



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD MICHOACÁN**

**“BACTERIAS ANTAGONISTAS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO POSTCOSECHA DE LA ANTRACNOSIS EN PAPAYA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

PRESENTA:

VERONICA NÚÑEZ OREGEL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. HORTENCIA GABRIELA MENA VIOLANTE

JIQUILPAN, MICHOACÁN. MARZO DEL 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich; siendo las 13:00 horas del día 03 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR – MICH. para examinar la tesis titulada:

“Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya”

Presentada por el alumno:

NÚÑEZ

Apellido paterno

OREGEL

Apellido materno

VERÓNICA

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	0	0	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dra. María Valentina Angoa Pérez
Dr. Víctor Olalde Portugal
Dr. José Venegas González
Dr. Hipólito Cortez Madrigal

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Guillermo Herrera Arreola

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U- MICH.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán el día 2 del mes Marzo del año 2012, el (la) que suscribe Veronica Núñez Oregel alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B081003, adscrito a CIIDIR – IPN – Unidad Michoacán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante y cede los derechos del trabajo intitulado **BACTERIAS ANTAGONISTAS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO POSTCOSECHA DE LA ANTRACNOSIS EN PAPAYA**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección tenchisgmv@hotmail.com; oregelvero@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Veronica Núñez Oregel

Nombre y Firma

DEDICATORIA:

A mi familia; lo más importante de mi vida.

A DIOS; que me ha sostenido en la Fe y a quien debo lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional (IPN), al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Michoacán (CIIDIR-IPN-MICH) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del propio instituto, por los apoyos económicos otorgados con los cuales fue posible la realización de este trabajo de investigación.

A mi directora de tesis la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante, a la Dra. Dionicia Gloria León Martínez y a la Dra. Valentina Angoa Pérez, mi profundo agradecimiento, admiración, cariño y respeto, porque fueron la luz que me guio en la maestría y en mi vida. Muchas gracias por todo su apoyo, por su paciencia en todo momento y por creer en mí.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por su asesoría, paciencia y por permitirme ser parte de su laboratorio.

A todos mis profesores, por el apoyo y los conocimientos brindados durante mi formación en la maestría, en especial al Dr. Hipólito Cortes Madrigal, Dr. José Venegas González, Dr. Luis Fernando Ceja Torres, M.C. Salvador Ochoa Estrada y la Dra. Martha Velázquez Machuca.

A la M. C. Rosalinda Serrato Flores por su cariño y apoyo en todo momento.

Al M.C. Carlos Méndez Inocencio por su apoyo y orientación en este proyecto.

A mis amigos (a) que siempre han estado a mi lado en todo momento, brindándome su cariño y fortaleza.

A mis compañeros del Ciidir y Cinvestav por sus grandes enseñanzas y amistad.

Al personal administrativo: Magdalena Padilla Márquez, Guadalupe Arceo y Amparo Rebeca Soriano Silva por su disponibilidad al ayudarnos como alumnos de la Maestría con amabilidad y eficiencia.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAGINA
1	Estructuras de fructificación de <i>Colletotrichum</i> , a) Acérvulo, b) Setas y c) Conidióforos (Foto Barnett y Hunter, 1998).	12
2	Estructuras de fructificación de <i>Colletotrichum</i> , a) Conidias curvadas y b) Conidias fusiformes (Foto Oliveira <i>et al.</i> , 2005).	12
3	Ciclo biológico de Antracnosis causada por <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Tomado de Agrios 2002.	13
4	Esquema de la técnica de microcultivo de hongos	33
5	Regiones ITS1 e ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990).	35
6	Lesiones causadas por <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos de papaya cultivada en Tecomán, Colima.	41
7	Morfología microscópica de estructuras de fructificación: Conidias unicelulares hialinas curvadas (A) y fusiformes (B) de <i>Colletotrichum</i> spp. aislados de papaya, teñidas con azul de tripano (45X) (Fotos V. Núñez). C) Conidias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> crecidas en medio de cultivo solido harina de maíz agar; aislamientos de frutos de guayaba, Barra=10µM (Fotos Gutiérrez <i>et al.</i> , 2002).	42
8	Morfología microscópica de estructuras de <i>Colletotrichum</i> spp. A) clamidosporas y micelio septado de los aislamientos obtenidos, teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); B) Microfotografía de referencia de clamidosporas de <i>Colletotrichum</i> spp. (Oliveira <i>et al.</i> , 2005).	42
9	Morfología microscópica de estructura de A) hifas teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); B) Microfotografía de referencia de hifas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Rodríguez <i>et al.</i> , 2004).	43
10	Morfología microscópica de estructuras de fructificación: Apresorios de formas variables desde ovals (A), irregulares (B) y lobuladas (C) de los aislados de <i>Colletotrichum</i> , teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); D) Microfotografía de referencia de apresorios café presentes en tres especies de <i>Colletotrichum</i> : <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. orbiculare</i> y <i>C. fragariae</i> (Villanueva <i>et al.</i> , 2008).	43

11	Patrones electroforéticos de los productos de la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., en agarosa 1%. El control negativo no presentó producto de amplificación (carril 1). Aislados fúngicos de <i>Colletotrichum</i> (carriles 2-11). Marcador de peso molecular de 1 kb (carril M).	44
12	Patrones electroforéticos de los productos de amplificación de los fragmentos purificados, de la región ITS-5.8S-ITS. Los productos fueron obtenidos a partir de los primers ITS1 e ITS4, los carriles 1-20 son representantes de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> de cada grupo genético previamente analizado. Carril M.- Marcador de peso molecular de 1kb.	46
13	Secuencia nucleotídica para el aislado 25, identificado como <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Grupo II). Se indican los sitios de restricción para la enzima <i>Hpa</i> II, que coinciden con los sitios de restricción generados en el grupo 2 dentro de la tabla 5.	48
14	Análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS-5.8S-ITS, de los aislados provenientes de frutos maduros de papaya. Se pudo identificar tres especies diferentes de antracnosis en papaya cultivada en Tecomán Colima, el modelo de distancia genética utilizado fue Tamura-Nei por el método Neighbor-Joining.	49
15	Respuesta antagonista de las mejores bacterias con efecto inhibitorio a los diferentes aislados fúngicos: A) Grupo I, B) Grupo II, C) Grupo III, D) Grupo IV, E) Grupo V, F) Grupo VI, G) Grupo VII y H) Grupo VIII.	70
A	Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción <i>Alu</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 1-12 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	109
B	Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción <i>Alu</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 13-24 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	110
C	Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción <i>Alu</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 25-36 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	110
D	Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción <i>Alu</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 37-48 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	110

IV

E	Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción <i>Alu</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 49-53 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	111
F	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción <i>Hae</i> III, <i>Hpa</i> II e <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 1 y 2 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	111
G	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 3-5 y 8-11 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	112
H	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 6-7, 9 y 16 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	112
I	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 12-15 y 17-18 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	113
J	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción <i>Hae</i> III, <i>Hpa</i> II e <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 15 y 17 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	113
K	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 21-26 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	114
L	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 26, 27, 29, 34, 48 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	114
M	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción <i>Hae</i> III, <i>Hpa</i> II e <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 30 y 31 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	115
N	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 35-37, 40-42 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	115
O	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 32-33, 35, 38-40 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	116
P	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= <i>Hae</i> III, II= <i>Hpa</i> II e I= <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 43-47, 49 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	116

Q	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción <i>Hae</i> III, <i>Hpa</i> II e <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 50 y 51 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	117
R	Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción <i>Hae</i> III, <i>Hpa</i> II e <i>Hinf</i> I mediante RFLP para los aislados fúngicos 52 y 53 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.	117

INDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PAGINA
1	Contenido nutrimental de la papaya en estado maduro (En 100 gramos de papaya)	3
2	Principales estados productores de siembra y cosecha de frutos del papayo, de riego y temporal 2011.	6
3	Microorganismos antagonistas utilizados en un control biológico exitoso contra la antracnosis postcosecha de frutas y verduras	22
4	Tamaños de fragmentos generados por el tamaño de fragmento amplificado de la región ITS (rDNA), de los hongos aislados de frutofera de papaya con diferentes enzimas de restricción.	45
5	Tamaños de los fragmentos generados por las secuencias nucleotídicas “ <i>in silico</i> ”, provenientes de los aislados fúngicos de frutofera de papaya digeridos con diferentes enzimas de restricción <i>Hpa</i> II, <i>Hae</i> III, <i>Hinf</i> I y <i>Alu</i> I por comparación con la base de datos de la NCBI.	47
6	Clasificación de los aislados fúngicos de los diferentes grupos genéticos de <i>Colletotrichum</i> presentes en papaya madura cultivada en Tecomán, Colima.	50
7	Tasa del crecimiento radial del micelio de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> sp. de frutos de papaya.	51
8	Características culturales de diferentes aislados de <i>Colletotrichum</i> de frutos maduros del papayo.	52
9	Especies de bacterias antagonistas contra especies de <i>Colletotrichum</i> sp. aislados del papayo.	61
10	Efecto antagónico <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra <i>Colletotrichum capsici</i> (HM450130).	62

RESUMEN

El fruto del papayo (*Carica papaya* L.) es un cultivo de gran importancia en nuestro país ya que es uno de los principales productos agrícolas de exportación, el cual tiene múltiples usos de consumo e industriales. La antracnosis ha sido señalada como la principal limitante fitopatológica de los frutos de papaya en postcosecha a nivel mundial, causando pérdidas del 40 al 100%. Por tal motivo en busca de alternativas más seguras que los fungicidas sintéticos, que sean eficaces y económicamente viables, así como amigables con el medio ambiente, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron conocer el potencial de los aislados de bacterias de la filosfera de papaya como agentes de control biológico contra *Colletotrichum* sp. Se realizó el aislamiento de 53 aislados fúngicos procedentes de Tecmán, Colima y se realizó la identificación genética por medio de marcadores moleculares RFLP y se procedió a hacer pruebas de antagonismo *in vitro* por confrontación directa con un total de 250 aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya; se seleccionaron nueve aislados biocontroladores con base en su capacidad inhibitoria del *Colletotrichum* sp, los cuales fueron identificados genéticamente como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis* por comparación de las secuencias del gen ribosomal 16S en la base de datos del (NCBI) en línea Blast del NCB. Dichos aislados mostraron actividad antagonista *in vitro* con valores desde 49.5% hasta 86.3% de inhibición contra todos los aislados de *Colletotrichum*, clasificados en ocho grupos genéticos de acuerdo a su identificación molecular; lo cual indicó la alta diversidad genética y fenotípica de los aislados de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis en papaya, este hecho cobra importancia ya que el éxito de controlar las enfermedades reside en conocer cuál es el agente etiológico, para así establecer las mejores estrategias de control. Las bacterias *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* presentaron la mayor tendencia (66.3 hasta 86.3%) de actividad antagonista *in vitro* contra los aislados fitopatógenos; *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum* spp.

ABSTRACT

Papaya fruit (*Carica papaya* L.) is a very important crop in our country, since it is one of the most exportable agricultural products for many uses and industrialization. Anthracnose is the most limiting postharvest factor in producing papaya around the world, causing losses of 40 to 100%. That is why, looking for alternatives to synthetic fungicides which should be more efficient, cheaper and more environmentally friendly, the objective of this research work was to learn the biocontrol potential of bacteria isolated from papaya phyllosphere against *Colletotrichum* sp. Fifty three fungal isolates from papaya cultivated in Tecoman, Colima, were genetically identified using RFLP molecular markers, and assays of in vitro antagonism by direct confrontation between those and 250 bacterial isolates from different tissues of papaya were performed. Nine bacterial isolates were selected based on their capability to inhibit *Colletotrichum* sp. identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* based on a 16S rDNA sequence analysis by comparison with sequences at NCBI database. The isolates showed an in vitro antagonist activity from 49.5% to 86.3% against the *Colletotrichum* isolates, which were classified into eight genetical groups, suggesting a large range of genetic diversity of those isolates causing Anthracnose in papaya. This fact is important because the success in controlling plant diseases depends on knowing the etiological agents, in order to apply a proper treatment. *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* showed the best antagonistic activity (66.3 to 86.3%) against the pathogenic isolates: *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum* spp.

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE FÍGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRAC	VIII

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características generales del cultivo del papayo (<i>Carica papaya</i> L.).	2
1.1.1 Usos de la papaya	2
1.1.2 Origen y distribución del cultivo del papayo	4
1.1.3 Importancia económica de frutos del papayo en México	5
1.2 Principales enfermedades fúngicas en <i>Carica papaya</i> L.	7
1.3 Pérdidas postcosecha de frutos del papayo	7
1.4 Pérdidas de frutos del papayo en postcosecha por <i>Colletotrichum</i>	8
1.5 Taxonomía de <i>Colletotrichum</i>	9
1.6 Generalidades de Antracnosis	9
1.7 Desarrollo de la Antracnosis	13
1.8 Métodos de control de Antracnosis de frutos del papayo	14
1.9 Control biológico	20
1.9.1 Enfoques básicos para el uso de los microorganismos antagonistas	21
1.9.1.1 Microorganismos antagonistas naturales	21
1.9.1.2 Microorganismos antagonistas introducidos artificialmente	21
1.9.2 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas	23
1.9.2.1 La competencia por espacio y nutrientes	24
1.9.2.1.1 Competencia por espacio	24

1.9.2.1.2 Competencia por nutrientes	24
1.9.2.1.3 Adhesión (conexión directa de antagonismo)	25
1.9.2.1.4 Las poblaciones de los antagonistas microbianos	25
1.9.3 Producción de antibióticos	26
1.9.4 Parasitismo directo	26
1.9.5 Resistencia inducida en la planta	27
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVOS GENERALES	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 Descripción del sitio de muestreo	31
4.2 Material vegetal y aislamiento del fitopatógeno	31
4.3 Aislamiento de bacterias antagonistas	32
4.4 Aislamiento de <i>Colletotrichum</i>	32
4.5 Caracterización morfológica del patógeno	33
4.5.1 Microcultivo para identificación de estructuras fúngicas	33
4.5.2 Tasa de crecimiento radial del micelio	34
4.6 Identificación de <i>Colletotrichum</i> por polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	34
4.7 Digestión enzimática de los productos de amplificación para agrupación por RFLP	36
4.8 Identificación molecular de los hongos	36
4.9 Prueba de antagonismo	37
4.10 Identificación de aislados bacterianos	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Aislamiento y caracterización de <i>Colletotrichum</i> sp.	41
5.2 Grupos de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.	44
5.3 Identificación de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp.	46
5.4 Caracterización cultural de los aislados fúngicos de <i>Colletotrichum</i> por crecimiento micelial	50

5.5 Caracterización cultural de los aislados fúngicos de <i>Colletotrichum</i> por coloración del micelio	51
5.6 Identificación de bacterias antagonistas para <i>Colletotrichum</i>	61
5.7 Actividad antagonista de bacterias contra <i>Colletotrichum</i>	62
6. DISCUSIÓN	72
7. CONCLUSIONES	87
8. BIBLIOGRAFÍA	88
9. APÉNDICE	108
APÉNDICE I	108
APÉNDICE II	108
APÉNDICE III	109

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del cultivo del papayo (*Carica papaya* L.).

Es conocida como papayo, papayero, papaya, lechosa, fruta bomba (*Carica papaya* L.). Es una planta herbácea, frutícola tropical, sin ramas y de crecimiento rápido, que alcanza hasta 8 m de altura. Su copa está formada por muchas hojas grandes y palmadas, muy lobuladas, que se enraciman en el extremo superior del tronco, en cuya base se agrupan los frutos de color verde o verde amarillento en estados inmaduros. Los frutos son de forma ovoide y pueden pesar hasta 3 kg cada uno; son suculentos y de pulpa gruesa de color rosa o naranja (Noa, 2003).

El papayo se propaga en los trópicos y sus grandes frutos constituyen una de las frutas más populares del mundo. La mayoría de las partes del árbol contienen papaína, una enzima proteolítica utilizada como sustancia ablandadora de carne y en ocasiones en la elaboración de cerveza (Noa, 2003).

1.1.1 Usos de la papaya

Por su buen sabor y textura, la papaya se consume principalmente como fruta fresca; también en bebidas, mermeladas, dulces, frutas secas y cristalizadas (Villegas, 1997). La fruta verde, hojas y flores, se usan como verdura cocida (Watson, 1997). Nutricionalmente, la papaya es una buena fuente de calcio y una excelente fuente de vitaminas; por ejemplo el aporte de vitamina A y C de una papaya mediana, supera el porcentaje mínimo del requerimiento de vitaminas al día en adultos según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (Tabla 1).

La papaya tiene muchos usos industriales, ya que las hojas y el fruto contienen proteínas y alcaloides con importantes aplicaciones farmacéuticas y alimentarias (El Moussaoui *et al.*, 2001).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Tal es el caso de la papaína que es una enzima proteolítica importante que se extrae del látex lechoso de la papaya en estado inmaduro de color verde. El látex se extrae de la piel verde de papaya, que posteriormente se deja secar, antes del proceso de la clarificación para inducir el flujo del látex (Nakasone y Paull, 1998). La papaína tiene diversos usos industriales, como por ejemplo en la elaboración de bebidas, en la fabricación de gomas de mascar, en la industria cervecera, en ablandadores de carne, productos farmacéuticos digestivos, también se usa para aliviar heridas gangrenosas; en la industria textil se usa para suavizar la lana y la seda; en la industria cosmética, para la fabricación de jabones y shampoo (Villegas, 1997).

**Tabla 1. Contenido nutrimental de la papaya en estado maduro
(En 100 gramos de papaya).**

Componente	Valor asignado	Componente	Valor asignado
Agua	89 %	Potasio	257 mg
Calorías	39 kcal	Magnesio	10 g
Proteína	0.61 g	Sodio	3 mg
Grasa	0.14 g	Niacina	0.34 mg
Carbohidratos	9.8 g	Ácido pantoténico	0.22 mg
Calcio	24 mg	Vitamina A	1094 IU
Hierro	0.1 mg	Vitamina E	0.73 mg
Fósforo	5 mg	Vitamina C	84 mg

Fuente: Base de datos de nutrientes de USDA para Referencia Estándar, Publicación 18 (2005).

En algunas zonas de México las hojas del papayo se utilizan para la alimentación del ganado. Los frutos, al igual que las hojas, junto con un suplemento de concentrados, se han utilizado con buenos resultados para la alimentación de algunos animales como el cerdo (Noa, 2003).

