhibición desde 15.19% hasta 50.25%, siendo la cepa rbES328 la que mostró mayor efecto antagónico. Y las cepa rbES173 y rbES331 las que mostraron el menor (FIG. 22) .

En general se observó que los compuestos producidos por las actinobacterias causaron cambios como menor crecimiento de la colonia, poca producción de micelio aéreo, así como cambios en la coloración de la colonia de blanco a morado.

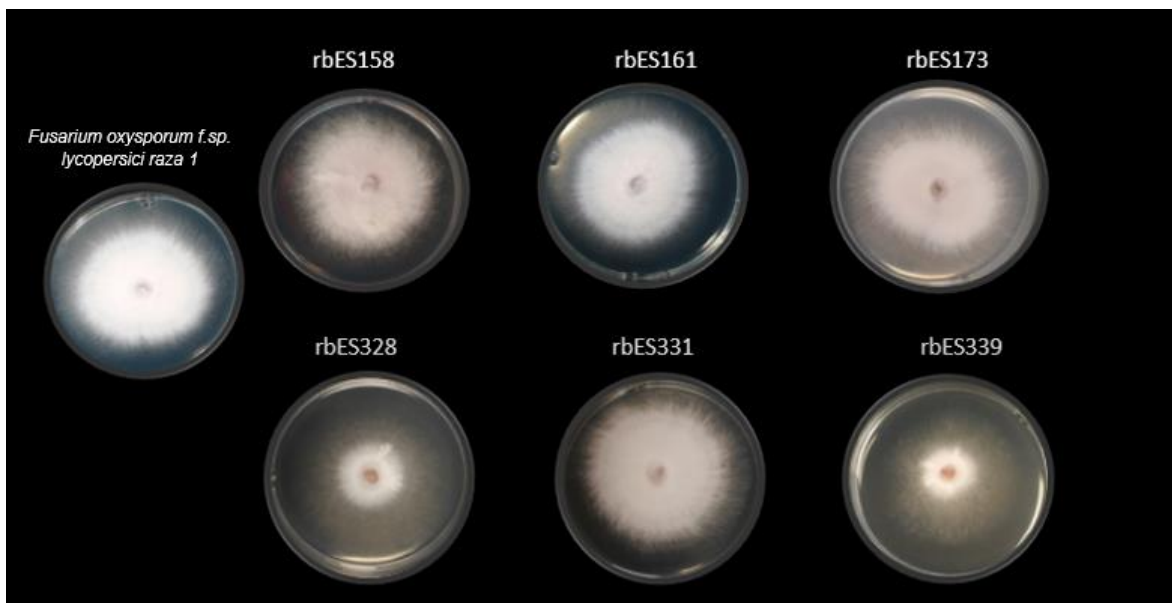


FIG.22.Resultados de inhibición antagonística por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 1.

Como se mencionó anteriormente, *Alternaria* sp. (FIG. 23) es una cepa de hongo que crece lento y donde los cambios principales en las confrontaciones son morfológicos como en caso de las cepas rbES158, rbES161 y rbES331, con porcentajes de inhibición antagonística de 23.01%, 21.61% y 36.66% (Tabla 4) respectivamente, siendo el valor de rbES161 el más bajo. El valor inhibitorio más alto fue obtenido por la cepa rbES339 (54.16%, Tabla 4). La cepa de hongo normalmente tiene una coloración café y se puede notar el desarrollo del micelio en halos de pigmento café, pero en algunas contraposiciones con los aislados de actinobacteria, no se nota una coloración café en el centro, es un pigmento de color pálido, de crecimiento cerrado. En el caso de la confrontación con la cepa rbES328 el hongo creció de manera homogénea, con una pigmentación distinta en cada halo de crecimiento, el halo final no tiene una pigmentación de tonos fuertes distinguibles como los demás, el micelio se nota disperso, pero en desarrollo uniforme. El cambio morfológico en el hongo fitopatógeno, con la cepa rbES339 es la más notoria, el hongo creció de un tono pálido, pero se nota la pigmentación por la cantidad de micelio, pero después el micelio es de menos volumen y sin un tono fuerte de pigmentación.