1.1.2 Origen y distribución del cultivo del papayo

La historia de la papaya, fue descrita por primera vez por el historiador Fernández de Oviedo, el dueño de Minas en España (Antillas) del 1513 al 1525, donde describe que Alfonso de Valverde fue quien llevó semillas de papaya de las costas de Panamá a Darién y luego a Santo Domingo y otras islas de la India Occidental. Los colonizadores españoles le dieron el nombre de “papaya” y llevaron la planta a Filipinas, desde donde se expandió a Malasia y finalmente la India en 1598. Para el tiempo en que los árboles de papayo se establecieron en Uganda (1874), su distribución ya se había extendido a la mayoría de los países tropicales y sub-tropicales (Teixeira *et al.*, 2007).

El cultivo del papayo está limitado a regiones con clima tropical ó subtropical. Se considera originario de la región que comprende desde el sur de México hasta Nicaragua. Aunque entre botánicos existe controversia en cuanto a su origen; algunos la sitúan en el área del Caribe, otros en el Sur de México y Nicaragua y otros mencionan al Noroeste de América del Sur, en la vertiente oriental de los Andes, debido a que en esta última región se localiza la mayor diversidad de especies del género *Carica* (De los Santos *et al.*, 1997).

La familia Caricaceae a la cual pertenece el papayo consta de cuatro géneros: *Cylicomorpha* con dos especies; *Jacarita* con seis especies; *Jarilla* con una especie y *Carica* que cuenta con 22 especies y es el único género de la familia Caricácea que se cultiva como árbol frutal, mientras que los otros tres géneros se cultivan principalmente como ornamentales (Burkill, 1966). El primer grupo es de origen africano y los demás de origen americano. De las especies de *Carica* 11 producen frutas comestibles (De los Santos *et al.*, 1997). Por su importancia en el consumo como fruta fresca y el uso del látex del fruto inmaduro, este cultivo se ha distribuido a regiones con temperaturas óptimas entre 24 y 27°C (INIA, 1982).

Recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación taxonómica apoyada en estudios de comparación de secuencias genéticas entre la papaya y otras especies afines (Jobin-Decor *et*

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

al., 1996; Badillo, 2002; Kim *et al.*, 2002). Algunas especies que fueron asignadas anteriormente a *Carica* ahora son clasificadas en el género *Vasconcella* (Badillo, 2002).

Por lo tanto, la clasificación de *Caricácea* comprende a *Cylicomorpha*, *Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Horovitzia* y *Vasconcella*, con *Carica papaya* como única especie dentro del género *Carica* (Badillo, 2002).

1.1.3 Importancia económica de frutos del papayo en México

Carica papaya es la especie más importante económicamente dentro de la familia *Caricácea*, es un cultivo atractivo para el agricultor ya que tiene ventajas sobre otros frutales, en especial su corto período entre siembra y cosecha, su alto rendimiento, una producción continua y el bajo desarrollo de la planta, que le permite ser intercalada con otros árboles frutales (Torres, 1977).

El papayo es un cultivo de gran importancia económica para México, en el año 2008 a nivel internacional por su volumen de producción se ubicó en la quinta posición y en exportación en primer lugar en el año 2007 (FAO, 2010). En los últimos 20 años ha estado entre los diez primeros frutales tropicales tanto en superficie sembrada como en volumen producido. En el año 2010 México produjo alrededor de 422,671 ton de papayas en alrededor de 16,135 ha cultivadas (SAGARPA, 2010).

La introducción de nuevas variedades y su producción comercial en estados como: Chiapas, Colima, Nayarit y Sinaloa; ha permitido que México eleve su producción y mantenga un mercado interno y externo estable. Desde mediados de la década de los 80 México exporta papaya a los Estados Unidos de Norteamérica convirtiéndose hasta la fecha en el primer abastecedor de esta fruta a dicho país (De los Santos *et al.*, 1997; INIA, 1981). Entre los principales estados productores de papaya, que se destacaron en el 2011, se encuentran: Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Colima, Guerrero y Michoacán, tal como se muestra en la tabla 2 (SAGARPA, 2012).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

La principal variedad cultivada de papaya es la Maradol y México es el país de mayor superficie cultivada, mayor productor y exportador de dicha variedad en el Mundo (FAO, 2008). Rodríguez (2002), reportó que la variedad Maradol fue obtenida en Cuba, por el fitomejorador autodidacta, Adolfo Rodríguez Rivera y su esposa María Luisa Nodals Ochoa, durante el período 1938–1956. El nombre de la variedad surge al unir parte de los nombres de sus creadores, Mar, de María y adol, de Adolfo (Rodríguez *et al.*, 1966).

Tabla 2. Principales estados productores de siembra y cosecha de frutos del papayo, de riego y temporal 2011.

ESTADO	SUPERFICIE (ha)			PRODUCCIÓN (ton)	RENDIMIENTO (ton/ha)
	sembrada	cosechada	siniestrada	obtenida	obtenido
CHIAPAS	1,867	1,795		140,222	78.118
VERACRUZ	4,547	3,939	19	114,870	29.162
OAXACA	1,905	1,778		113,705	63.965
COLIMA	1,107	1,061		67,273	63.403
GUERRERO	1,210	1,176	2	45,120	38.383
MICHOACÁN	2,063	1,403		45,002	32.076
YUCATAN	697	533	70	21,208	39.819
TABASCO	489	481		18,757	39.016
QUINTANA ROO	238	156		13,122	84.387

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA, 2012.

1.2 Principales enfermedades fúngicas en *Carica papaya* L.

Las principales enfermedades fúngicas de interés fitosanitario que atacan el fruto de *Carica papaya* L. y otros tejidos vegetales del mismo, son los siguientes:

Alternaria sp., *Ascochyta* sp., *Asperisporium caricae*, *Cercospora caricae*, *Athelia rolfsii*, *Corticium rolfsii*, *Sclerotium rolfsii*, *Capnodium* sp., *Cercospora* sp., *Cladosporium* sp., *Corynespora cassiicola*, *Cercospora vignicola*, *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryodiplodia theobromae*, *Monilinia fructicola*, *Mycosphaerella tassiana*, *Cladosporium herbarum*, *Phoma caricaepapayae*, *Ascochyta caricae papayae*, *Mycosphaerella caricae*, *Phyllosticta* sp., *Sphaerotheca caricae-papayae*, *Oidium caricae* (USDA, 2008).

1.3 Pérdidas postcosecha de frutos del papayo

Las enfermedades postcosecha representan las causas más importantes de pérdidas de frutas y hortalizas. Se estima que alrededor del 20-25% de las frutas y verduras cosechadas se pudren por patógenos durante el manejo postcosecha, incluso en los países desarrollados (El-Ghaouth *et al.*, 2004; Droby, 2006; Zhu, 2006; Singh y Sharma, 2007). En los países en desarrollo, las pérdidas postcosecha son más graves debido al almacenamiento e instalaciones del transporte inadecuadas (Sharma *et al.*, 2009).

Las principales pérdidas postcosecha en papaya se deben a las enfermedades, pues reducen la calidad del fruto en campo y en anaquel; son también las principales responsables de pérdidas que ocurren durante el transporte; las pérdidas en frutos de papaya son del 10 al 40% en transporte terrestre y del 5 al 30% en transporte aéreo, pudiendo alcanzar hasta el 75% en la fase de comercialización. Las pérdidas ocasionadas por enfermedades varían dependiendo el manejo postcosecha y los procesos de empaque (Álvarez y Nishijima, 1987; Paull, 1997). El principal agente etiológico causante de enfermedad en postcosecha de papaya es *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. (Osman *et al.*, 2010).

1.4 Pérdidas de frutos del papayo en postcosecha por Colletotrichum

Colletotrichum gloeosporioides Penz. Sacc. provoca la enfermedad conocida comúnmente como Antracnosis. Dentro del total de pérdidas postcosecha en papaya (30%), un 24% son causadas por enfermedades (Guzmán, 1998). Dentro de estas enfermedades la antracnosis causa importantes pérdidas económicas en frutas de papaya (*Carica papaya* L.) y *Colletotrichum gloeosporioides* es el principal agente causal de esta enfermedad (Tapia *et al.*, 2008).

La antracnosis es una de las enfermedades de mayor importancia en los cultivos y es la responsable de la reducción del 10 al 80% a nivel comercial, afectando el rendimiento y producción de los cultivos, de países en desarrollo, como Tailandia, Pakistán, Turquía y México (Intra *et al.*, 2011).

Por ejemplo, en Brasil las pérdidas postcosecha de frutos tropicales se estiman en un 30%, en donde la antracnosis se ha considerado como la enfermedad de mayor importancia económica en el Noreste del país (Tavares, 2004).

En EE. UU. se detectó un 62.2% de pérdidas por pudriciones en diferente estado de desarrollo de la enfermedad, y un 90% con daños serios. La antracnosis limitada a la cáscara únicamente se reportó en el 12.1% de las inspecciones (Cappellini *et al.*, 1988). En Costa Rica, las pérdidas postcosecha de papaya son de considerable importancia (Costa Rica, 1991).

La antracnosis se ha reportado como el agente principal que afecta el rendimiento en las principales regiones productoras de papaya en el mundo, incluyendo Hawai, Brasil, Africa y Asia. En la isla Trinidad, las dos variedades cultivadas comúnmente de papaya son la “Red Lady” y “Tainung No. 2 F1-híbrida” son altamente susceptibles a la antracnosis, se reportó una incidencia de la enfermedad del 80% por antracnosis en frutos maduros (Maharaj y Rampersad, 2011).

La antracnosis ha sido señalada como la principal limitante fitopatológica de los frutos de papaya en postcosecha a nivel mundial, causando pérdidas del 40 al 100% (Arias, 1992).

1.5 Taxonomía de *Colletotrichum*

Según Latunde-Dada (2001) señalan que *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc (Anaformo) y su telemorfo *Glomerella cingulata* (Telemorfo) Spauld. & H. Schrenk (estado perfecto, subdivisión Ascomycotina) han sido implicados en numerosas enfermedades de las plantas en muchas regiones agrícolas del mundo, la clasificación taxonómica de *Colletotrichum* se muestra a continuación:

Reino: Fungi

Subdivisión: Deuteromicotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Melanconiales

Género: *Colletotrichum*

Especie: *gloeosporioides*

1.6 Generalidades de Antracnosis

Colletotrichum es un habitante muy común en los cultivos y con frecuencia no ocasiona síntomas de enfermedad en los órganos de la planta; en los frutos de algunas especies frutales solo se manifiesta cuando el pericarpio es debilitado, o cuando ocurren aumentos en los niveles de etileno como resultado de procesos de maduración de los frutos (Adaskaveg y Hartin, 1997).

Colletotrichum es un género importante de hongos que está conformado por 39 especies (Sutton, 1992) que causan antracnosis o tizones en una amplia gama de cultivos agrícolas y plantas ornamentales (Bailey y Jeger, 1992; Latunde-Dada, 2001).

En la actualidad se aceptan 39 especies de *Colletotrichum* descritas en el trabajo de Sutton (1992). Su descripción está basada en las características culturales de la colonia en medio de cultivo, tamaño y forma de los conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas y su telemorfo (Freeman *et al.*, 1998). Sin embargo, la considerable variación patogénica y morfológica que presenta este hongo ha ocasionado dificultades para su clasificación al usar únicamente caracteres morfológicos (Johnston y Jones, 1997; Sutton, 1980).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

La alta diversidad en las especies del género *Colletotrichum* ha sido problemático, ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de la diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Guerber y Correll, 2001).

La enfermedad de antracnosis se encuentra distribuida a escala mundial y ocasiona pérdidas económicas en pre y postcosecha en regiones tropicales, subtropicales y de clima templado (Jeffries *et al.*, 1990; Bailey y Jeger, 1992; Dodd *et al.*, 1992; Freeman *et al.*, 1998; Latunde-Dada, 2001; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004; Péres *et al.*, 2005). Sus hospedantes incluyen una gran diversidad de cultivos anuales como leguminosas (frijol, soya, chícharo y leguminosas forrajeras) (Lenné, 1992), gramíneas (maíz y sorgo) (Nicholson, 1992), solanáceas (tomate, chile y papa) (Dillard, 1992), cucurbitáceas (melón, sandía y pepino) (Sitterly y Keinath, 1996) y rosáceas (Fresa) (Freeman *et al.*, 1998; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005). Asimismo, diversas especies de *Colletotrichum* se han reportado afectando un gran número de cultivos perennes como aguacate, plátano, cítricos, café, mango, papaya, pasiflora, guayaba, guanábana, cacao, hule, manzana, durazno y almendro, así como cultivos industriales: algodón, caña de azúcar y tabaco (Waller, 1992; Waller y Bridge, 2000; Biggs y Miller, 2001; Afanador-Kafuri *et al.*, 2003).

El hongo *Colletotrichum* presenta un micelio septado de coloración hialina o castaña clara. Las conidias son producidas en estructuras especializadas llamadas acérvulos, que se forman en la superficie de los tejidos infectados. Los acérvulos (Figura 1a) separados tienen forma de disco o cojín, de textura cerosa y pueden ubicarse en forma subepidermal, epidermal o subcuticular. Típicamente presentan setas (Figura 1b) o espinas negras en los bordes o entre el conidióforo (Figura 1c); los acérvulos están formados por pseudoparénquima con paredes delgadas o gruesas, conidióforos simples, elongados con numerosas conidias (Figura 2). Las conidias son hialinas curvadas (Figura 2a) y fusiformes (Figura 2b), y por lo general un acérvulo setoso (Barnett y Hunter 1998; Holliday, 1995).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

El género *Colletotrichum* tiene una enorme variación ecológica, morfológica y patogénica, las diferentes formas en la naturaleza varían desde saprofito a cepas parasíticas (Mena, 1999). *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc. es el agente causal de una diversidad de daños y síntomas en diferentes frutales tropicales y subtropicales en México, y afecta diferentes órganos vegetales de la planta, así como en distintas etapas fenológicas del cultivo. Para 1992 se reconocieron 900 especies de *Colletotrichum* y cerca de 600 variantes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Bailey y Jeger, 1992). Bonde *et al.* (1991), distinguieron varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales (Gutiérrez *et al.*, 2001).

Las conidias son producidas en masas mucilaginosas típicamente hundidas, de color rosado y con un contorno irregular en las lesiones necróticas, este tipo de lesiones que con frecuencia se observa sobre las hojas, frutos y ramas es conocido como antracnosis; sin embargo en algunos frutos también es frecuente observar lesiones como chancros, cicatrices, verrugas o costras con relieve (Mena, 1999).

Una característica de especies de *Colletotrichum*, es que pueden causar infecciones latentes o quiescentes sobre los frutos, que posteriormente se desarrollan durante la fase de maduración. Las diferentes especies sobreviven por largos periodos sobre los desechos vegetales o en el suelo; el patógeno más común en los trópicos es *Colletotrichum gloeosporioides* (Holliday, 1995).

Las infecciones quiescentes en el contexto de enfermedades de postcosecha involucran la inhibición del desarrollo del patógeno a través de condiciones fisiológicas impuestas por el hospedero hasta que se lleva a cabo el estado de maduración. Una vez que el hongo penetra la capa exterior del fruto, este permanece allí en estado de quiescencia o dormancia hasta que ocurren cambios en la superficie del fruto los cuales proporcionan las condiciones adecuadas para permitir una infección (Contreras, 2006).

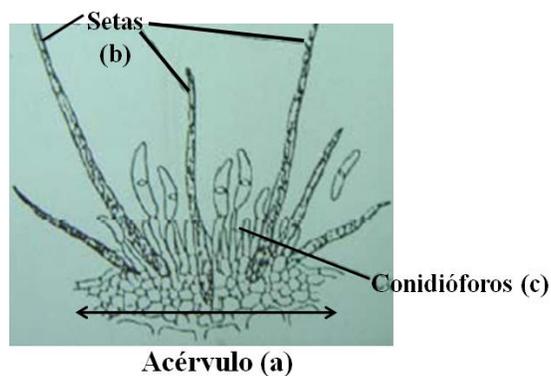


Figura 1. Estructuras de fructificación de *Colletotrichum*, a) Acérvulo, b) Setas y c) Conidióforos (Foto Barnett y Hunter, 1998).

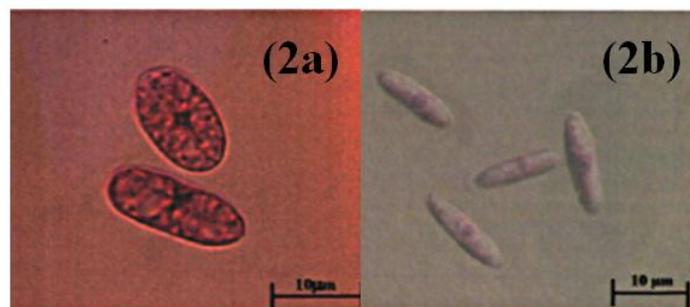


Figura 2. Estructuras de fructificación de *Colletotrichum*, a) Conidias curvadas y b) Conidias fusiformes (Foto Oliveira *et al.*, 2005).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

1.7 Desarrollo de la Antracnosis

El inóculo del microorganismo que ha sobrevivido en hojas, frutos y ramas afectadas causa la infección de los frutos por la dispersión de las conidias transportadas en el agua (Adaskaveg y Hartin, 1997). Una vez dispersas, las conidias se adhieren a la superficie del hospedero y germinan en un periodo de 12 a 24 h y luego producen un tubo germinal que penetra la cutícula directamente. Las fuentes de inóculo son las conidias producidas en acérvulos o las ascosporas producidas y liberadas del peritecio (Figura 3).

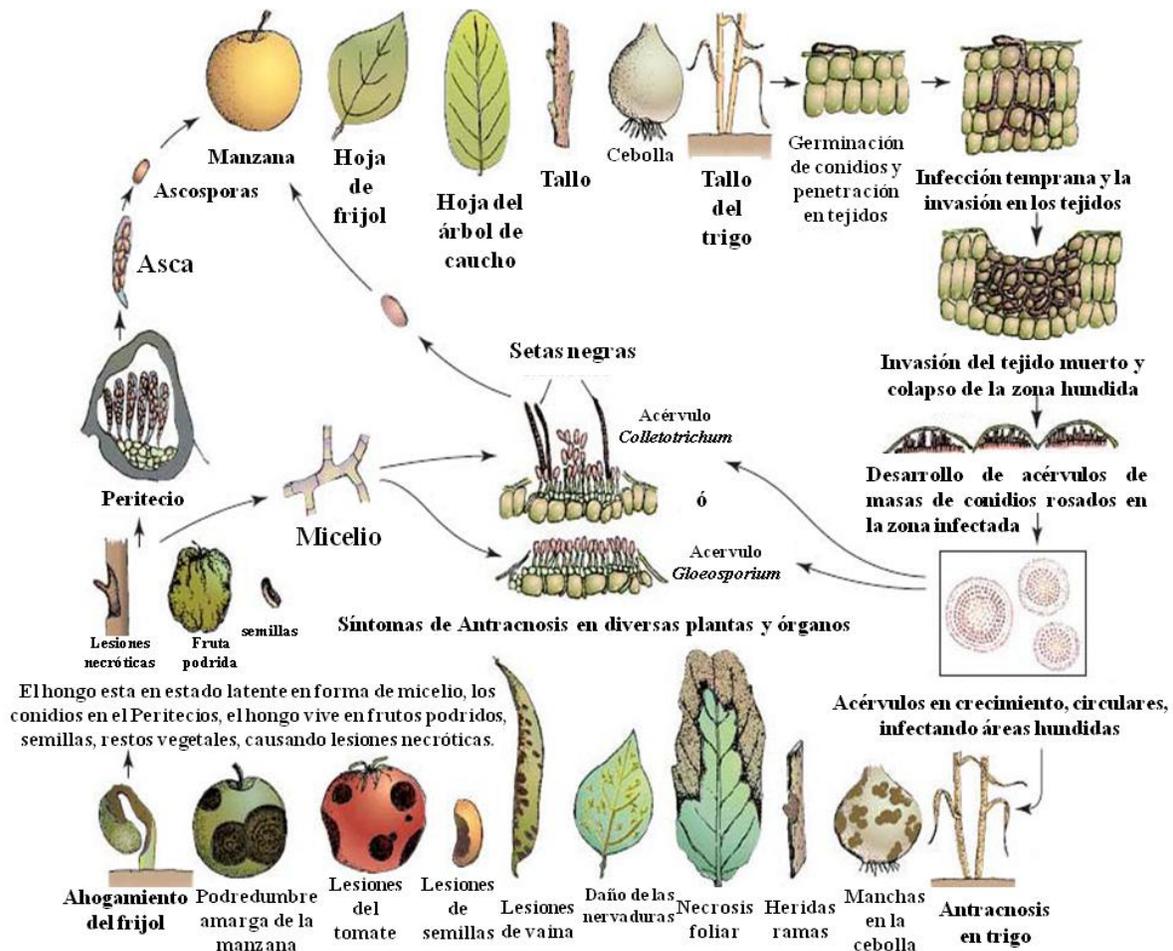


Figura 3. Ciclo biológico de Antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Tomado de Agrios 2002.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

La hifa infectiva penetra directamente la cutícula colonizando la pared celular de las células del hospedero (Parra, 2008). Existen varias formas de penetración, una de ellas es a través de aberturas naturales como estomas, lenticelas y otras por penetración directa o a través de pequeñas heridas. La infección se puede desarrollar casi en cualquier tejido de la planta. Una vez que el microorganismo penetra la cutícula, se pueden presentar dos estrategias de infección: la primera es conocida como hemibiotrofia intracelular y la segunda como necrotrofia subcuticular e intramural (Agrios, 2002).

Diversas especies de *Colletotrichum* presentan procesos infectivos en dos fases: la fase asintomática inicial, donde el patógeno se establece en los tejidos sin matar las células y son consideradas especies biotróficas (hemibiotrofia intracelular) y la fase destructiva visible (necrotrofia subcuticular), donde el patógeno crece bajo la cutícula y disuelve extensamente la matriz de péptidos de las células epidermales (Bailey y Jeger 1992). El desarrollo de la fase destructiva se asocia a la hinchazón y disolución de las paredes celulares (O'Connell *et al.*, 2000).

En condiciones favorables, el hongo puede crecer rápidamente en la planta y causar diversos síntomas muy rápidamente, pero en otras circunstancias el hongo puede permanecer quiescente dentro de los tejidos por un largo periodo, que en algunos casos solo se evidencia después de la cosecha. Pero también bajo condiciones ambientales extremas, puede permanecer en latencia por algún tiempo en el suelo o permanecer por largos periodos sobre tejido vegetal muerto (Agrios, 2002).

1.8 Métodos de control de Antracnosis de frutos del papayo

La calidad postcosecha de los frutos es uno de los atributos más importantes, el objetivo final de la producción y manejo de un cultivo es definido por la combinación de características físicas y químicas (Kader, 1999). Uno de los hongos patógenos de mayor importancia en el manejo postcosecha de papaya es *Colletotrichum gloeosporioides* que causa Antracnosis, la enfermedad más importante a nivel de fruto y que se manifiesta principalmente al comenzar la maduración, también causa la pérdida de flores durante el cultivo (Proexant, 2008). La aplicación de productos químicos es la práctica más

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

comúnmente usada para el control de hongos fitopatógenos, debido a que sus resultados se observan rápidamente y la mayoría de las veces es la única opción. Pérez *et al.* (2003) señalan que la severidad de la enfermedad de antracnosis ha conducido al uso excesivo de fungicidas, resultando una práctica costosa, poco eficaz y nociva para el ambiente. Se tienen reportes que para el control de la Antracnosis en frutos de papaya, los fungicidas más utilizados y más efectivos son prochloraz o propiconazol durante el almacenamiento y el transporte (Teixeira *et al.*, 2007). Por otro lado, Dembele *et al.* (2005) investigaron la asociación entre la madurez de la fruta, la pudrición ocasionada por la enfermedad de Antracnosis y la acumulación de residuos de fungicidas en los frutos de papaya. De los fungicidas probados, los frutos tratados con tiabendazol no presentaron pudrición después de los 21 días después del tratamiento. Por otra parte, se detectaron bajos niveles de fungicida en los frutos tratados, dichos niveles fueron más bajos de los permitidos en las normas de EE. UU.

Los plaguicidas químicos han sido uno de los principales recursos utilizados para el control de plagas. Fueron una gran solución en la lucha contra el hambre y las enfermedades de la humanidad, pero el continuo contacto con los seres humanos, con los alimentos y con los recursos no renovables, puede causar intoxicación. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total las tres cuartas partes de afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas. Hay varios tipos de envenenamientos por plaguicidas: agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones de comportamiento, convulsiones, coma, muerte) y crónicos (cáncer, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas) (Olivera y Daniel, 2008).

Los efectos negativos de los fungicidas en la salud humana, son el cáncer (por ejemplo cáncer de mama), desórdenes en el aprendizaje, problemas en el sistema inmunológico, disfunción reproductiva (conteos bajos de espermatozoides, endometriosis), diabetes, enfermedades

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

neurodegenerativas tales como el Alzheimer y Parkinson (Badii y Jerónimo, 2007). Problemas de piel, en membranas mucosas y tracto digestivo, pero también lesiones en la piel, ulceraciones, porfiria cutánea; también han sido registrados daños en hígado y efectos hematológicos y neurológicos, particularmente en exposiciones prolongadas. Convulsiones, ataxia, fatiga física y mental, dolor de cabeza, desorientación, taquicardia, cambios en la temperatura corporal, e incremento en el ritmo cardiaco. La muerte es, aparentemente, ocasionada por problemas cardiacos, seguidos por un rápido rigor mortis (Badii y Jerónimo, 2007).

Entre los efectos negativos de los plaguicidas sobre el ambiente se encuentran la persistencia ambiental de residuos tóxicos, la contaminación de recursos hídricos con alteración de la flora y fauna y la generación de organismos resistentes, por consiguiente aumentan las cantidades necesarias de plaguicida o la sustitución por agentes más tóxicos para lograr controles efectivos (Olivera y Daniel, 2008).

Existen otros métodos para el control de la antracnosis, tales como el tratamiento con frío (pre-enfriamiento), tratamientos con calor, las poliaminas, aplicaciones de calcio, Ozono (O₃), radiaciones ionizantes, uso de productos químicos como el 1-metilciclopropano (inhibidor de la acción del etileno) (Pérez, 2006).

Los tratamientos por inmersión en agua caliente en combinación con fungicidas mejora la eficiencia en el control de la Antracnosis. Sin embargo, tratamientos de inmersión en agua caliente puede afectar el proceso de maduración (Paull, 1990) y el uso combinado con los fungicidas durante períodos prolongados puede causar la aparición de cepas resistentes a los fungicidas.

El tratamiento de irradiación gamma fue propuesto como antimicrobiano en dosis bajas, se encontró eficaz; retrasando el proceso de maduración de la papaya. La superficie del fruto de papaya puede tolerar dosis de hasta 1 kilo gray (kGy) en el escaldado (Paull, 1996) y las frutas irradiadas con 0.5-1 kGy mantuvieron la firmeza de la fruta durante 2 días más que los frutos control que fueron los frutos no irradiados (Zhao *et al.*, 1996). Por otra parte, una

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

de las principales ventajas del método de la irradiación gamma es que es un tratamiento físico que no deja residuos en la fruta y puede ayudar a reducir el uso de fungicidas postcosecha. Cia *et al.* (2007), informaron que las dosis de 0,75 y 1 kGy podría presentar efectos directos e indirectos sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Las características físico-químicas cambiaron y favorecieron la firmeza del fruto de papaya, en comparación con los controles y la penetración del hongo para su colonización fue más difícil. Zhao *et al.* (1996), mostraron que la irradiación de 0,5 a 1 kGy a 25-30% en estadio de madurez amarillo redujo la polimerización de enzimas pépticas provocando una textura más firme, y en el estado de madurez llegó a una reducción de dos días la etapa de madurez en comparación de frutos control, pero llegaron a la conclusión de que la irradiación no tuvo ningún efecto directo sobre la firmeza de las papayas y actuó mediante la alteración de la síntesis de maduración inducida de las enzimas de la pared celular, la pectin metil esterasa, principalmente. Sin embargo, el mayor obstáculo en el uso de la irradiación para tratamiento de postcosecha es el alto costo y los prejuicios de los consumidores en contra de los alimentos irradiados (Teixeira *et al.*, 2007).

Reportan un grupo de autores Sivakumar *et al.* (2002) una gran diversidad de materiales que se están probando para usarse como alternativas a los productos químicos para el control de las enfermedades de papaya durante el almacenamiento. Un ejemplo es la utilización de compuestos catalogados como seguros (GRAS) contiene en su formulación el carbonato de amonio (3%), a base de cera de parafina; señalan que redujo la incidencia de antracnosis en un 70% y las frutas tratadas se mantuvieron en una calidad general durante el almacenamiento.

Por otra parte la aplicación de Quitosano (2% y 3%) mostró efecto fungicida contra *C. gloeosporioides* (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Sin embargo, el quitosano (1%) en combinación con sales de carbonato de amonio (3%) redujo significativamente la incidencia de la antracnosis y el restablecimiento de *C. gloeosporioides* sobre el fruto de papaya naturalmente infectados, en comparación con la fruta no tratada. Los frutos tratados fueron de calidad de consumo aceptable (Sivakumar *et al.*, 2005). Investigaciones similares

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

fueron hechas por otros (Hewajulige *et al.*, 2007). El modo de acción de las sales de carbonato en el hongo se dio por el colapso, la contracción de las hifas y la inhibición de la esporulación, debido a la reducción de la presión celular ocasionando disminución de la turgencia (Aharoni *et al.*, 1997). Bautista-Baños *et al.* (2003), también informó que el quitosano tuvo un efecto terapéutico protector sobre la papaya, dicho compuesto fue más efectivo cuando se aplicó antes de la inoculación de *C. gloeosporioides* que después de que el patógeno se estableció. Cabe destacar que el tratamiento con quitosano en el interior de la papaya aumentó las concentraciones de CO₂, retrasando la maduración y el desarrollo de color, dando como resultado firmeza y una mejor conservación de la fruta causado una menor pérdida de peso (Sivakumar *et al.*, 2005). Esta tecnología se podría adoptar para proteger la papaya recién cosechada, especialmente durante el transporte marítimo, por lo menos a los destinos en un lapso de 14 días desde el sitio de la cosecha (Sivakumar *et al.*, 2005). Sin embargo, se necesita más investigación para evaluar el efecto de la aplicación de quitosano antes de la cosecha para el control efectivo de la antracnosis.

Palhano *et al.* (2004) sugirieron el uso combinado de aceites esenciales del limón (*Citrus citratus*), donde la alta presión hidrostática podría limitar la infección por hongos en frutos de papaya en postcosecha. La investigación también se centró en el uso del quitosano en postcosecha en frutos de papaya para prevenir la transmisión de fruta a fruta del agente causal de la antracnosis. A pesar de que *C. gloeosporioides* entra en los frutos de papaya por penetración directa en el campo, la infección de antracnosis en postcosecha es resultado de una infección latente. Durante el transporte y almacenamiento, *C. gloeosporioides* puede propagarse rápidamente de frutos infectados a frutos sanos por contacto directo (Chau y Álvarez, 1983). Por lo tanto, la presencia de una capa de quitosano con carbonato de amonio en la superficie de la fruta puede prevenir la enfermedad de la fruta por transmisión de fruta a fruta, actuando como una barrera física.

Frutos de papaya cv. *Sunrise* expuestos a tratamientos con vapor de metil jasmonato (10-4 o 10-5 M) durante 16 h a 20°C mostraron menor deterioro causado por hongos, así como menor daño por enfriamiento y pérdida de firmeza durante el almacenamiento de 14 a 32 días a 10°C. Se obtuvo una vida útil de 4 días a 20°C. La calidad postcosecha de papaya se mantuvo de manera significativa mediante la combinación de tratamientos con metil

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

jasmonato (10^{-5} M) y una atmósfera modificada (AM), cubierta por una película de polietileno de baja densidad. De acuerdo con González-Aguilar *et al.* (2003) la AM creada (3-6 kPa O₂ y 6-9 Pa CO₂) en el interior de la cubierta no desarrolló mal sabor en el fruto durante el almacenamiento a 10°C. Yahia y Paull (1997) también confirmaron que la composición del gas de 3-6 kPa O₂ y 6-9 Pa CO₂ dentro de la cubierta durante el almacenamiento de la papaya a 10°C, está dentro del rango de concentraciones que no influyen negativamente la calidad postcosecha de frutos. Sin embargo, se requiere mayor investigación al respecto, relacionado con condiciones ambientales, de traslado, de contenedores adecuados y de la composición del gas a utilizar durante el transporte de las diferentes variedades de papaya.

Un factor determinante de calidad postcosecha es la pérdida de peso, en este sentido Paull y Chen (1989) reportaron que las pérdidas de peso disminuyeron el 8%, aumentando considerablemente la calidad postcosecha de papaya. Sin embargo, el envolver el fruto con una película polimérica y el encerado en la papaya (Paull y Chen, 1989) o el revestimiento con quitosano Sivakumar *et al.* (2005) demostraron con éxito reducir la pérdida de agua y el marchitamiento de los frutos. Mosca y Durigan (1995) concluyeron que el tratamiento con cera y cera más benomilo en las condiciones ambientales no influyen en la conservación de frutas, mientras que las bolsas de plástico con vacío parcial y refrigeración aumentaron su tiempo de vida útil de 19 días. Chauhan *et al.* (2006) describieron los efectos sinérgicos de la infiltración de calcio, la acidificación a (4,5) y la presencia de las asociaciones de la calidad de conservación y mantenimiento de textura óptima de papaya pre cortada en rodajas. A este respecto Kakaew *et al.* (2007) aplicaron una solución al 0.5% de cloruro de calcio en agua caliente a 25 o 40° C para papayas en estado verde rallado. Después del tratamiento, se almacenaron trozos de fruto a 4° C. La pérdida de peso, superficie de color (luminosidad y el valor de tono), la firmeza, la tasa de respiración y la evaluación sensorial se determinó cada 2 días durante un total de 10 días de almacenamiento. Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación de un baño de calcio

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

a temperaturas altas, permitió la disminución de la tasa de respiración, mejoró el color de la superficie, la firmeza, contribuyó a la reducción de pérdida de peso de la papaya verde rallada. Los resultados indican que el cloruro de calcio podría mantener la calidad y prolongar la vida útil de papaya picada, especialmente a mayor temperatura de inmersión. De igual manera Srilaong y Chansamrankul (2007) encontraron que, utilizando el mismo cultivar, envasado en una bolsa de polietileno con cierre climatizada y una recubierta en bolsa de nylon de polietileno laminado enjuagado con 2.5 y 5% de O₂ fueron más efectivos que el control porque mantuvo una mejor textura y color.

La tendencia mundial está cambiando hacia la disminución del uso de fungicidas, cada vez está aumentando el interés público y científico en buscar alternativas más seguras y respetuosas del medio ambiente para reducir las enfermedades que causan la pérdida de los productos cosechados (Mari *et al.*, 2007).

1.9 Control biológico

Muchas definiciones se han propuesto para el término de control biológico de enfermedades, sin embargo una de las más aceptadas es la propuesta por Cook y Baker (1983), quienes definieron el control biológico como; “la reducción de la cantidad de inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno por medio de uno o más organismos diferentes al hombre”. La actividad productora de enfermedad involucra desarrollo, infectividad, agresividad, virulencia y otras cualidades del patógeno, o procesos que determinan infección, desarrollo de síntomas y reproducción. A esta definición se le ha agregado también la resistencia de las plantas hospederas, como uno de los mejores y más efectivos métodos de control biológico (Cook, 1985).

Entre los diferentes métodos biológicos, el uso de los microorganismos antagonistas como levaduras, hongos y bacterias es muy prometedor y cada vez está aumentando su uso (Droby, 2006; Korsten, 2006).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

En cuanto a la utilización de productos de control biológico (PCB), para el control de la Antracnosis, la aplicación combinada del agente de biocontrol *Candida oleophila* en una mezcla con cera de bicarbonato de sodio para el recubrimiento de frutos de papaya dio lugar a un importante y aceptable control comercial contra la Antracnosis (Gamagae *et al.*, 2003).