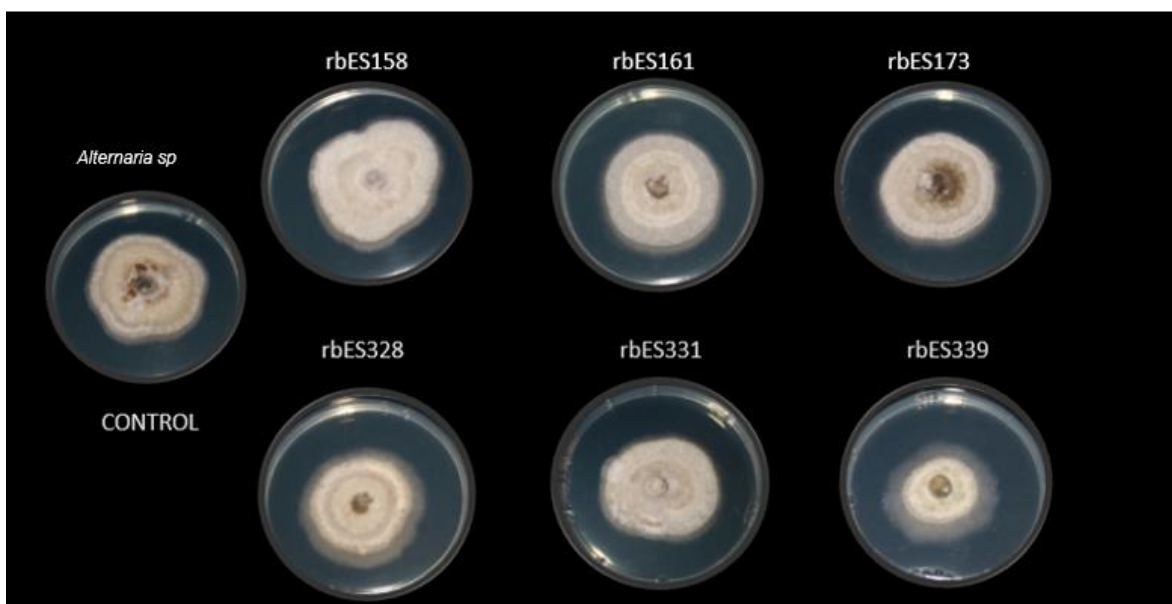


FIG.23. Resultados de inhibición antagonística por efecto de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *Alternaria* sp.

Tabla 4. Efecto antagonístico de compuestos volátiles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre cuatro cepas de hongos fitopatógenos

Actinobacteria	Porcentaje de inhibición en ensayos de compuestos volátiles			
	<i>L. brasiliensis</i>	<i>N. parvum</i>	<i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 1	<i>Alternaria</i> sp
rbES158	20.89	22.15	20.83	23.05
rbES161	27.83	23.52	17.92	21.66
rbES173	21.56	20.17	17.85	37.56
rbES328	17.38	19.01	50.25	39.43
rbES331	29.21	20.58	15.19	36.66
rbES 339	28.42	22.54	25.41	54.16

7.4 EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN ANTAGÓNICA DE COMPUESTOS DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS POR ACTINOBACTERIAS

Se observó y se cuantificó el efecto antagonico por compuestos solubles producido por seis cepas de actinobacterias sobre cinco hongos fitopatógenos (*L. brasiliensis*, *N. parvum*, *FOL raza 1*, *F. solani* y *Alternaria* sp.). En la evaluación de este ensayo con *L. brasiliensis*, las actinobacterias obtuvieron efectos inhibitorios de 27.7% a 44.06% siendo el valor más alto obtenido por la cepa rbES161. En las interacciones con las cepas rbES173 y rbES328 se obtuvieron un porcentaje de inhibición ente 29.37% y 28.83% (Tabla 5). En general se observaron cambios en la morfología de *L. brasiliensis*, que incluyen cambios en la coloración del micelio que van de un color café claro a café oscuro, observado por la exposición a los compuestos producidos por la cepa rbES158, poca formación de micelio aéreo y la producción de un compuesto rosa en el centro de colonia.

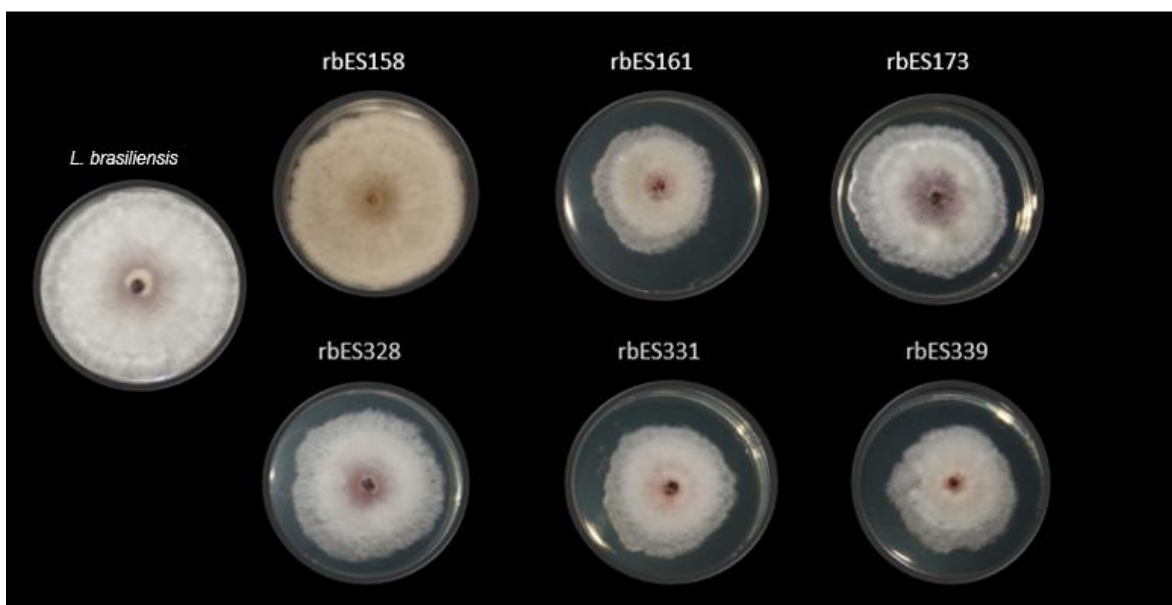


FIG.24. Resultados de inhibición antagonica por efecto de compuestos de sobrenadantes producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *L.brasiliensis*.

La evaluación de los compuestos solubles producidos por las actinobacteria sobre el hongo *N. parvum* (FIG. 25), mostró que las seis cepas de actinobacterias obtuvieron porcentajes de inhibición desde un 21.79% hasta un 63.32%, siendo el aislado rbES173 el que obtuvo la inhibición más alta. La exposición a los compuestos solubles causaron cambios en la morfología de la colonia del hongo como: formación de micelio aéreo poco uniforme cerca del disco micelial inoculado.

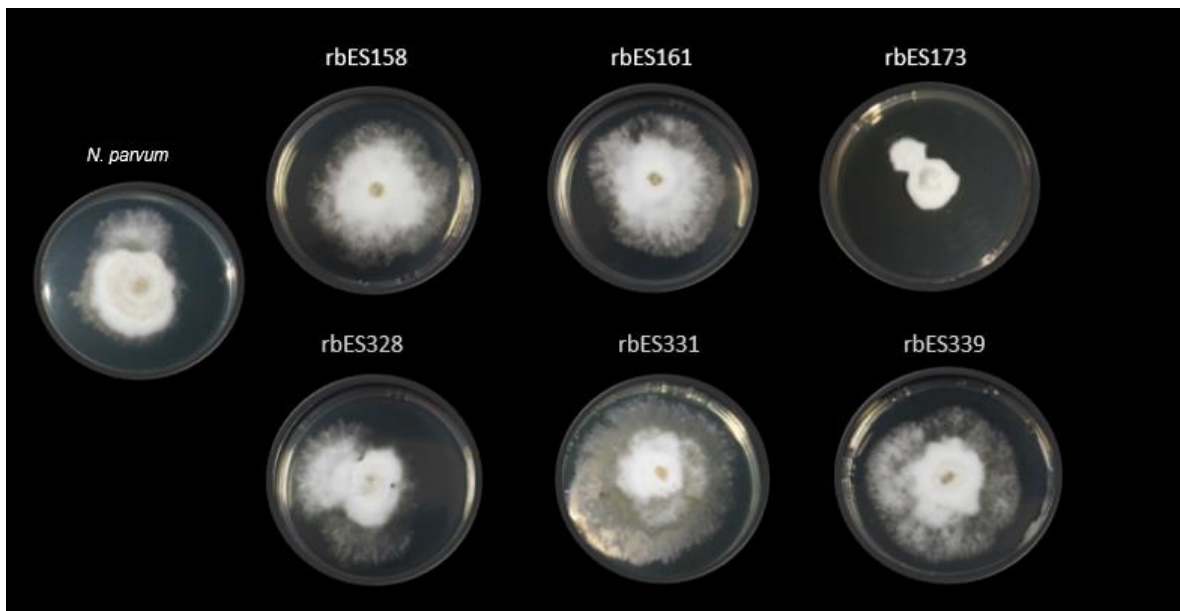


FIG.25. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos solubles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *N. parvum*.

En el caso de de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 (FIG. 26), la exposición a los compuestos solubles de las cepas de actinobacterias tuvo un efecto antagónico con porcentajes de inhibición que van desde 15.91% hasta 22.61 %, obtenidos por los aislados rbES161 y rbES158 (Tabla 5). En la morfología de este hongo no se observaron cambios importantes; sin embargo, la colonia mostró un crecimiento poco uniforme, y no cuenta con un crecimiento circular, además el final de la colonia es ramificada.