1.9.1 Enfoques básicos para el uso de los microorganismos antagonistas

Hay dos enfoques básicos para el uso de los antagonistas microbianos para el control de las enfermedades de postcosecha de frutas y verduras: (1) El uso de microorganismos que ya existen en las frutas y verduras, para que puedan ser promovidos y dirigidos; ó (2) que puedan ser introducidos artificialmente en contra de los agentes patógenos de postcosecha.

1.9.1.1 Microorganismos antagonistas naturales

Los antagonistas naturales son los que están presentes de forma natural en la superficie de frutas y verduras, posteriormente a su aislamiento, los microorganismos antagonistas se utilizan para el control de las enfermedades postcosecha (Sobiczewski *et al.*, 1996).

1.9.1.2 Microorganismos antagonistas introducidos artificialmente

Los microorganismos antagonistas introducidos artificialmente suelen ser más eficaces en el control de las enfermedades postcosecha de frutas y verduras que otros medios de control biológico. Muchos microorganismos antagonistas han sido identificados e introducidos artificialmente para el control de enfermedades en una amplia variedad de productos cosechados, como en cítricos, pomáceas, frutas de semilla y hortalizas. En la Tabla 3 se muestran los microorganismos antagonistas que se han estudiado y han sido efectivos para el control de la enfermedad de Antracnosis de frutas y verduras (Sharma *et al.*, 2009).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Tabla 3. Microorganismos antagonistas utilizados en un control biológico exitoso contra la antracnosis postcosecha de frutas y verduras

Microorganismos antagonistas	Enfermedad patógena	Frutas y Vegetales	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i> (Weigmann) Verhoeven	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) y la pudrición de la parte final del tallo (<i>Dothiorella gregaria</i> Sacc.)	Mango	Govender <i>et al.</i> (2005)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Antracnosis (<i>Colletotrichum musae</i>) Pudrición de la parte final de la flor (<i>Colletotrichum musae</i>)	Plátano	De Costa y Erabadupitiya, (2005)
<i>Brevundimonas diminuta</i> (Leifson & Hugh) Segers	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Mango	Kefialew y Ayalew, (2008)
<i>Candida membranifaciens</i> Hansen	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Mango	Kefialew y Ayalew, (2008)
<i>Candida oleophila</i>	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Papaya	Gamagae <i>et al.</i> (2003)
<i>Pichia guilliermondii</i>	Antracnosis (<i>Colletotrichum capsici</i> (Syd.) Butler & Bisby)	Chile	Chanchaichaovivat <i>et al.</i> (2007)
<i>Pestalotiopsis neglecta</i> (Thuemen) Steyaert	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	Albaricoque	Adikaram y Karunaratne, (1998)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Antracnosis (<i>Colletotrichum musae</i>)	Plátano	Devi y Arumugam, (2005)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

El éxito de algunos microorganismos antagonistas en estudios de laboratorio y en pruebas a nivel piloto; en empacadoras han generado el interés de varias empresas de agroquímicos en el desarrollo y la comercialización de bioproductos que contengan microorganismos antagonistas para el control de las enfermedades de postcosecha de frutas y verduras. Algunos microorganismos antagonistas han sido patentados y evaluados con fines de uso comercial, de los cuales, ASPIRE[®], YieldPlus[®] y BIOSAVE 110[®] se utilizan en todo el mundo para el control de enfermedades de postcosecha de frutas y hortalizas con eficacia (Sharma *et al.*, 2009).

1.9.2 Mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas

Diversas investigaciones sobre el uso de los microorganismos antagonistas han sido reportadas (Janisiewicz *et al.*, 2000; El-Ghaouth *et al.*, 2004), sin embargo, los mecanismos por los cuales los microorganismos antagonistas ejercen influencia sobre los patógenos todavía no ha sido plenamente comprendidos.

Es importante comprender el mecanismo de acción de los microorganismos antagonistas porque, esto ayudará en el desarrollo de algunos medios adicionales y procedimientos para mejorar los resultados de los antagonistas ya conocidos, así como también a la selección más eficaz y deseada de cepas de antagonistas (Sharma *et al.*, 2009).

Varios mecanismos de acción se han propuesto para explicar cómo funcionan los antagonistas microbianos. Sin embargo, la competencia de nutrientes y el espacio entre el patógeno y el antagonista son considerados como los principales mecanismos de acción; por los cuales los agentes microbianos logran el control de los patógenos causantes de enfermedades postcosecha (Hipólito *et al.*, 2000; Jijakli *et al.*, 2001). Otros mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas para suprimir la actividad de los agentes patógenos de postcosecha de frutas y hortalizas es la producción de antibióticos, el parasitismo directo, y la resistencia inducida (Janisiewicz *et al.*, 2000; Barkai-Golán, 2001; El-Ghaouth *et al.*, 2004).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

1.9.2.1 La competencia por espacio y nutrientes

La competencia por nutrientes y por espacio entre microorganismos antagonistas y patógenos es considerada el principal mecanismo de acción para la reducción de las poblaciones de patógenos en frutas y hortalizas (Droby *et al.*, 1989; Wilson y Wisniewski, 1989). Para competir con éxito con el patógeno en el sitio de la herida, los microorganismos antagonistas deben tener mejor adaptación a las diversas condiciones ambientales y nutricionales donde se desarrolla el patógeno (Barkai y Golán, 2001; El-Ghaouth *et al.*, 2004).

1.9.2.1.1 Competencia por espacio

La colonización rápida en las heridas de las frutas por el antagonista es fundamental para el control de las enfermedades, y las manipulaciones que conducen a una mejor colonización tienen mejores efectos de biocontrol (Mercier y Wilson, 1994). Por lo tanto, los microorganismos antagonistas deben tener la capacidad de crecer más rápidamente que el agente patógeno. Del mismo modo, deben tener la capacidad de sobrevivir incluso en condiciones desfavorables para el patógeno (Droby *et al.*, 1992). En la mayoría de las veces existe una relación inversa entre la concentración del antagonista y el patógeno; es decir, conforme se incrementa la concentración del antagonista, la concentración del patógeno se reduce (Sharma *et al.*, 2009).

1.9.2.1.2 Competencia por nutrientes

Varios trabajos de investigación realizados sobre este mecanismo de acción de microorganismos antagonistas, apoya la hipótesis de que la competencia por los nutrientes es el mecanismo de acción de mayor importancia (Droby *et al.*, 1992; Arras *et al.*, 1998;

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Wisniewski *et al.*, 1989; Roberts, 1990a; Castoria *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Saravanakumar *et al.*, 2008). La competencia por nutrientes, desempeña un papel importante en la capacidad de control biológico contra el patógeno. Se ha demostrado a través de estudios “*in vitro*” que los microorganismos antagonistas absorben más rápidamente los nutrientes que los agentes patógenos y al establecerse más rápido; inhiben la germinación de las esporas de los patógenos en el sitio de la herida (Sharma *et al.*, 2009).

1.9.2.1.3 Adhesión (*conexión directa de antagonismo*)

Adhesión de los microorganismos antagonistas a las hifas del patógeno es un factor importante y necesario para la competencia por los nutrientes como se muestra por las interacciones de *Enterobacter cloacae* (Jordania) Hormaeche y Edwards y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Lind (Wisniewski *et al.*, 1989), y *Pichia guilliermondii* Wickerham y *Penicillium italicum* Wehmer (Arras *et al.*, 1998). Algunos estudios que se llevaron a cabo “*in vitro*” revelaron estas interacciones, debido a que los microorganismos antagonistas como bacterias y levaduras dirigen las adhesiones, porque toman los nutrientes más rápidamente que los agentes patógenos y por lo tanto impiden la germinación de esporas y el crecimiento de los patógenos (Droby *et al.*, 1989; Droby *et al.*, 1998; Wisniewski *et al.*, 1989).

1.9.2.1.4 Las poblaciones de los antagonistas microbianos

El nivel de control previsto por los antagonistas microbianos depende de la concentración inicial de los antagonistas aplicados en el sitio de la herida y la capacidad del antagonista para colonizar rápidamente el sitio de la herida (Janisiewicz y Roitman, 1988; Wisniewski *et al.*, 1989; Mc Laughlin *et al.*, 1990). En general, los microorganismos antagonistas son más eficaces contra el deterioro postcosecha de las frutas y verduras cuando se aplica a una concentración alta de 10^7 a 10^8 UFC / mL (Mc Laughlin *et al.*, 1990; El-Ghaouth *et al.*, 2004). Los estudios respecto a la especificidad de la competencia entre antagonistas y patógenos en las heridas de las frutas es cada vez más abundante. El conocimiento de la genética de los antagonistas va en aumento y actualmente es posible desarrollar

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

microorganismos antagonistas con una mayor tasa de transporte y/o el metabolismo capaz de limitar la absorción de nutrientes esenciales de los patógenos. Esto podría permitir eludir algunas de las limitaciones de los microorganismos antagonistas (Sharma *et al.*, 2009).

1.9.3 Producción de antibióticos

La producción de antibióticos es el segundo mecanismo más importante de los microorganismos antagonistas para suprimir a los patógenos de la cosecha de frutas y verduras. Por ejemplo, las bacterias antagonistas como *B. subtilis* y *Pseudomonas cepacia* Burk, tienen la capacidad de matar a los patógenos mediante la presencia de antibióticos (Gueldner *et al.*, 1988; Pusey, 1989). *P. cepacia* inhibió el crecimiento de patógenos en postcosecha como *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzana mediante la presencia del antibiótico pyrrolnitrina (Janisiewicz y Roitman, 1988; Janisiewicz *et al.*, 1991). *P. cepacia* también fue eficaz en el control del moho verde (*Penicillium digitatum*) en limón (*Citrus limon* L.) mediante la producción de antibióticos (Smilanick y Denis-Arrue, 1992).

La antibiosis podría ser una herramienta eficaz para el control de enfermedades postcosecha en algunas frutas y verduras. En la actualidad se está haciendo hincapié en desarrollar microorganismos antagonistas que produzcan antibióticos para el control de enfermedades postcosecha de frutas y hortalizas (El Ghaouth *et al.*, 2004; Singh y Sharma, 2007).

1.9.4 Parasitismo directo

En la literatura hay poca información sobre el parasitismo directo de los microorganismos antagonistas para el control de enfermedades postcosecha en frutas y verduras. Sin embargo, Wisniewski *et al.* (1991) observaron que las células de *Pichia guilliermondii* tenían la capacidad de unirse a las hifas de *Botrytis cinerea* y *Penicillium*, causando una hinchazón en el hongo. Del mismo modo, *Candida saitoana* Nakase y Suzubi se une fuertemente a las hifas de *Botrytis cinerea* lo que causó hinchazón de las hifas del agente patógeno (El-Ghaouth *et al.*, 1998). Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

de producir enzimas líticas como glucanasas, quitinasas, y proteasas que ayudan a la degradación de la pared celular de los hongos fitopatógenos (Castoria *et al.*, 2001; Chernin y Chet, 2002). Bonaterra *et al.* (2003) informaron que el parasitismo directo fue un factor importante lo que permitió a *Pantoea agglomerans* (Ewing y Fife) controlar a *Monilinia laxa* (Aderh. y Ruhl.) o *Rhizopus stolonifer* de la pudrición de frutas de semilla.

1.9.5 Resistencia inducida en la planta

Se ha sugerido que otro mecanismo de acción de los microorganismos antagonistas es por inducción de respuestas de defensa en los frutos y hortalizas cosechados hacia enfermedades postcosecha (Ippolito *et al.*, 2000). Por ejemplo, *Cryptococcus saitoana* induce la actividad de la quitinasa y forma una barrera estructural (papilas) en las paredes de la célula huésped contra *Penicillium expansum* en frutos de manzana (El-Ghaouth *et al.*, 1998). Del mismo modo, *Aureobasidium pullulans* causó un aumento en la actividad transitoria de las enzimas 1,3-glucanasa, peroxidasa y quitinasa formadas en las heridas de la manzana, que estimulan la cicatrización de las mismas en los procesos o mecanismos de defensa inducidos contra *Penicillium expansum* (Ippolito *et al.*, 2000). También hay estudios sobre la respuesta de inducción de resistencia a las enfermedades en piña y cítricos (Tong y Rohrbock, 1980; Arras, 1996). Algunos microorganismos antagonistas tienen la capacidad de proporcionar una resistencia inducida sobre las enfermedades en la cosecha por la producción de compuestos antifúngicos, como es el caso del aguacate (*Persea americana* Mill) y frutas (Prusky *et al.*, 1994; Yakoby *et al.*, 2001). La producción de compuestos antifúngicos por los antagonistas microbianos ayuda a las células huésped en la inducción de mecanismos de defensa y, así mismo en control biológico en los productos cosechados. Aunque una relación causal de conexión entre la acumulación de las respuestas de defensa del huésped y de bioprotección por levaduras antagónicas aún no ha sido claramente establecida, pero la aparición de altos niveles de compuestos antifúngicos producidos en el tejido sugieren su implicación en la resistencia de las enfermedades (Sharma *et al.*, 2009).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Se necesitan más estudios detallados sobre la influencia de los microorganismos antagonistas en la inducción de respuestas de defensa en la bioprotección en las plantas. En las heridas de los frutos, algunos microorganismos antagonistas producen a menudo una gran cantidad de mucílago extracelular a lo largo de las paredes de la célula huésped. Se cree que este mucílago extracelular está implicado en la adhesión celular y así puede contener elicitores químicos activos que proporcionan las señales de las respuestas de reconocimiento, proporcionando mecanismos de defensa. Los fragmentos de oligosacáridos funcionan como elicitores que inducen la respuesta de defensa de la pared celular de las levaduras en respuestas de defensa del huésped. Aunque los resultados de estas tecnologías son alentadores, es necesario seguir estudiando el potencial de sus usos a una escala comercial en todo el mundo (Sharma *et al.*, 2009).

Con base en la importancia del control biológico, se pretende buscar alternativas biológicas, que reduzcan la aplicación de agroquímicos.

2. HIPÓTESIS:

Existen bacterias antagonistas en la filosfera de papaya que controlan cepas de *Colletotrichum* que causan Antracnosis.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVOS GENERALES:

Obtener aislados bacterianos de la filosfera de papaya con potencial biocontrolador contra *Colletotrichum* sp. en frutos papaya

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Seleccionar *in vitro* bacterias del filoplano y fructoplano de papaya con actividad controladora de *Colletotrichum* sp.

Identificar bacterias del filoplano y fructoplano de papaya con actividad controladora de *Colletotrichum* sp.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

4.1 Descripción del sitio de muestreo

El material vegetal se obtuvo de huertas del municipio de Tecomán Estado de Colima, localizadas al sureste del Estado entre las coordenadas 103° 59' a 103° 73' de longitud Oeste y 18° 41' 20" a 19° 06' de latitud Norte. Limita al Norte con los municipios de Coquimatlán y Colima, al Sur con el Océano Pacífico, al Este con el Municipio de Ixtlahuacán, al Oeste con el de Armería y al Sureste con el Estado de Michoacán. Está situado a 33 msnm. La distancia aproximada de la cabecera municipal a la capital del Estado es de 46 km. En el municipio de Tecomán predominan los climas semisecos muy cálidos: al norte y centro del municipio con clima cálido y al sur con clima cálido subhúmedo. La temperatura media anual es de 26 °C, con una precipitación media anual de 484.9 mm siendo el régimen de lluvias, principalmente en verano (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Colima 2005).

4.2 Material vegetal y aislamiento del fitopatógeno

Se obtuvieron 30 muestras de hojas, 30 de flores de papaya en estado joven y 30 muestras de frutos de papaya en estado verde, las cuales fueron utilizadas para el aislamiento de bacterias antagonistas.

El aislamiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum*, agente causal de la antracnosis se hizo a partir de 30 muestras de frutos maduros de papaya, con síntomas típicos de la enfermedad (manchas acuosas de color naranja-rosado también de color marrón-negro en forma de anillos concéntricos).

4.3 Aislamiento de bacterias antagonistas

El aislamiento de bacterias antagonistas a *Colletotrichum* se hizo a partir de tejido foliar, flores y frutos. En los dos primeros casos el tejido se asepticizó por inmersión en alcohol al 30% por 30 s, enseguida con hipoclorito al 10% por 3 min, se lavó con agua estéril, se trató con cloramina T al 0.1% por 1 min, y se lavó con agua estéril; posteriormente, se hicieron cortes de 1 x 1 cm y se sembraron por triplicado en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (apéndice I). Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C por 48 h. Finalmente, las colonias se purificaron en agar nutritivo.

Para aislar las bacterias del fruto, se desinfectó la superficie del mismo con hipoclorito de sodio al 1%. Se colocó una muestra de 50 g de tejido en tubos con 10 mL de agua esterilizada, se mantuvieron en agitación por 24 h a 28 ± 2 °C. Se hicieron diluciones (10^{-1} – 10^{-6}) con agua destilada estéril y se tomaron alícuotas de 0.5 mL que se sembraron por triplicado en agar nutritivo y se incubaron a 28 ± 2 °C por 24 h. Posteriormente las colonias se purificaron en agar nutritivo (Dikin *et al.*, 2002; Monteallegre *et al.*, 2003).

4.4 Aislamiento de Colletotrichum

El hongo fue aislado de papayas maduras con síntomas característicos de antracnosis. Se tomó el acérvulo directamente de la lesión, se sembró en medio PDA y se incubó a 28 ± 2 °C por 24 h; posteriormente, se resembró por corte de hifa en medio PDA y se incubó a 28 ± 2 °C por 24 h. Se preparó una suspensión de tejido vegetativo del hongo en 3 mL de agua destilada estéril, se agitó en el vortex y se inoculó en PDA utilizando un Sembrador Automático (Spiral Biotech, Modelo Autoplate 4000, Serie APA A 241). Se incubó a 28 ± 2 °C durante 72 h, posteriormente se resembró nuevamente por corte de hifa en medio PDA por triplicado y se incubó a 28 ± 2 °C por 15 días.

4.5 Caracterización morfológica del patógeno

4.5.1 Microcultivo para identificación de estructuras fúngicas

Se depositó un cubo de medio de PDA de 1 cm sobre un portaobjetos previamente estéril. Se sembró el hongo en sus bordes por picadura y se depositó un cubreobjetos previamente estéril, todo está apoyado sobre dos varillas de vidrio, dentro de una caja de Petri en cuyo fondo se colocó papel absorbente estéril embebido en glicerol estéril. Se incubó a 28 ± 2 °C por 72 h para su identificación. Después de observar el crecimiento, se inactivó al hongo (*Colletotrichum*) por refrigeración a -4 °C y se retiró el cubreobjetos para colocarlo en un portaobjetos con una gota de colorante azul de tripano para la observación al microscopio de las estructuras características de fructificación del hongo *Colletotrichum* denominadas conidios (Dade y Gunnell, 1969). La Figura 4 muestra un esquema de la técnica de microcultivo de hongos.

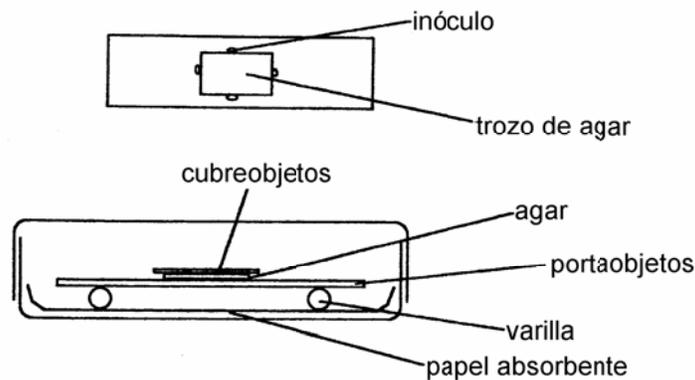


Figura 4. Esquema de la técnica de microcultivo de hongos

4.5.2 Tasa de crecimiento radial del micelio

Se tomó un disco de 5 mm de diámetro del cultivo de la periferia de cada colonia de cada aislado, se colocó en el centro de la placa Petri de 9 cm de diámetro con PDA. Las placas fueron incubadas a 28 ± 2 °C y se midió el diámetro para la colonia de cada aislado en cultivo cada 24 h a partir del primer día hasta los 7 días que el crecimiento cesó. También se registró la coloración de la colonia (Elósegui e Ibis, 2010).

Para el análisis de datos se realizó un análisis de varianza ANVA y se separaron las medias mediante Tukey de una sola vía con un nivel de significancia del 5% empleando el programa estadístico SAS versión 9.0.

4.6 Identificación de Colletotrichum por polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

La detección de polimorfismo mediante análisis de PCR-RFLP de la región ITS del ADNr ha sido utilizada con éxito para la identificación de diversas especies de hongos (Amicucci *et al.*, 1996). Por otro lado, el análisis de polimorfismo de longitud de la región ITS seguido por endonucleasas de restricción es un método preciso. El análisis de RFLP de la región ITS ha sido sugerido por varios autores como un medio para discriminar entre hongos a nivel de especie (Gardes *et al.*, 1991; Bruns *et al.*, 1991).

La extracción de ADN de los aislamientos de hongos fitopatógenos (*Colletotrichum*) procedentes de fruto maduro de papaya, se realizó por el método reportado por Dellaporta *et al.* (1983) (apéndice II). La integridad del DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa (UltraPure™ Agarosa, Invitrogen life technologies, Accesolab) al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Se utilizó para identificación, la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del fragmento comprendido entre ITS-5.8S-ITS; con los primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) (Figura 5).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

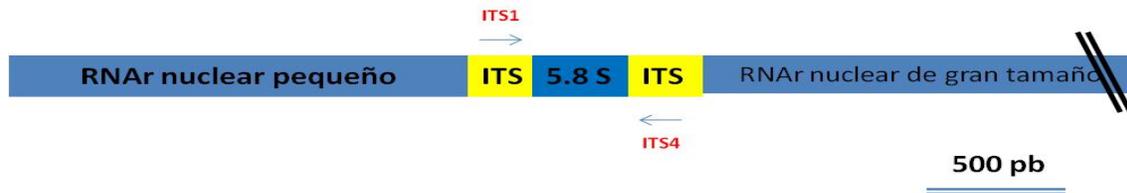


Figura 5. Regiones ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

La mezcla de reacción de PCR consistió en: agua ultrapura esterilizada, 18.6 μL ; solución reguladora de PCR 10xPCR, 3 μL ; MgCl_2 50mM, 1.2 μL ; dNTPs 2 mM, 3 μL ; iniciadores ITS1 e ITS4 20 μM / μL cada uno, 1.5 μL por iniciador; Taq DNA polimerasa 5 U/ μL (Invitrogen Brazil, Accesolab), 0.2 μL ; y la muestra problema de ADN 100 ng, 1 μL , con volumen final de 30 μL .

La reacción se efectuó en un termociclador (Corbett Research, Mod. CG1-96) bajo las siguientes condiciones:

CONDICIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	1 min	30
Alineamiento	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	5 min.	
FINAL	4°C	-	1

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (UltraPure™ Agarosa, Invitrogen life technologies, Accesolab) al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y fotografiado en un fotodocumentador UV Gel Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). El tamaño de los fragmentos fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular de 1 kb (1 kp DNA ladder, Invitrogen) utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

4.7 Digestión enzimática de los productos de amplificación para agrupación por RFLP

De las regiones amplificadas se tomaron alícuotas de 5 μ L del producto de PCR y se digirieron con 1 U de enzima de restricción en 10 μ L de volumen de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Hpa* II, *Hae* III, *Hinf* I y *Alu* I (Invitrogen) con el buffer de reacción que indica el proveedor. La reacción fue incubada a 37°C por 2 h y los productos de restricción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (UltraPure™ Agarosa, Invitrogen life technologies, Accesolab) al 3% a 60 v durante 1.5 h, en TBE 0.5x.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Steinheim, Alemania) y fotografiado en un fotodocumentador UV GelDoc system (Bio-Rad). El tamaño de los fragmentos fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA ladder, Invitrogen) y con el software Quantity One (Bio-Rad).

4.8 Identificación molecular de los hongos

El producto de PCR del DNA de los aislados de hongos se purificó con el kit Pure Link™ Quick Gel Extraction (catálogo K2100-12, K2100-25), según el protocolo de la compañía. La calidad del fragmento purificado se verificó por electroforesis analítica y se procedió a ajustar la cantidad de DNA a 500ng/ μ L para secuenciar. La secuenciación se realizó, utilizando los primers ITS 1 e ITS 4 con el kit terminador Bigdye (ABI), en el departamento de Servicios Genómicos de LANGEBIO. La comparación de las secuencias fue obtenida con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en línea Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Con el programa Geneious Versión 5.0 se realizó el análisis de las secuencias y se buscó el sitio de corte de cada una de las enzimas para realizar un análisis “*in silico*” de las secuencias, obteniendo el número y tamaño de los fragmentos generados por cada una de las enzimas.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

4.9 Prueba de antagonismo

Las pruebas de antagonismo se realizaron por confrontación directa. Se colocó en placa petri en medio PDA, un disco de 5 mm de micelio del hongo previamente propagado en PDA a 28 ± 2 °C, alrededor del hongo se sembraron con la punta de un palillo estéril, las cepas bacterianas a probar. Una vez inoculadas las placas se incubaron a 28 ± 2 °C por 72 h y se registró la formación de halos inhibitorios del hongo a su alrededor. Después del periodo de incubación se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PIRG por sus siglas en ingles), de acuerdo a la siguiente formula (Rahman *et al.*, 2007):

$$PIRG: \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

Donde;

R1 = Es el crecimiento radial de *Colletotrichum* en la placa control

R2 = Es el crecimiento radial de *Colletotrichum* al interactuar con las bacterias antagonistas

Las pruebas de antagonismo se realizaron primeramente con uno de los ocho aislados de *Colletotrichum*, contra las bacterias previamente aisladas y purificadas de hojas, flores y frutos de papaya. Posteriormente se seleccionaron 9 aislados bacterianos con la mayor capacidad antagonista y 3 cepas control, se procedió a confrontar por triplicado con los grupos formados de los aislados de *Colletotrichum*.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

4.10 Identificación de aislados bacterianos

Se realizó un lisado celular calentando a 65°C por 15 min del cultivo, se disolvió en 50 µL de agua destilada esterilizada, de este tratamiento se tomó 1 µL para realizar la PCR, utilizando primers bacterianos del gen ribosomal 16S, los cuales fueron: fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y rD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC). La mezcla de reacción de PCR constó de agua ultrapura estéril, 18.6 µL; solución reguladora 10xPCR, 3 µL; MgCl₂ 50mM, 1.2 µL; dNTPs 2 mM, 3 µL; iniciadores fD1 e Rd1 20 pMol/ µL cada uno, 1.5 µL por iniciador; Taq DNA polimerasa 5 U/µL (Invitrogen Brazil, Accesolab), 0.2 µL; y la muestra problema de ADN lisado 1 µL, con volumen final de 30 µL.

La reacción se efectuó en un termociclador (Corbett Research, Mod. CG1-96) bajo las siguientes condiciones:

CONDICIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95 °C	10 s	1
Desnaturalización	95 °C	1 min	30
Alineamiento	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión final	72 °C	7 min.	
FINAL	4°C	-	1

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa (UltraPure™ Agarosa, Invitrogen life technologies, Accesolab) al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), los fragmentos de agarosa; donde se encontraba el producto de PCR fueron cortados y pesados; posteriormente el producto de PCR se purificó con el kit Pure Link™ Quick Gel Extraction (catálogo K2100-12, K2100-25), según el protocolo de la compañía. La calidad del fragmento purificado se verificó por electroforesis analítica y se procedió a ajustar la cantidad de DNA para secuenciar. La secuenciación se realizó, utilizando los primers fD1 y rD1 con el kit terminador Bigdye (ABI) en el departamento de Servicios Genómicos de LANGEBIO. La comparación de las secuencias fue realizada con

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en línea Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La identificación del microorganismo se eligió de acuerdo al porcentaje de mayor cobertura de la secuencia y a la mayor similitud de la máxima Identidad.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento y caracterización de *Colletotrichum* sp.

Se obtuvieron 53 aislados de *Colletotrichum* a partir de papaya madura con lesiones típicas de la antracnosis, las cuales eran redondeadas y acuosas. En las lesiones hundidas se encontraban masas de conidios de color naranja-rosado o marrón-negro cubriendo la lesión y en algunas ocasiones se formaba el patrón característico de anillos concéntricos (Teixeira *et al.*, 2007). En la figura 6 se muestran las lesiones encontradas en los frutos de donde se obtuvieron los aislados fúngicos.



Figura 6. Lesiones causadas por *Colletotrichum* sp. en frutos de papaya cultivada en Tecomán, Colima.

De acuerdo con las observaciones microscópicas, los aislados fúngicos fueron clasificados dentro del género de *Colletotrichum*.

En los aislados se identificaron las estructuras de conidias hialinas curvadas y fusiformes (Figura 7A y B), clamidosporas (Figura 8), hifas (Figura 9) y la formación de apresorios de formas variables desde ovales, irregulares y lobuladas (Figura 10A, B y C).

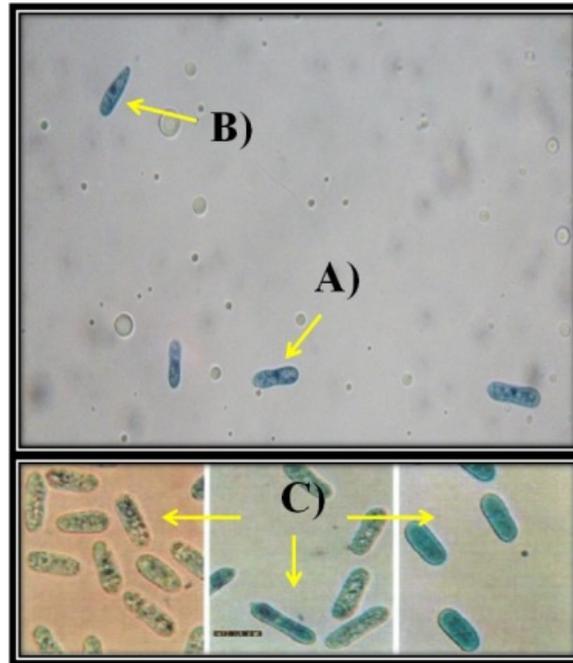


Figura 7. Morfología microscópica de estructuras de fructificación: Conidias unicelulares hialinas curvadas (A) y fusiformes (B) de *Colletotrichum* spp. aislados de papaya, teñidas con azul de tripano (45X) (Fotos V. Núñez). C) Conidias de *Colletotrichum gloeosporioides* crecidas en medio de cultivo solido harina de maíz agar; aislamientos de frutos de guayaba, Barra=10 μ M (Fotos Gutiérrez *et al.*, 2002).

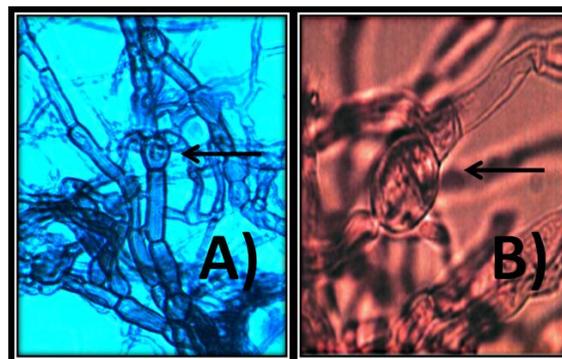


Figura 8. Morfología microscópica de estructuras de *Colletotrichum* spp. A) clamidosporas y micelio septado de los aislamientos obtenidos, teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); B) Microfotografía de referencia de clamidosporas de *Colletotrichum* spp. (Oliveira *et al.*, 2005).

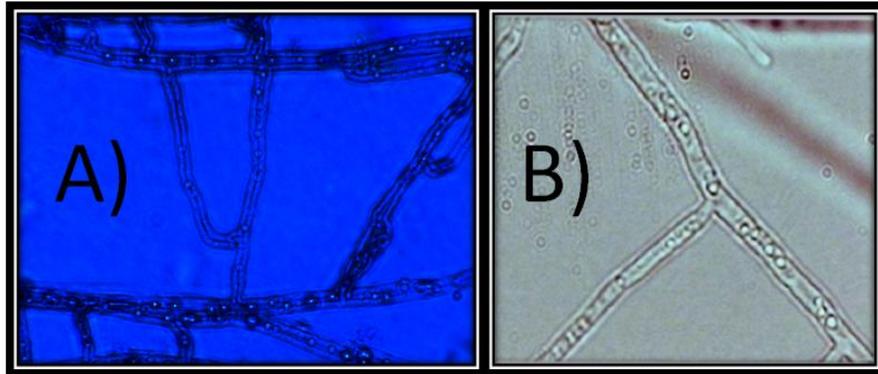


Figura 9. Morfología microscópica de estructura de A) hifas teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); B) Microfotografía de referencia de hifas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Rodríguez *et al.*, 2004).

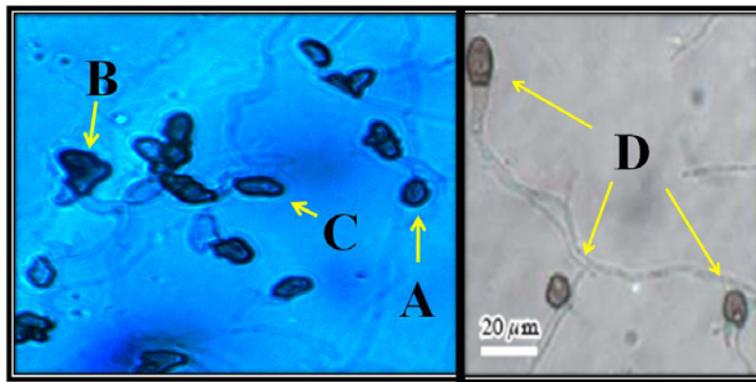


Figura 10. Morfología microscópica de estructuras de fructificación: Apresorios de formas variables desde ovales (A), irregulares (B) y lobuladas (C) de los aislados de *Colletotrichum*, teñidas con azul de tripano, observadas a 45X (Foto V. Núñez); D) Microfotografía de referencia de apresorios café presentes en tres especies de *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides*, *C. orbiculare* y *C. fragariae* (Villanueva *et al.*, 2008).

Se observó una variedad de características morfológicas, que no permitieron la identificación a nivel de especie de los aislados fúngicos de *Colletotrichum* y por tal motivo se hizo uso de técnicas moleculares.

5.2 Grupos de aislados de *Colletotrichum* spp.

Para discriminar los diferentes aislados correspondientes a *Colletotrichum* se realizó un agrupamiento por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Los productos de amplificación PCR de la región ITS de los 53 aislados fúngicos produjeron bandas de un peso molecular de aproximadamente 600 pb (Figura 11).

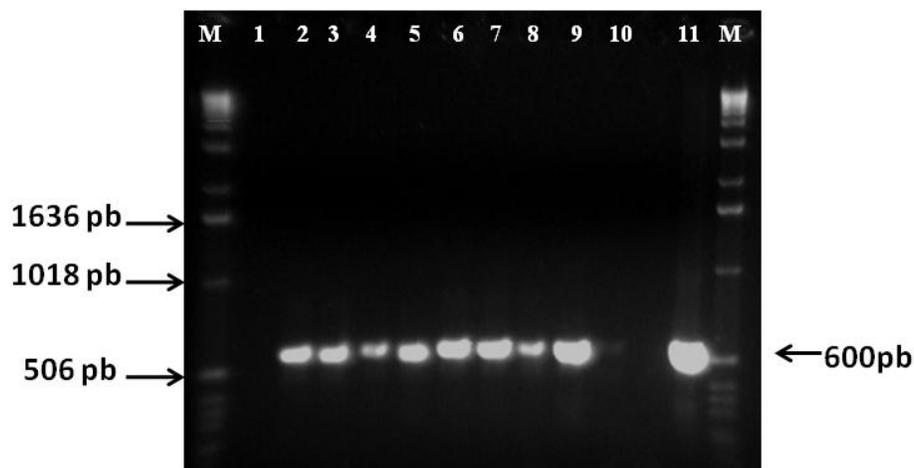


Figura 11. Patrones electroforéticos de los productos de la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal de aislamientos de *Colletotrichum* spp., en agarosa 1%. El control negativo no presentó producto de amplificación (carril 1). Aislados fúngicos de *Colletotrichum* (carriles 2-11). Marcador de peso molecular de 1 kb (carril M).

En la figura A-Q se muestran las digestiones con diferentes enzimas de restricción de los aislados de *Colletotrichum* (para ver más detalles de los patrones de restricción obtenidos para todos los aislados, apéndice III).