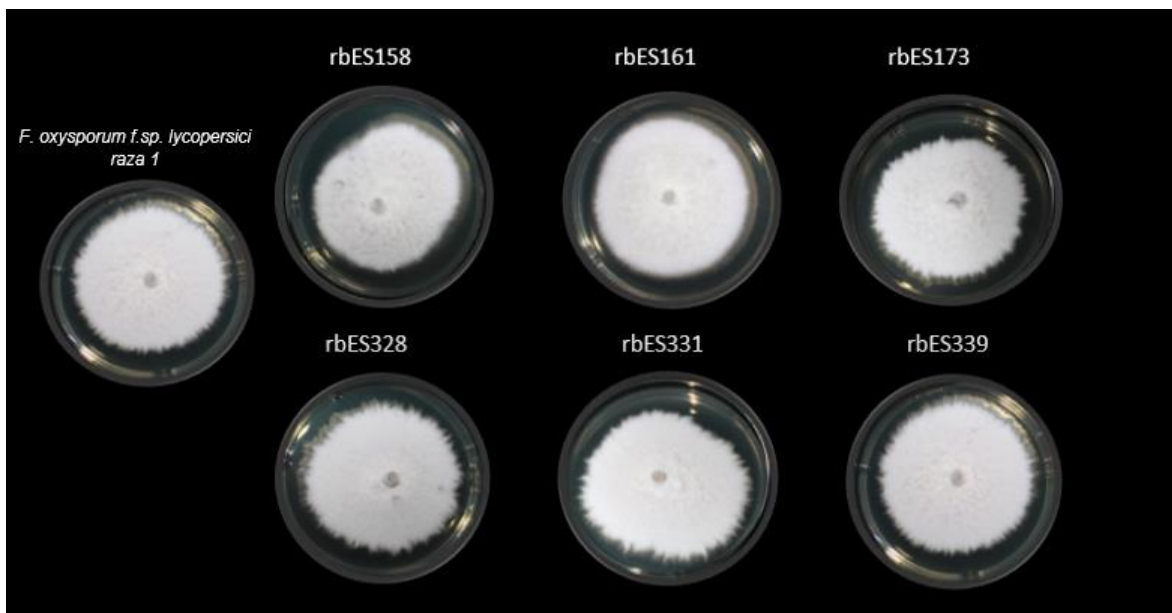


FIG.26. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos de solubles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1.

La exposición de los compuestos solubles producidos por actinobacterias sobre *F. solani* (FIG. 27), generaron una inhibición del crecimiento del hongo desde un 18.32% a 37.61%, siendo la cepa rbES173 la que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. El efecto de los compuestos producidos por las cepas de actinobacterias generaron cambios en la morfología de la colonia que se observaron como poco crecimiento, además causaron pigmentación del micelio. Por ejemplo la cepa rbES158 causó un cambio en la pigmentación de la colonia que tomó un color amarillo. Por otro lado, los compuestos de la cepa rbES173 generaron un cambio en el color de la colonia a un tono rosa claro.

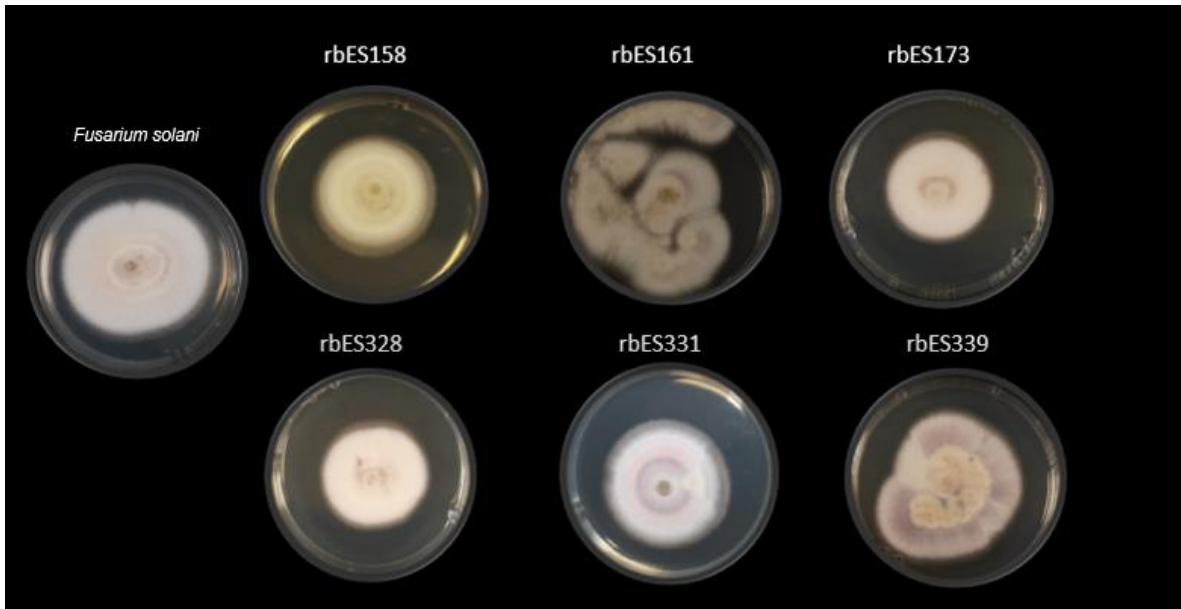


FIG.27. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos solubles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *F. solani*.

Sobre *Alternaria* sp. los compuestos solubles producidos por las seis cepas de bacterias evaluadas lograron porcentajes de inhibición que van desde 14.12% hasta 23.33%, siendo la cepa rbES16 la que obtuvo el valor más alto. En cuanto al crecimiento del fitopatógeno con la interacción de los compuestos producidos por las cepas rbES158 y rbES331, presentó ligeramente un menor crecimiento, el cual fue uniforme y además mostró una pigmentación en colores verdes. Contra el resto de las cepas el crecimiento del micelio es similar a la placa control.