Las comparaciones de los fragmentos generados por las digestiones permitieron agrupar a los aislados de *Colletotrichum* como se muestra a continuación:

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Tabla 4. Tamaños de fragmentos generados por el tamaño de fragmento amplificado de la región ITS (rDNA), de los hongos aislados de frutofera de papaya con diferentes enzimas de restricción.

No. AISLADO	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Alu I</i>	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hae III</i>	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hinf I</i>	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hpa II</i>	GRUPO
05	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
19	191, 363	155, 296, 103	177, 284	419, 102	I
20	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
30	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
34	195, 363	159, 296, 103	177, 284	423, 102	I
04	195, 363	159, 296, 103	177, 284	420, 102	I
45	191, 361	155, 296, 101	177, 282	419, 100	I
44	193, 364	157, 296, 104	177, 285	421, 103	I
09	193, 364	157, 296, 104	177, 285	421, 103	I
12	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
16	191, 363	155, 296, 103	177, 284	419, 102	I
23	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
28	191, 362	155, 296, 102	177, 283	419, 101	I
35	195, 363	159, 296, 103	177, 284	423, 102	I
40	195, 363	159, 296, 103	177, 284	420, 102	I
31	191, 361	155, 296, 101	177, 282	419, 100	I
10	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
13	465, 100	158, 376	100, 187, 279	100, 292	II
21	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
25	464, 100	157, 377	100, 187, 280	100, 292	II
37	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
38	466, 100	159, 379	100, 187, 282	100, 292	II
26	465, 100	158, 378	100, 187, 281	100, 292	II
47	476, 93	169, 382	100, 187, 285	100, 292	II
39	476, 100	169, 382	100, 187, 285	100, 292	II
08	466, 100	159, 377	100, 187, 280	100, 292	II
29	476, 100	169, 382	100, 187, 285	100, 292	II
22	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
24	465, 100	158, 376	100, 187, 279	100, 292	II
27	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
52	465, 100	158, 379	100, 187, 282	100, 292	II
48	466, 100	159, 379	100, 187, 282	100, 292	II
11	436, 100	129, 380	100, 187, 283	100, 292	III
01	438, 100	131, 379	100, 187, 282	100, 292	III
06	436, 100	129, 380	100, 187, 283	100, 292	III
07	438, 100	131, 379	100, 187, 282	100, 292	III
14	438, 100	131, 379	100, 187, 282	100, 292	III
42	163, 364	127, 296, 104	177, 285	391, 103	IV
41	167, 362	131, 296, 102	177, 283	395, 101	IV
17	432, 166	125, 455	100, 187, 358	292, 158	V
15	432, 166	125, 455	100, 187, 352	290, 158	V
46	432, 166	125, 455	100, 187, 358	292, 158	V
18	440, 165	126, 553	100, 189, 350	293, 157	V
32	431, 165	125, 455	100, 189, 350	293, 156	V
33	431, 165	125, 452	100, 190, 549	293, 155	V
51	431, 165	125, 452	100, 190, 549	293, 155	V
43	474, 101	167, 390	100, 187, 293	100, 292	VI
49	474, 101	167, 390	100, 187, 293	100, 292	VI
50	171, 371	161, 278, 111	100, 187, 292	111, 292	VI
03	171, 371	161, 278, 111	100, 187, 292	111, 292	VII
53	166, 356	156, 278	187, 277	100, 292	VIII
36	167, 359	157, 278	187, 280	100, 292	VIII
02	170, 356	156, 278	187, 277	100, 292	VIII

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Como se pudo observar en la tabla 4, se formaron ocho grupos donde aparentemente formaban un mismo aislado.

5.3 Identificación de los aislados de *Colletotrichum* spp.

De acuerdo a los resultados del agrupamiento por las digestiones con las enzimas de restricción, se seleccionaron 29 aislados para la secuenciación (Figura 12). Las secuencias obtenidas se compararon con la tabla 4.

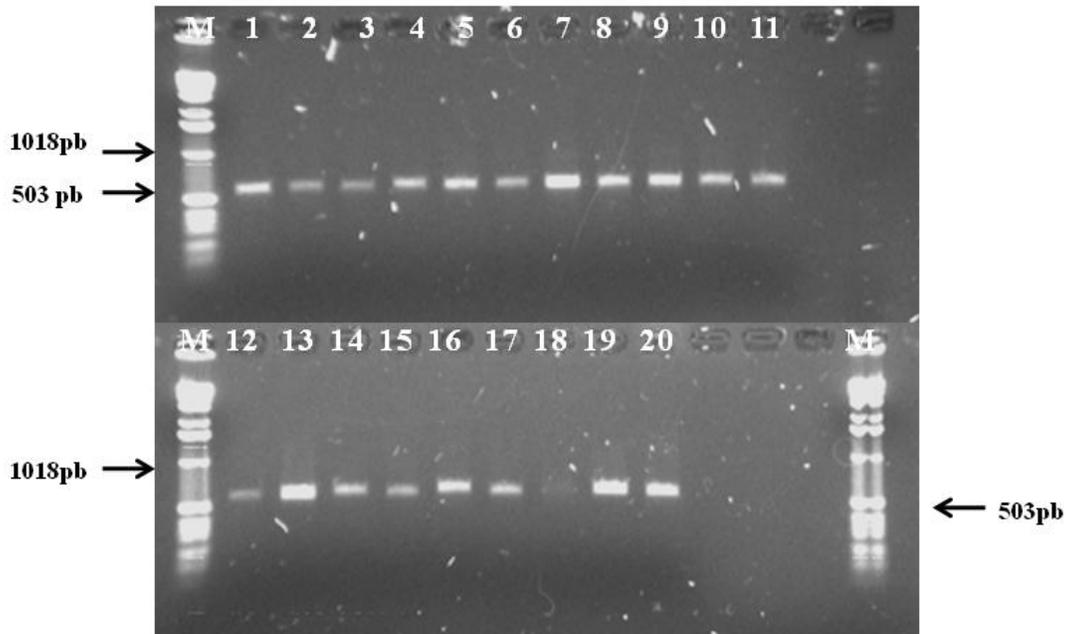


Figura 12. Patrones electroforéticos de los productos de amplificación de los fragmentos purificados, de la región ITS-5.8S-ITS. Los productos fueron obtenidos a partir de los primers ITS1 e ITS4, los carriles 1-20 son representantes de los aislamientos de *Colletotrichum* de cada grupo genético previamente analizado. Carril M.- Marcador de peso molecular de 1kb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Se obtuvieron las secuencias de los 29 hongos aislados, con lo que se realizó el análisis de RFLP “*in silico*” (Tabla 5), donde mostró el mismo agrupamiento obtenido por comparación de tamaños de fragmentos estimados como se mostró en la tabla 4.

Tabla 5. Tamaños de los fragmentos generados por las secuencias nucleotídicas “*in silico*”, provenientes de los aislados fúngicos de frutofera de papaya digeridos con diferentes enzimas de restricción *Hpa* II, *Hae* III, *Hinf* I y *Alu* I por comparación con la base de datos de la NCBI.

No. AISLADO	TAMAÑO DE FRAGMENTO	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Alu</i> I	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hae</i> III	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hinf</i> I	FRAGMENTOS GENERADOS <i>Hpa</i> II	GRUPO
05	553	191, 362	155, 296, 102	75, 10, 177, 8, 283	419, 33, 101	I
19	554	191, 363	155, 296, 103	75, 10, 177, 8, 284	419, 33, 102	I
45	552	191, 361	155, 296, 101	75, 10, 177, 8, 282	419, 33, 100	I
20	553	191, 362	155, 296, 102	75, 10, 177, 8, 283	419, 33, 101	I
30	553	191, 362	155, 296, 102	75, 10, 177, 8, 283	419, 33, 101	I
34	558	196, 363	159, 296, 103	79, 10, 177, 8, 284	423, 33, 102	I
44	557	193, 364	157, 296, 104	77, 10, 177, 8, 285	421, 33, 103	I
39	558	468, 90	161, 18, 379	81, 187, 8, 282	89, 44, 292, 31, 7, 13, 82	II
26	554	465, 89	158, 18, 378	78, 187, 8, 281	86, 44, 292, 31, 7, 13, 81	II
38	556	466, 90	159, 18, 379	79, 187, 8, 282	87, 44, 292, 31, 7, 13, 82	II
21	555	465, 90	158, 18, 379	78, 187, 8, 282	86, 44, 292, 31, 7, 13, 82	II
37	555	465, 90	158, 18, 379	78, 187, 8, 282	86, 44, 292, 31, 7, 13, 82	II
10	555	465, 90	158, 18, 379	78, 187, 8, 282	82, 44, 292, 31, 7, 13, 82	II
13	552	465, 87	158, 18, 376	78, 187, 8, 279	86, 44, 292, 31, 7, 13, 79	II
08	554	466, 88	159, 18, 377	79, 187, 8, 280	87, 44, 292, 31, 7, 13, 80	II
25	552	464, 88	157, 18, 377	77, 187, 8, 280	85, 44, 292, 31, 7, 13, 80	II
47	569	476, 93	169, 18, 382	89, 187, 8, 285	97, 44, 292, 31, 7, 13, 85	II
29	569	476, 93	169, 18, 382	89, 187, 8, 285	97, 44, 292, 31, 7, 13, 85	II
11	527	436, 91	129, 18, 380	49, 187, 8, 283	57, 292, 31, 7, 13, 83, 44	III
01	528	438, 90	129, 18, 381	51, 187, 8, 282	60, 292, 31, 7, 13, 83, 59	III
42	527	163, 364	127, 296, 104	47, 10, 177, 8, 285	391, 33, 103	IV
41	529	167, 362	131, 296, 102	51, 10, 177, 8, 283	395, 33, 101	IV
15	598	432, 166	125, 18, 455	45, 187, 8, 358	53, 44, 292, 31, 7, 13, 158	V
17	598	432, 166	125, 18, 455	45, 187, 8, 358	53, 44, 292, 31, 7, 13, 158	V
43	575	474, 101	167, 18, 390	87, 187, 8, 293	95, 44, 292, 31, 7, 13, 93	VI
50	568	171, 26, 371	161, 18, 278, 111	81, 187, 8, 292	89, 44, 292, 19, 14, 110	VII
53	548	166, 26, 356	156, 18, 278, 96	76, 187, 8, 277	84, 44, 292, 19, 14, 95	VIII
36	552	167, 26, 359	159, 18, 279, 96	77, 187, 8, 280	85, 44, 292, 19, 14, 95	VIII

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

En la figura 13 se muestra la secuencia nucleotídica para el aislado 25 y su digestión con la enzima *Hpa* II.

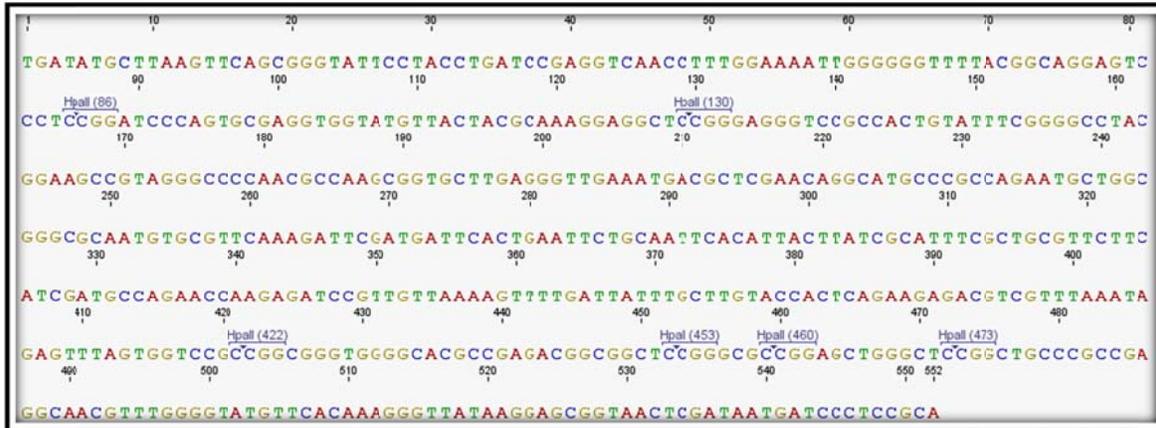


Figura 13. Secuencia nucleotídica para el aislado 25, identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Grupo II). Se indican los sitios de restricción para la enzima *Hpa* II, que coinciden con los sitios de restricción generados en el grupo 2 dentro de la tabla 5.

El análisis “*in silico*” de las secuencias obtenidas (Tabla 5) permitió verificar el agrupamiento inicial que se obtuvo de los aislados de *Colletotrichum*.

La definición de los ocho aislados obtenidos permitió comparar con la base de datos (Tabla 5) y observar la presencia de tres especies de *Colletotrichum* provenientes de lesiones de Antracnosis en frutos de papaya.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

A continuación se muestra la distribución de los ocho aislados de *Colletotrichum* utilizando el programa Geneios Versión 5.0 (Cost matrix 70% similarity (5.0/ -9.026168). Gap open penalty 12. Gap extension penalty 3. Alignment type: Global alignment with free end gaps. Genetic distance model: Tamura Nei. Tree build method: Neighbor-Joining. No out group) para la obtención del dendograma de la figura 14.

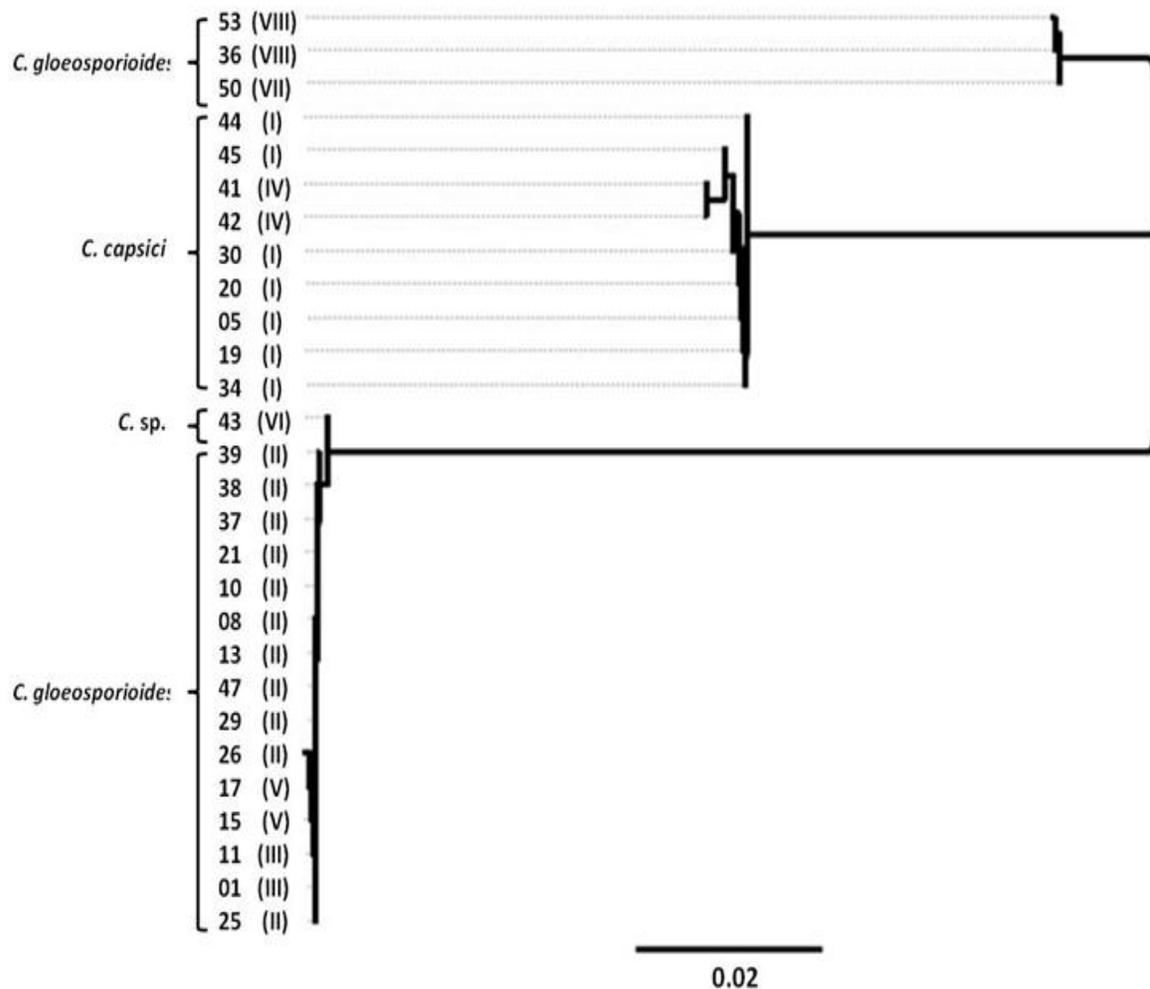


Figura 14. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS-5.8S-ITS, de los aislados provenientes de frutos maduros de papaya. Se pudo identificar tres especies diferentes de antracnosis en papaya cultivada en Tecoman Colima, el modelo de distancia genética utilizado fue Tamura-Nei por el método Neighbor-Joining.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Tabla 6. Clasificación de los aislados fúngicos de los diferentes grupos genéticos de *Colletotrichum* presentes en papaya madura cultivada en Tecomán, Colima.

GRUPO	ORGANISMO FÚNGICO IDENTIFICADO	NÚMERO DE ACCESO DE NCBI	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb)	HOMOLOGÍA %	COBERTURA %	VALOR DE EXPECTANCIA %
I	<i>Colletotrichum capsici</i>	HM450130	553	100	99	0.0
II	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ172224	555	100	99	0.0
III	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FJ172224	527	100	99	0.0
IV	<i>Colletotrichum capsici</i>	HM450129	527	100	99	0.0
V	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM241948	598	100	99	0.0
VI	<i>Colletotrichum</i> sp.	GU935885	569	100	99	0.0
VII	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM013821	568	100	99	0.0
VIII	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HQ645081	548	100	99	0.0

5.4 Caracterización cultural de los aislados fúngicos de *Colletotrichum* por crecimiento micelial

En cuanto a la tasa de crecimiento radial del micelio se observó que el crecimiento del micelio de los 53 aislados de hongos osciló entre 7.0 cm y 8.0 cm después de 7 días de cultivo en PDA. Se presentaron diferencias significativas en el crecimiento radial de los distintos grupos genéticos estudiados (Tabla 7).