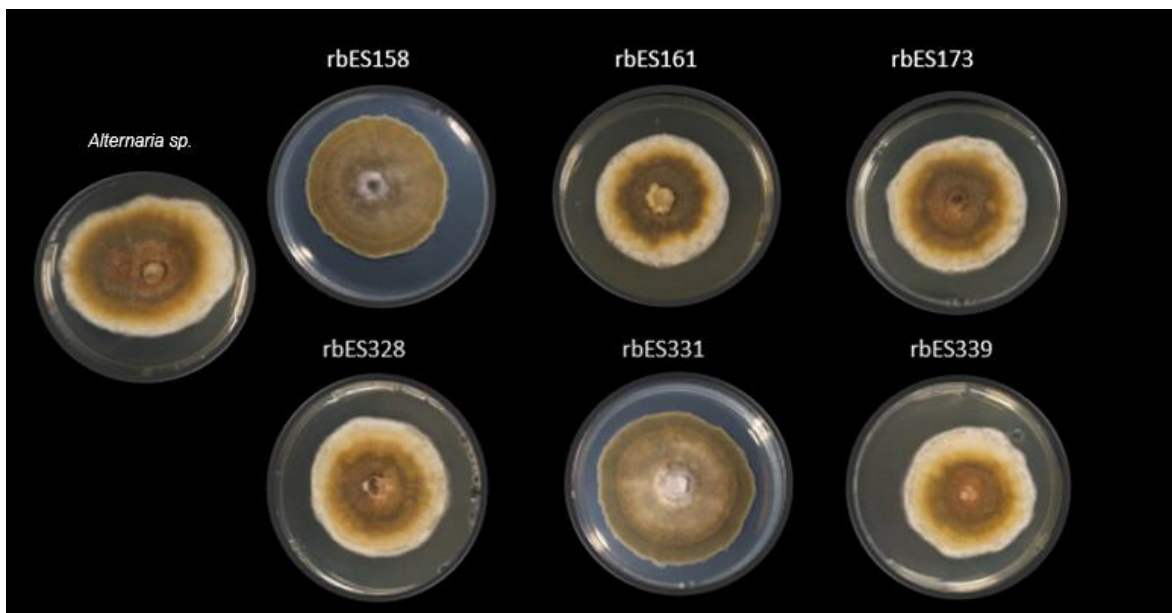


FIG.28. Resultados de inhibición antagónica por efecto de compuestos de solubles producidos por seis cepas de actinobacterias sobre *Alternaria* sp.

Tabla 5. Resultados del porcentaje de inhibición de los compuestos de sobrenadantes de las seis cepas de actinobacterias.

Actinobacteria	Porcentaje de inhibición en ensayos de compuestos solubles				
	<i>L. brasiliensis</i>	<i>N. parvum</i>	<i>F. oxysporum lycopersici</i> raza 1	<i>Alternaria</i> sp	<i>F. solani</i>
rbES158	27.7	37.08	22.61	22.77	35.27
rbES161	44.06	41.06	15.91	23.33	18.32
rbES173	29.37	63.32	17.12	17.61	37.61
rbES328	28.83	44.28	15.31	14.12	33.61
rbES331	34.79	21.79	17.08	19.44	37.22
rbES 339	39.79	40.37	15.31	22.14	20.67

8. DISCUSIÓN

La hipótesis del presente trabajo plantea que la actividad de los metabolitos secundarios de las actinobacterias, presentan una actividad antifúngica diferente para cada hongo fitopatógeno; lo cual tomando en cuenta los resultados podemos concluir que es una hipótesis verdadera. Las 6 actinobacterias evaluadas presentaron actividad antifúngica contra alguno de los 12 hongos fitopatógenos que fueron seleccionados.

En los ensayos duales el experimento se realizó con los 12 hongos fitopatógenos, para así tener una visibilidad amplia del efecto antagónico que fue fácilmente esquematizado con unas tablas en formato condicional en un degradado de color. Se procuró una diversidad entre los hongos fitopatógenos, ya que algunos afectan el suelo, otros afectan directamente el tronco, las hojas y frutos de las plantas. Después de esos primeros resultados, reducimos los experimentos volátiles, a cuatro hongos fitopatógenos, *L. brasiliensis*, *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 , *N. parvum* y *Alternaria* sp. , una de las razones por la cual lo redujimos a estas cepas, es por el rápido crecimiento en el caso de *L. brasiliensis*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 y por el comportamiento en su desarrollo en el caso de *Alternaria* sp. y *N. parvum*, que aunque presentan un desarrollo lento, se puede observar claramente los efectos fenotípicos que tienen las cepas de actinobacterias sobre el fitopatógeno. *L. brasiliensis* y *N. parvum* son hongos de la madera mientras que *Alternaria* sp. y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1, son hongos del suelo.

En su comportamiento es importante señalar que los hongos muestran aros de crecimiento marcados y patrones en sus colores que sirvieron de referencia para determinar si hay algún cambio debido a los metabolitos secundarios producidos por las actinobacterias. Un ejemplo es el color del micelio que presenta *L. brasiliensis* entre gris claro y oscuro, con un micelio abundante que crece hacia todos los extremos y forma micelio aéreo también. Estas diferencias claras que se

presentan con las 6 diferentes actinobacterias, en donde se observa incluso el cambio en la cantidad de micelio y la tonalidad del color del mismo.

En los ensayos duales se pudo observar que las actinobacterias producían compuestos que cambiaban el color del hongo fitopatógeno y también el del agar, como en el caso de la cepa rbES173, que presentó un compuesto que cambio el agar a un color rosado en la confrontación con los fitopatógenos *L. brasiliensis* y *L. gilanensis*. Las cepas rbES328 y rbES339 en la mayoría de las confrontaciones con los hongos fitopatógenos, presentaron una pigmentación en el agar de color café oscuro, mientras que las cepas rbES161 y rbES331, mostraron en ocasiones pigmentación de color amarillo mostaza. La cepa rbES173 tuvo un mejor efecto en los ensayos duales con tres de las cuatro y cinco cepas que fueron evaluadas en los ensayos de compuestos volátiles y de sobrenadantes, pero no fueron sobresalientes sus efectos inhibitorios en los ensayos de compuestos volátiles. Como un dato interesante, el aislado rbES173 es de las cepas que presenta menor esporulación, mientras que con los hongos que inhibió no esporuló de manera abundante en donde se observó una gran esporulación fue en la confrontación con *F.solani*, pero no fue donde se observó su porcentaje de inhibición mayor. Este se obtuvo en el ensayo de compuestos solubles, donde tuvo el mayor porcentaje de inhibición para este hongo fitopatógeno, lo que nos manifiesta que la esporulación en esta cepa no está acompañada de la síntesis de productos secundarios inhibitorios tan efectivos.

Otro resultado interesante, es el de cepa rbES158, la cual no esporula a comparación de las demás cepas, pero en todas tiene un efecto inhibitorio. Sin embargo, en la confrontación *Alternaria* sp., esta cepa y todas las demás presentaron una gran esporulación, la mayoría en tonos grises, excepto la cepa rbES161 que siempre se caracteriza por su color rosado. La cepa rbES158, la cual es de las mejores en los ensayos duales, pero en los ensayos de compuestos volátiles y difusibles no logra tener un gran efecto sobre los hongos fitopatógenos.

Interesantemente, en los ensayos de compuestos volátiles la cepa rbES339 presentó uno de los mejores porcentajes de inhibición en la mayoría de los hongos . Se ve claramente el cambio morfológico del hongo, totalmente diferente a las interacciones duales, esta vez el hongo fitopatógeno crece delgado, no aéreo y disperso. Esto en comparación en los ensayos duales, donde aunque se observó una gran esporulación no fue una de las mejores cepas en presentar un efecto inhibitorio.

Otro fenómeno que llamó nuestra atención fueron los cambios que presentan las cepas rbES328 y rbES339 en los ensayos para determinar la producción de compuestos volátiles, donde se observa que estas cepas tienen un cambio en su coloración y esporulación, cuando se enfrentan contra los hongos en estos ensayos. Si su esporulación se presenta de un color mostaza oscuro, el porcentaje de inhibición es menor a cuando su esporulación presenta una menor pigmentación. También se presenta una esporulación en la cepa rbES173 al confrontarse con *Alternaria* sp.

Realizando estas comparaciones no quiere decir que no se hayan presentado cambios inhibitorios, solo se argumenta que en cada ensayo, se presentan interacciones, a diferente escala, que activan la síntesis de diferentes compuestos y por lo tanto se revelan diferentes escenarios inhibitorios. En general las cepas en la interacción con los compuestos de ensayos volátiles presentan cambios, en su pigmentación o esporulación, esta variabilidad morfológica no se presenta en los ensayos duales donde las cepas de actinobacterias de alguna manera están influenciadas directamente por la presencia del hongo fitopatógeno. Y en los ensayos de sobrenadantes, la actinobacteria crece sin ninguna influencia del fitopatógeno, por lo que se observa el cambio del hongo al contacto con algunos compuestos que se sintetizan por producto de la esporulación. De aquí también se argumenta que no toda la producción de compuestos volátiles está ligada a la esporulación y los compuestos que podrán ligarse a esta, reaccionan bajo condiciones diferentes y con hongos fitopatógenos diferentes.