Se observó que el grupo III de *Colletotrichum gloeosporioides* registró la mayor tasa de crecimiento micelial (8.0 cm). Mientras que los grupos I y IV pertenecientes a *Colletotrichum capsici* presentaron la menor tasa de crecimiento micelial (7.0 cm).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Tabla 7. Tasa del crecimiento radial del micelio de aislamientos de *Colletotrichum* sp. de frutos de papaya.

Grupo y especie	Tasa de crecimiento radial *
Grupo III <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.95 ± 0.1 a
Grupo V <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.58 ± 0.1 b
Grupo VI <i>Colletotrichum</i> sp.	7.58 ± 0.0 b
Grupo VII <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.5 ± 0.0 b
Grupo VIII <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.55 ± 0.0 b
Grupo II <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.5 ± 0.8 b
Grupo IV <i>Colletotrichum capsici</i>	7.05 ± 0.0 c
Grupo I <i>Colletotrichum capsici</i>	7.03 ± 0.3 c

*Se presentan las medias y desviación estándar del crecimiento radial por grupo genético después de 7 días de incubación. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=4$).

5.5 Caracterización cultural de los aislados fúngicos de *Colletotrichum* por coloración del micelio

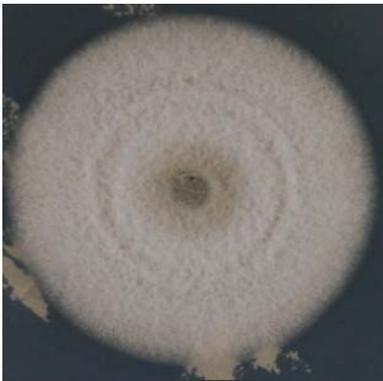
Una vez agrupados los aislados se realizó nuevamente una caracterización cultural por color, de los ocho aislados pertenecientes a *Colletotrichum* (Tabla 8), en donde se pudieron observar las diferencias de color entre las tres especies. El micelio desarrollado al inicio fue blanco o blanquecino (según el grupo genético) cambiando a, café, verde olivo, gris, café brillante, blanco grisáceo, salmón, gris oscuro, gris claro, rosa pálido, amarillo pálido y negro. En los grupos 3 y 4, no presentó gran variación de coloración pues fueron de color blanco y rosa pálido. El grupo 7 presentó coloración blanca y grisácea. Pero en los demás grupos hubo gran variación desde tonos claros hasta los tonos oscuros anteriormente mencionados, como se muestra a continuación en la tabla 8.

Tabla 8. Características culturales de diferentes aislados de *Colletotrichum* de frutos maduros del papayo.

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El aspecto de la colonia es concéntrico, con micelio de color amarillo pálido y en los bordes con anillos color blanco. El micelio se desarrolla al ras del medio de cultivo.
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El aspecto de la colonia es radial de tonos variables blanco, gris oscuro y rosa pálido, en la periferia es color blanco. Micelio aéreo, algodonoso y denso.
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El patrón de crecimiento es de aspecto concéntrico, el centro de la colonia es color gris oscuro y en los bordes de la colonia es de color blanco grisáceo, micelio aéreo, ligeramente algodonoso.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El patrón de crecimiento de la colonia es de aspecto concéntrico, micelio aéreo, ligeramente algodonoso, distribuido de manera uniforme, de color rosa pálido combinado con tonos de color blanco.
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	Generalmente concéntrico y ocasionalmente con algunos fragmentos radiales de color blanco. El centro de la colonia es generalmente de color gris tornándose en la periferia color blanco. Micelio aéreo, ligeramente algodonoso.
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El patrón de crecimiento es de aspecto concéntrico, el centro de la colonia es color gris oscuro y negro y en los bordes de la colonia es de color blanco grisáceo, micelio aéreo, ligeramente algodonoso.

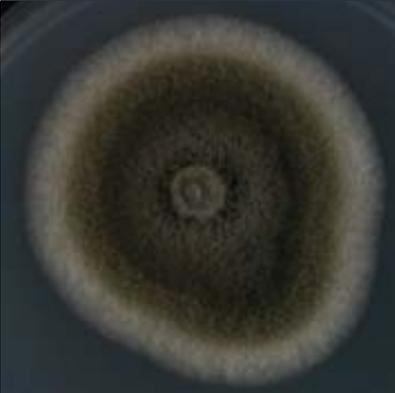
(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum capsici</i>		I	7.03 ± 0.3	El aspecto de la colonia es concéntrico, con micelio de tonos variables en el centro de la colonia es de color rosa pálido, enseguida un anillo de color blanco y en los bordes con anillos color combinado rosa pálido y blanco. El micelio se desarrolla al ras del medio de cultivo.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	El patrón de crecimiento es concéntrico de color blanco en el centro, café y verde olivo en el intermedio y en la periferia color blanco. El tipo de micelio es aéreo, ligeramente algodonoso.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	El aspecto de la colonia tiene forma circular de tonos variables café-blanco-gris. El tipo de micelio es aéreo

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	Micelio profusamente ramificado, algodonoso, denso, de color blanco.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	El patrón de crecimiento es circular, formando anillos de color café brillante, gris, verde olivo y en el borde color blanco. El micelio es de tipo aéreo, algodonoso.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	El aspecto de la colonia es concéntrico, presentando micelio aéreo, de color gris, se observan masas conidiales dispersas de color café y en la periferia color blanco.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	Micelio profusamente ramificado, algodonoso, denso, de tonos variables blanco-gris. El tipo de micelio es aéreo.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		II	7.5 ± 0.8	Micelio aéreo, abundante y algodonoso, de color gris a blanco grisáceo. El centro de la colonia presenta un aspecto polvoso de color grisáceo, con la periferia de color blanco. El patrón de crecimiento de la colonia es circular.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		III	7.95 ± 0.1	Micelio aéreo, con un patrón de crecimiento concéntrico, algodonoso, de color blanco.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum capsici</i>		IV	7.05 ± 0.0	El aspecto de la colonia es circular, micelio aéreo, algodonoso, compacto, de color palo de rosa y blanco.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		V	7.58 ± 0.1	El aspecto de la colonia es circular, micelio aéreo, algodonoso, compacto, de color palo de rosa y blanco.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		V	7.58 ± 0.1	El patrón de crecimiento es de aspecto radial, de tonos variables blanco, gris claro, gris oscuro y café, en la periferia es color blanco. Micelio aéreo.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum sp.</i>		VI	7.58 ± 0.0	Aspecto polvoso en mayor parte de la colonia, de color grisáceo en el centro y en el siguiente anillo color verde olivo y en la periferia de color blanco. Micelio aéreo, ligeramente algodonoso.
<i>Colletotrichum sp.</i>		VI	7.58 ± 0.0	El patrón de crecimiento de la colonia es concéntrico, el centro de la colonia es color gris y en los bordes es de color blanco grisáceo, micelio aéreo y algodonado.
<i>Colletotrichum sp.</i>		VI	7.58 ± 0.0	Micelio aéreo, algodonoso, abundante, de color rosa pálido y blanco, el patrón de crecimiento es de aspecto concéntrico.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		VII	7.5 ± 0.0	La forma de la colonia es concéntrica, micelio profusamente ramificado, algodonoso, denso, el centro de la colonia presenta un color blanco-gris-olivo, con la periferia de color blanco.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		VIII	7.55 ± 0.0	El patrón de crecimiento es de aspecto radial, de tonos variables blanco, gris y verde olivo, en la periferia es color blanco. Micelio aéreo, abundante y algodonoso.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		VIII	7.55 ± 0.0	El patrón de crecimiento es de aspecto concéntrico, el centro de la colonia es color gris y en los bordes la coloración es gris claro combinada con tonos blancos, presenta micelio profusamente ramificado y algodonado.

(continua en la siguiente página)

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

CEPAS	ASPECTO	GRUPO GENETICO	TASA DE CRECIMIENTO	CARACTERISTICAS
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		VIII	7.55 ± 0.0	El aspecto de la colonia es radial, de tonos variables gris oscuro, gris claro y blanco, micelio aéreo, profusamente ramificado, algodonoso y denso.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		VIII	7.55 ± 0.0	El patrón de crecimiento de la colonia es de aspecto radial, de dos tonos blanco y gris, el micelio gris es de crecimiento aéreo algodonoso y el micelio de color blanco tiene un crecimiento razo.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

5.6 Identificación de bacterias antagonistas para *Colletotrichum*

Se obtuvo un total de 250 aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya; como flores, hojas y frutos. Dichos aislados fueron utilizados para la confrontación con los hongos identificados, seleccionando las bacterias con actividad antagonista contra *Colletotrichum* en papaya. Destacando nueve aislados bacterianos de plantas de papaya con actividad antagonista: tres de hojas, cinco de frutos y uno de flor. Donde se identificaron los siguientes géneros: *Bacillus* y *Pseudomonas* (Tabla 9).

Tabla 9. Especies de bacterias antagonistas contra especies de *Colletotrichum* sp. aislados del papayo.

No. AISLADO	ORIGEN	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb)	BACTERIA IDENTIFICADA Y NUMERO DE ACCESO DE NCBI	HOMOLOGÍA %	COBERTURA %	EXPECTANCIA %
1	Fruto de papaya	1458	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	99	100	0.0
2	Fruto de papaya	1436	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	99	100	0.0
3	Hoja de papaya	1462	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	99	100	0.0
4	Hoja de papaya	1456	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	99	100	0.0
5	Hoja de papaya	1473	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	99	100	0.0
6	Fruto de papaya	1459	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	99	100	0.0
7	Fruto de papaya	1456	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	99	100	0.0
8	Flor de papaya	1448	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	99	100	0.0
9	Fruto de papaya	1465	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	99	100	0.0

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

5.7 Actividad antagonista de bacterias contra *Colletotrichum*

A continuación se muestran los resultados de la actividad antagonista para cada aislado de *Colletotrichum* de frutos de papaya. Los valores fueron expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo. Se utilizaron las siguientes cepas control de la colección del laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV-IPN Campus Unidad Irapuato: *Bacillus amyloliquefaciens* (BEBr) aislada de brócoli, *Bacillus subtilis* (BEMZ) aislada de frutos de manzana, *Bacillus subtilis* (BEPS06) aislada de frutos de papaya.

Respecto a *C. capsici* (HM450130 Grupo I) todas las cepas aisladas tuvieron actividad antagonista sin mostrar diferencias significativas entre ellas. La cepa *B. amyloliquefaciens* (05) aislada de hojas de papaya, resultó ser la que presentó la mayor tendencia de actividad antagonista (73.1%), mientras que la cepa que presentó la menor tendencia (63.8%) fue *B. subtilis* (12) aislada del frutos de papaya (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum capsici* (HM450130).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. capsici</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	67.5 ± 0a
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	65.3 ± 0a
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	65.0 ± 0a
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	70.0 ± 2.5a
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	71.3 ± 3.75a
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	66.3 ± 1.25a
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	66.3 ± 3.75a
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	68.8 ± 1.25a
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	66.3 ± 1.25a
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	70.0 ± 5a
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	66.3 ± 3.75a
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	63.8 ± 1.25a

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras iguales indican que no son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

En las pruebas de antagonismo contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* (FJ172224 Grupo II) se observó la mejor actividad antagonista (71.4%) con la bacteria *B. subtilis* (09) aislada de frutos de papaya y *B. amyloliquefaciens* (08) aislada de flor del papayo con un porcentaje de inhibición de 70%, mientras que las cepas *P. putida* (02) y *B. subtilis* (07) presentaron el menor efecto antagónico, con 63.8% de inhibición (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum gloeosporioides* (FJ172224).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. gloeosporioides</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	66.3 ± 1.25cdb
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	63.8 ± 1.25d
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	67.5 ± 0cadb
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	67.5 ± 0cadb
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	68.8 ± 1.25cab
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	65.0 ± 0cd
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	63.8 ± 3.75d
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	70.0 ± 0ab
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	71.4 ± 1.25a
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	67.5 ± 0cadb
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	67.5 ± 0cadb
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	67.5 ± 0cadb

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Conforme a la Tabla 12 del antagonismo contra *C. gloeosporioides* (FJ172224 Grupo III), las cepas que presentaron el mejor efecto inhibitorio fueron *B. amyloliquefaciens* (05) aislada de hojas del papayo, *B. amyloliquefaciens* (08) aislada de flores del papayo, *B. subtilis* (06), *B. subtilis* (07) y *B. subtilis* (09) aisladas de frutos del papayo; mientras que la cepa que presentó el menor porcentaje de inhibición fue *P. putida* (02) aislada de frutos del papayo con un porcentaje de inhibición de 57.5%.

Tabla 12. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum gloeosporioides* (FJ172224).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. gloeosporioides</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	61.9 ± 1.8ab
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	57.5 ± 2.5b
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	60.6 ± 3.1ab
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	63.8 ± 1.2ab
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	66.3 ± 1.2a
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	65.6 ± 0.6a
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	65.6 ± 3.1a
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	65.6 ± 3.1a
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	65.6 ± 3.1a
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	62.5 ± 2.5ab
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	60.6 ± 3.1ab
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	64.4 ± 1.8ab

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Todas las bacterias mostraron buen efecto antagonista contra *C. capsici* (HM450129 Grupo IV). Se obtuvieron porcentajes de inhibición altos que oscilaron entre 74.5% y 86.3% de inhibición. *B. subtilis* (04) aislada de hojas de papayo y *B. amyloliquefaciens* (08) aislada de flor de papaya fueron las cepas que presentaron el mayor efecto antagónico (86.3% y 84.5%) respectivamente y la cepa que presentó el menor porcentaje de inhibición (74.66%) fue *B. subtilis* (09) aisladas de frutos de papaya (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum capsici* (HM450129).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. capsici</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	81.8 ± 0.7b
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	81.8 ± 0.7b
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	81.8 ± 0.7b
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	86.3 ± 1.2a
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	81.8 ± 0.7b
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	79.5 ± 0.5c
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	79.5 ± 0.5c
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	84.5 ± 0.5a
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	74.5 ± 0.5d
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBR)	79.5 ± 0.5c
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	81.8 ± 0.7b
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	81.8 ± 0.7b

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

De acuerdo a la tabla 14 el efecto antagónico contra *C. gloeosporioides* (HM241948 Grupo V), las cepas mostraron porcentajes de inhibición de 65.0 a 70.0%, la cepa *B. subtilis* (04) aislada de hojas de papayo con un 70.0% de inhibición, resultó ser la más efectiva de actividad antagonista; incluso mostró valores más altos que las cepas control y la cepa que presentó el menor porcentaje de inhibición (65.0%) fue *P. putida* (02) aislada de frutos de papayo.

Tabla 14. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum gloeosporioides* (HM241948).

No. de aislado	Especie	% Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	67.5 ± 0b
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	65.0 ± 0c
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	67.5 ± 0b
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	70.0 ± 0a
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	67.5 ± 0b
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	67.5 ± 0b
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	67.5 ± 0b
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	65.0 ± 0c
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	67.5 ± 0b
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	67.5 ± 0b
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	65.0 ± 0c
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	67.5 ± 0b

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

La actividad antagonista de las cepas bacterianas contra *Colletotrichum* sp. (GU935885 Grupo VI), osciló desde 63.8% a 68.8% de inhibición (Tabla 15). A pesar de que no se observaron diferencias estadísticas significativas en su efecto inhibitor, la cepa *P. putida* (02) aislada del frutos de papayo, mostró una tendencia a superar al resto de las cepas estudiadas, con un porcentaje de inhibición de 68.8%.

Tabla 15. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum* sp. (GU935885).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>Colletotrichum</i> sp. (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	65.0 ± 2.5a
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	68.8 ± 6.2a
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	65.0 ± 2.5a
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	65.0 ± 2.5a
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	66.3 ± 1.2a
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	66.3 ± 3.7a
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	63.8 ± 1.2a
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	67.5 ± 0a
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	67.5 ± 0a
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	63.8 ± 1.2a
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	65.0 ± 2.5a
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	65.0 ± 2.5a

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Las cepas de ***B. amyloliquefaciens* (10) aislada de brócoli y ***B. subtilis* (12) aislada de frutos de papaya, mostraron el mejor efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides* HM013821 Grupo VII (61.8% de inhibición) (Tabla 16), mientras que la cepa que presentó el menor porcentaje de inhibición fue *P. putida* (02) aislada del frutos de papayo (49.5%).

Tabla 16. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum gloeosporioides* (HM013821).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. gloeosporioides</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	52.3 ± 0.2d
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	49.5 ± 0.5e
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	51.8 ± 0.7d
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	51.8 ± 0.7d
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	56.8 ± 0.7b
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	54.5 ± 0.5c
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	51.8 ± 0.7d
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	49.5 ± 0.5e
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	55.0 ± 0.0bc
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	61.8 ± 0.7a
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	54.5 ± 0.5c
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	61.8 ± 0.7a

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

En las pruebas de confrontación del hongo *C. gloeosporioides* (HQ645081 Grupo VIII) la bacteria con mejor potencial antagonista fue **B. subtilis* (11) aislada de manzana (78.8%). Las cepas que mostraron el menor porcentaje de inhibición fueron *P. putida* (02) y *B. subtilis* (07) aislada de frutos de papaya, las cuales presentaron un 17% menos de inhibición que la cepa **B. subtilis* (11) (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto antagónico *in vitro* de los aislados bacterianos de diferentes tejidos de papaya contra *Colletotrichum gloeosporioides* (HQ645081).