Por otro lado, también logramos identificar efectos particulares para algunos hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se puede observar que el crecimiento en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 en los ensayos volátiles no mostró un micelio abundante ni una forma de crecimiento uniforme. Esto podría explicarse porqué en estos ensayos se presenta un mejor efecto sobre el hongo fitopatógeno, en comparación con efectos sobre el mismo, en ensayos duales y de compuestos solubles. Esto puede deberse a que, aunque existen compuestos volátiles en los ensayos duales, están en menor proporción y no se concentran como en el sistema de doble placa, alternativamente se podría hipotetizar que el hongo puede sentir (percibir) los compuestos difusibles de forma rápida en los ensayos duales, ya que se inocularon en la misma placa, con unos centímetros de distancia y así el hongo fitopatógeno activa su mecanismo de defensa.

Otro efecto muy marcado entre los resultados obtenidos de la evaluación de la producción de compuestos de solubles y volátiles es el que se presenta en la cepa de hongo *Alternaria* sp. donde se observa que en los compuestos volátiles mantiene una menor pigmentación y un crecimiento menos abundante. Sin embargo, en los compuestos de ensayos con sobrenadante, la pigmentación es de un color verde intenso y los bordes de crecimiento son diferentes. Además, se pudo observar que el crecimiento en ensayos duales duró 7 días, mientras que en los ensayos de sobrenadante fue un crecimiento de 5 días donde se cubrió la placa.

Todo lo anterior nos deja con preguntas para futuras investigaciones, donde se pueda seguir evaluando los efectos de los compuestos que se sintetizan bajo diferentes condiciones. Hasta qué punto la actinobacteria puede percibir la presencia del hongo y si esta reaccionaría igual si aparte de la presencia del fitopatógeno, están las semillas, como en el caso de las cepas rbES158 y rbES331, en el experimento de Delgado-Ramírez et al., (2019) donde estas cepas mostraron efectos herbicidas sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicon*) en pruebas de invernadero. Inicialmente se podrían hacer pruebas *in vitro*, con la presencia del hongo fitopatógeno y semillas, para determinar el comportamiento herbicida de las

cepas por su efecto en la germinación y el desarrollo de las plantas, y posteriormente escalar a experimentos en invernadero.

La actividad inhibitoria que presentaron las actinobacterias, nos permite seguir con su evaluación para proponer su aplicación en la agricultura, como biocontrol de fitopatógenos. En el caso de las cepas con efecto herbicida rbES158 y rbES331 se debe realizar una metodología que nos permita caracterizar su efecto herbicida, al mismo tiempo que se siga identificando su efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos sin poner en riesgo a la planta. Otras de las cepas seleccionadas para seguir con su evaluación son rbES173 y rbES339. Se podría continuar con su evaluación *in vivo* en ensayos volátiles y de sobrenadante para comprobar el efecto de los compuestos involucrados. Seguido también de estudios de transcriptoma para caracterizar sus compuestos secundarios potenciales y en qué momento estos genes involucrados se activan para lograr un efecto inhibitorio contra los fitopatógenos. Con la determinación del potencial de los compuestos secundarios las metodologías siguientes serían más específicas y podríamos tener mejores resultados *in vitro* e *in vivo*.

En este trabajo se observó una diversidad de resultados, en cada ensayo cada cepa mostró sus potenciales antagónicos, dependiendo de cada hongo y bajo interacciones diferentes, por ello se consideran diferentes perspectivas para seguir con su evaluación e identificación de compuestos secundarios y crear productos formulados con estos compuestos y que puedan ser utilizados en un futuro en la agricultura.

9. CONCLUSIONES

Se identificaron seis cepas de actinobacterias con la capacidad de inhibir el crecimiento de cinco hongos fitopatógenos mediante la producción de compuestos volátiles y sobrenadantes.

Las seis cepas de actinobacterias mostraron efectos antagónicos diferentes para cada cepa de hongo y también su inhibición no es la misma en todos los ensayos aunque los hongos sean los mismos.

Los hongos fitopatógenos mostraron mayores cambios en su morfología al ser evaluados en los ensayos de sobrenadantes.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00044-16>
- 2) Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- 3) Buddhika, U. V. A., & Abeysinghe, S. (n.d.). *for Plant Disease Management*. 331–342.
- 4) Dangi, P., Sharma, M., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. In *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (Vol. 3, Issue 2). <http://www.ijcmas.com>
- 5) Duban, M., Cociancich, S., & Leclère, V. (2022). Nonribosomal Peptide Synthesis Definitely Working Out of the Rules. *Microorganisms*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030577>
- 6) Flores, M. A. R. (2005). *Universidad de Chile*.
- 7) Grantcharova, N., Lustig, U., & Flärdh, K. (2005). Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3227–3237. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3227-3237.2005>
- 8) Guevara-Avenidaño, E., Carrillo, J. D., Ndinga-Muniania, C., Moreno, K., Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A., & Reverchon, F. (2018). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(4), 563–572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- 9) Hoang, T. T., Sullivan, S. A., Cusick, J. K., & Schweizer, H. P. (2002). β -

- Ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. *Microbiology*, 148(12), 3849–3856. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-3849>
- 10) Investigaciones, C. D. E., Ciencias, E. N., Posgrado, G., Microbiolog, E. N., Tehuac, B., Que, T., Obtenor, P., Grado, E. L., Ciencias, M. E. N., Opci, C. O. N., Bioqu, E. N., Presenta, T. M., Alejandrina, D., Segura, C., Ernesto, L., & Ram, F. (2017). *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
 - 11) Leyva, S. G. M., Mariscal, L. A. A., Villaseñor, H. E. M., & Huerta, J. E. (2011). *Diplodia sp ., Causante de la Pudrición de Grano de Avena (Avena sativa) en Nanacamilpa , Tlaxcala , México**Diplodia sp ., Cause of Oat Grain Decay in Nanacamilpa, Tlaxcala, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1), 81–83.
 - 12) Mojeremane, K., Lebenya, P., Plessis, I. L. D., Van Der Rijst, M., Mostert, L., Armengol, J., & Halleen, F. (2020). Cross pathogenicity of *Neofusicoccum australe* and *Neofusicoccum stellenboschiana* on grapevine and selected fruit and ornamental trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3), 581–593. <https://doi.org/10.14601/Phyto-11609>
 - 13) Mondragón-flores, A. (2021). *Resumen Introducción*. 643–654.
 - 14) Morales G., Y. E., Herrera, M. C., & Muñoz R., J. (2007). Cloranfenicol , un antibiótico clásico como alternativa en el presente Chloramphenicol , a classic antibiotic as an alternative for the present. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1870–0195), 58–69.
 - 15) Morgado, C. (2015). *Mecanismos Regulatorios Comunes que Controlan la Biosíntesis de Macrólidos Polienos*. [https://buleria.unileon.es/bitstream/10612/8215/1/CLAUDIA SOFÍA MORGADO VICENTE.PDF](https://buleria.unileon.es/bitstream/10612/8215/1/CLAUDIA%20SOFÍA%20MORGADO%20VICENTE.PDF)
 - 16) Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
 - 17) Pérez, J., & Noriega, M. J. (2016). Vías Metabólicas De Síntesis de Lípidos.

Universidad de Cantabria., 2, 1–7.
<https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%25205B-Bloque%2520I-Vias%2520Formacion%2520Lipidos.pdf>

- 18) Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 9(7), 670–675. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.83>
- 19) Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231(September 2019), 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
- 20) Sánchez, M.C.; Ridaó, A. del C. & Colavita, M. L. (2015). Diaporthe Caulivora: Agente causal de cancro del tallo predominante en cultivos. *Revista FAVE - Cs. Agrarias*, 14(2), 1–20.
- 21) Tena, A. R., Rincón Enríquez, G., Evangelista Martínez, Z., & Quiñones Aguilar, E. (n.d.). *LUCHA ENTRE MICROBIOS: UNA HERRAMIENTA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE PLANTAS* (Vol. 16). <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- 22) Valencia-botín, A. J., & Livera-muñoz, M. (2005). Caracterización de una Cepa de *Fusicoccum* sp . anamorfo de *Botryosphaeria dothidea* Moug .: Fr (Ces . and De Not .) Aislada de Pitahaya [*Hylocereus undatus* (Haw .) Britton y Rose] Cactaceae. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 23, 157–161.
- 23) Weissman, K. J. (2009). Chapter 1 Introduction to Polyketide Biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 459(B), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04601-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04601-1)
- 24) Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, SC y Gramajo, H, (2011). Biosíntesis de ácidos grasos en actinomicetos. *Revisión de microbiología de FEMS*, 35(3) 475-497
- 25) Sumyya Waliullah, Greg E. Fonsah y Emran Alí (2022). Primer reporte de pudrición del pedúnculo causada por *Lasiodiplodia brasiliensis* en banano en EE.UU, *La Sociedad Estadounidense de Fitopatología*
- 26) Martínez Mercado , M.A., Duarte de Jesús , J.L, Galindo Sánchez, C.E.,

- Saavedra Flores, A., y Carrillo Tripp J. (2022). Novel viral RNA genomes the vine mealybug *Planococcus ficus*. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, 103(001717), 17. doi: 10.1099/jgv.0.001717. (ID:27730)
- 27) Sakalidis, M. L., Hardy, G.E. St. J., y Burguess, T.I (2011) . Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neffosicoccum parvum*. *Neffosicoccum ribis* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60(320). 333-344.
http://researchrepository.murdoch.edu.au/4559/1/use_of_the_Genealogical_Sorting_Index.pdf
- 28) Buechel T. 2018: Perfil de enfermedades radicales: *Fusarium*.
<https://www.pthorticulture.com/es/centro-deformacion/perfil-de-las-enfermedadesradicales-fusarium/>
- 29) Mendoza EM, López BAO, Oyervides GA, Martínez ZG, De León C, Moreno ME. 2003. Herencia genética y citoplasmática de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 267-271
- 30) Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. 1981, *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. University Park, Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press; 457 p.
- 31) Samuels GJ, Nirenberg HI and Seifert KA (2001). Perithecial species of *Fusarium*