No. de aislado	Especie	Inhibición (%) de <i>C. gloeosporioides</i> (PIRG)*
01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (FJ685773)	65.0 ± 2.5b
02	<i>Pseudomonas putida</i> (EU179737)	61.3 ± 1.2b
03	<i>Bacillus subtilis</i> (EF423590)	65.0 ± 7.5b
04	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	72.8 ± 0ab
05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (HM989844)	68.8 ± 1.2ab
06	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	71.3 ± 1.2ab
07	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ711982)	63.8 ± 1.2b
08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (CP000560)	72.8 ± 7.5ab
09	<i>Bacillus subtilis</i> (FJ947049)	71.3 ± 8.7ab
10	** <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BEBr)	71.8 ± 3.7ab
11	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEMZ)	78.8 ± 3.7a
12	** <i>Bacillus subtilis</i> (BEPS06)	71.3 ± 1.2ab

* Los valores indican el % de inhibición del crecimiento radial del patógeno. **Son cepas control. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$, $n=3$).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

La Figura 15 muestra los efectos inhibitorios de las bacterias con mayor potencial controlador de los aislados de *Colletrotrichum* estudiados. En la figura 15 A) se observa el efecto antagónico de las bacterias *B. subtilis* (04), *B. amyloliquefaciens* (05), *B. amyloliquefaciens* (BEBr), *B. subtilis* (BEMZ) y *B. subtilis* (BEPS06) las cuales inhibieron el hongo *C. capsici* (HM450130); en la figura B) se observó que la bacteria *B. subtilis* (09) tubo el mayor efecto antagonista para el hongo *C. gloeosporioides* (FJ172224) (Figura 15 A, B, C, D, E, F, G y H).

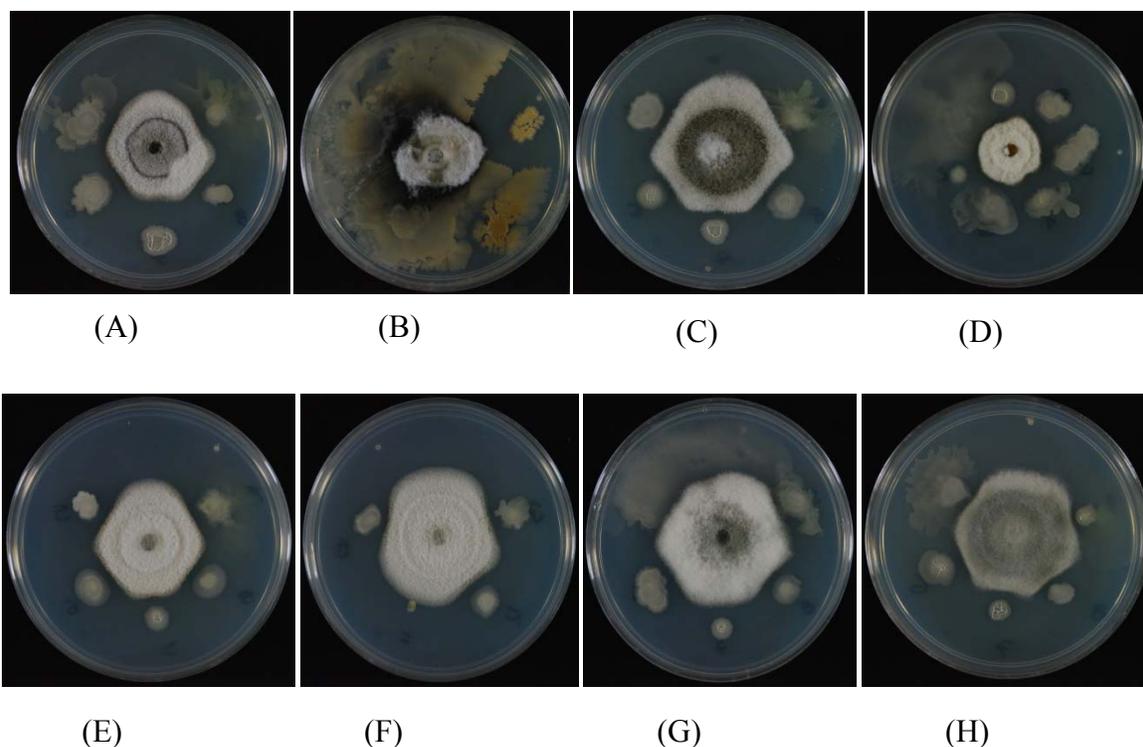


Figura 15. Respuesta antagonista de las mejores bacterias con efecto inhibitorio a los diferentes aislados fúngicos: A) Grupo I, B) Grupo II, C) Grupo III, D) Grupo IV, E) Grupo V, F) Grupo VI, G) Grupo VII y H) Grupo VIII.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

A continuación se enlistan las bacterias con mayor actividad antagonista al hongo *Colletotrichum sp.* agente causal de la enfermedad de antracnosis en frutos de papaya (Tabla 18).

Tabla 18. Hongos fitopatógenos contra la mejor bacteria antagonista aislada de diferentes tejidos de papaya; como flores, hojas y frutos.

ESPECIE DE HONGO	ESPECIE DE BACTERIA
<i>Colletotrichum capsici</i> (I)	Estadísticamente ninguna fue mejor o todas fueron iguales; pero el porcentaje mas alto fue de <i>B. amyloliquefaciens</i> (05).
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (II)	<i>B. subtilis</i> (09)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (III)	<i>B. amyloliquefaciens</i> (05), <i>B. subtilis</i> (06), <i>B. subtilis</i> (07), <i>B. amyloliquefaciens</i> (08), <i>B. subtilis</i> (09).
<i>Colletotrichum capsici</i> (IV)	<i>B. subtilis</i> (04) y <i>B. amyloliquefaciens</i> (08).
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (V)	<i>B. subtilis</i> (04)
<i>Colletotrichum spp.</i> (VI)	Estadísticamente ninguna fue mejor o todas fueron iguales; pero el porcentaje mas alto fue de <i>Pseudomonas putida</i> (02)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (VII)	** <i>B. amyloliquefaciens</i> (10), ** <i>B. subtilis</i> (12)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (VIII)	** <i>Bacillus subtilis</i> (11), <i>B. subtilis</i> (04), <i>B. amyloliquefaciens</i> (05), <i>B. subtilis</i> (06), <i>B. amyloliquefaciens</i> (08), <i>B. subtilis</i> (09), ** <i>B. amyloliquefaciens</i> (10), ** <i>B. subtilis</i> (12).

6. DISCUSIÓN

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Para la identificación de un hongo fitopatógeno normalmente se recurre a características morfológicas para su identificación, pero en este caso para *Colletotrichum* no fue posible debido a su amplia variación como lo reportan Oliveira *et al.* (2005) donde señalaron que de todas las características morfológicas estudiadas hasta hoy en día, ninguna permitió una clasificación clara, de los aislados en grupos o especies morfológicas diferentes de *Colletotrichum*, en el cultivo del olivo o aceituna (*Olea europea*) por tal motivo se emplearon técnicas moleculares. En el presente estudio, la diferenciación y el diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* se basó en caracteres morfológicos, como la forma de las conidias, el color, aspecto de la colonia y otras características como la tasa de crecimiento (Bailey y Jeger, 1992; Martínez-Culebras *et al.*, 2000); sin embargo, estas características no fueron satisfactorias para la diferenciación de las especies del hongo. Debido a la inestabilidad de los rasgos morfológicos, la variación fenotípica, los efectos ambientales sobre los rasgos morfológicos, además de la falta de unificación y estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo, un mismo aislado del hongo pueda ser identificado como una u otra especie dependiendo de los criterios individuales del investigador. Teniendo en cuenta lo anterior, se ha recurrido al uso de técnicas moleculares para la diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum* (Brown *et al.*, 1996; Adaskaveg y Hartin, 1997; Freeman *et al.*, 1998; Saldarriaga-Cardona *et al.*, 2008).

Las técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de *Colletotrichum* han experimentado un avance espectacular en los últimos años y en la actualidad constituyen una herramienta imprescindible para la caracterización de especies y aislados de este género (Brown *et al.*, 1996; Johnston y Jones, 1997; Freeman *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2001; Cannon *et al.*, 2000; Tahlinhas *et al.*, 2004).

En esta investigación se utilizó la técnica molecular de PCR-RFLP (análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción combinado con la reacción en cadena de la polimerasa) de las regiones ITS1 e ITS4 del ADNr indicando que la población de *Colletotrichum* en Tecomán, Colima es heterogénea, ya que los patrones de restricción resultantes del corte por las cuatro enzimas de restricción *Hae* III, *Hpa* II, *Hinf* I y *Alu* I, revelaron perfiles que sugirieron la existencia de variación interespecíficas. Para cada una de las enzimas empleadas, se generó un patrón de

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

restricción distintivo, ya que el número de bandas observado para cada enzima fue diferente para todas las muestras de ADN analizadas.

Se identificó más de una especie de *Colletotrichum* presente en lesiones de frutos de papaya, las tres especies encontradas fueron; *C. capsici*, *C. gloeosporioides* y *C. spp.* Esto coincide con el primer estudio Tapia *et al.* (2008) donde identificaron la presencia de *C. gloeosporioides* y de *C. capsici* en frutos de papaya de la península de Yucatán (México), anteriormente se desconocía su presencia en papaya, solo se tenían reportes en cultivos como el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin), pimienta (*Capsicum annuum* L.), caupí (*Vigna unguiculata*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), y betle vid (*Piper betel*).

Existen reportes de que la mayoría de las poblaciones tienen relativamente altas frecuencias de polimorfismos debido a pequeños cambios en el DNA, derivados de mutaciones puntuales tales como sustitución de bases, inserciones, deleciones y translocaciones (Rosewich *et al.*, 1994).

De acuerdo a Montero *et al.* (1998), *C. gloeosporioides* presenta una alta variabilidad genética, lo cual puede atribuirse a que este patógeno posee un ciclo de vida corto y reproducción de tipo sexual y asexual, lo cual le confiere una alta tasa de mutación y recombinación por cruzamiento.

Lo antes mencionado puede explicar la diversidad genética y fenotípica observada en los aislados de *Colletotrichum* spp. asociado a la antracnosis en papaya. Este hecho cobra importancia ya que el éxito de controlar las enfermedades reside en conocer cuál es el agente etiológico que está atacando al fruto, para así establecer las estrategias de control más apropiadas (Freeman *et al.*, 1998; Adaskaveg y Föster, 2000; Freeman, 2000).

Por lo anterior, el uso de herramientas de biología molecular, se ha propuesto para discriminar entre esa variabilidad e identificar de manera precisa entre individuos de diferente especie o incluso variedades de la misma especie. En este sentido, se ha reportado que el uso de los marcadores moleculares ITS -Internal Transcribed Spacers- (ITS-5.8S-ITS2) les permitió identificar 80 aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos en cultivos de fresa, de igual manera les

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

fue posible diferenciar entre *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, ambos hongos responsables de la antracnosis en fresa, los cuales eran fenotípicamente indistinguibles (Freeman y Katan, 1997; Freeman, 2000; Martínez *et al.*, 2000).

En el presente estudio se observó una amplia diversidad morfológica, del color del micelio en particular, que mostraron los aislados de *Colletotrichum*, que se identificaron como *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *C. spp.* incluso aquellos pertenecientes a una misma especie. Al realizar la caracterización en función de dicha coloración a 28 ± 2 °C en medio de PDA se observó una amplia variabilidad de colores desde los tonos blanco o blanquecino, salmón, salmón-naranja-rosa, gris y gris-olivo. Una variación similar en el color del micelio fue reportado por Villanueva *et al.* (2008) donde señalan que en medio de PDA; la forma de la colonia varió entre repeticiones, aislamientos, edad y condición de incubación (cinco condiciones de incubación [I, II y III en luz blanca continua (LBC) de lámparas de 40 W (480 nm) (Solar®) y temperaturas de 27 ± 1 , 25 ± 3 , y 21 ± 1 °C; y, IV y V en luz negra continua (LNC) de lámparas de 40 W (365 nm) (Solar®) y 25 ± 3 y 21 ± 1 °C]). Encontraron que las tres especies *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare*, desarrollaron micelio, que al inicio fue blanco o blanquecino (según la condición) cambiando a salmón, salmón-naranja-rosa, gris o gris-olivo. En todas las condiciones probadas, *C. fragariae* aislado de Michoacán y *C. gloeosporioides* aislado del Estado de México formaron colonias oscuro intenso; *C. gloeosporioides* aislado de Michoacán colonias claras; y *C. orbiculare* del Estado de México, colonias gris-oscuro a casi negro, por lo que esto no les permitió separar especies de *Colletotrichum* por color de colonias.

Las diferencias de cultivo obtenidas entre aislamientos de *C. gloeosporioides* es común en esta especie, considerada compleja, heterogénea y con de variabilidad extrema en medio de cultivo (Sutton, 1992; Bailey y Jeger, 1992; Morales, 1996). Los aislamientos de esta especie se han agrupado en al menos nueve formas por sus diferencias de cultivo (Sutton, 1980).

Por lo anterior queda claro que la variación morfológica *in vitro* de este hongo dificulta su correcta identificación (Sutton, 1992; Cannon *et al.*, 2000). El comportamiento diverso que se observó entre los distintos aislados de *Colletotrichum* corrobora la presencia de varias especies de

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Colletotrichum que pueden tener la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Bailey y Jeger, 1992; Simmonds, 1965; Morales, 1996).

Este comportamiento coincide con lo encontrado por diversos autores (Bailey y Jerger, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2003; Villanueva *et al.*, 2008), quienes demostraron que el crecimiento micelial no es un criterio válido para separar especies de *Colletotrichum*, dada la gran variabilidad en sus características morfológicas y culturales incluso en aislamientos de la misma especie y la cual es considerada normal y ha sido registrada por otros autores (Freeman *et al.*, 1998; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004), quienes sugieren tener precaución cuando se usa esta característica para separar especies.

Por lo anterior se realizó una caracterización basada en la tasa de crecimiento radial del micelio, que permitió agrupar en los aislados de crecimiento rápido (8.0 cm) y de crecimiento lento (7.0 cm). En los primeros se encontró a *C. gloeosporioides* y en los segundos se colocó a *C. capsici*.

La tasa de crecimiento radial del micelio determina la habilidad que tiene un microorganismo de persistir exitosamente en el tiempo y es la clave en la eficiencia de una población (Nelson, 1979), sin embargo Smith y Black (1990) y Gunnel y Gubler (1992) consideraron que la característica de crecimiento micelial no es un criterio suficiente para separar a dos especies de *Colletotrichum*, puesto que la forma varía cuando se cultiva en medios artificiales y también podría ser un efecto del sustrato o de condiciones del medio ambiente (Gutiérrez *et al.*, 2001). Esto lo confirmaron Morales *et al.* (2009) quienes determinaron 19 variantes de crecimiento de la colonia en PDA lo cual es un indicativo de alta variabilidad de *C. gloeosporioides* y que este criterio no es adecuado para la separación de variantes.

En este caso *C. gloeosporioides* y *C. sp.* presentaron los valores más altos de tasa de crecimiento radial del micelio, lo cual coincide con lo reportado por Villanueva *et al.* (2008) para los aislamientos de *C. gloeosporioides* en frutos de chirimoya. Las diferencias en la tasa de crecimiento radial del micelio pueden relacionarse con el éxito epidemiológico en campo frente a otros aislamientos. El comportamiento diverso que se observó entre los distintos aislados de

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Colletotrichum sugiere la presencia de varias especies de *Colletotrichum* que pudieran tener la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Oliveira *et al.*, 2005).

En el presente estudio se encontraron bacterias antagonistas contra *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *C. spp.* previamente identificados, considerando que para el desarrollo de una tecnología para la producción de un agente de control biológico debe dar énfasis a la obtención de aislamientos nativos, ya que estos presentan un comportamiento que se adecúa a las condiciones agroecológicas regionales de esa manera tendrá la habilidad para colonizar y persistir en esas condiciones climáticas, donde se encuentra el fitopatógeno enemigo, lo que quiere decir es que las mejores bacterias con capacidad antagonista han sido aislados de la frutofera del mismo fruto afectado por la enfermedad a atacar (Torres *et al.*, 2006). Los autores Karamanoli *et al.* (2005) demostraron que existen notables diferencias en la colonización bacteriana de la filosfera en 19 especies de plantas que estudiaron en un área determinada al norte del Mediterráneo.

Por tal motivo en el presente estudio se aislaron bacterias antagonistas de los diferentes tejidos de papaya como flores, hojas y frutos. Se ha reportado que la superficie de las hojas (filoplano) constituye una fuente para el aislamiento de antagonistas (Zhou *et al.*, 1999). Por otro lado, la superficie del fruto o fructoplano es el mejor lugar para el aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad en el fruto y poseen potencial para ser utilizadas como agentes de control biológico postcosecha (Janisiewicz y Korsten, 2002).

En este trabajo, se identificaron 9 bacterias con potencial antagonista, tales como; *Bacillus amyloliquefaciens* aisladas de frutos, hoja y flor, *Pseudomonas putida* aislada de frutos y *Bacillus subtilis* aislada en hoja y frutos (Tabla 9).

Los aislados con mejor potencial antagonista *in vitro* por confrontación directa contra todos los aislados fúngicos de *Colletotrichum* en papaya fueron *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Tabla 18). El género *Bacillus* tiene un importante papel en la sanidad vegetal; estimula el crecimiento y

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

la protección contra microorganismos fitopatógenos y está ampliamente relacionado con la producción de antibióticos biológicamente activos y metabolitos secundarios (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Se tienen informes de por qué este género *Bacillus* tienen actividad antagonista.

En el genoma de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* GAI identificaron cuatro grupos de genes implicados en la síntesis de antibióticos: la surfactina, la iturina A, fengycinas y el bacillibactin, esto le confiere una amplia actividad de control biológico con múltiples facetas de acción (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Los lipopéptidos: surfactina, iturina A, fengycina A y fengycina B son reconocidos por sus potenciales en la biotecnología y sus aplicaciones en la farmacéutica, sobre todo por sus propiedades tenso activas (Banat *et al.*, 2000; Singh y Cameotra 2004). Estos surfactantes también pueden desempeñar diferentes funciones en el desarrollo y en la supervivencia de las cepas de *Bacillus* en su hábitat natural: aumentando la disponibilidad de sustratos hidrofóbicos, metales pesados vinculantes, la movilidad en la patogénesis bacteriana, la formación de biopelículas (Ron y Rosenberg 2001, Sutyak 2008). También se han destacado por su efectividad como agentes de control biológico en la rizosfera (Ongena y Jacques, 2008).

Por otra parte las iturinas y las fengycinas tienen una fuerte capacidad antifúngica y son inhibitorias del crecimiento de una amplia gama de patógenos en plantas. Las surfactinas por sí mismas no son fungitóxicas, pero tienen un efecto sinérgico con la iturina A lo que les provee de actividad antifúngica (Maguet-Dana, 1992).

El papel de la fengycina producida en la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 demostró ser muy eficiente en el control de la enfermedad de frutas por el tratamiento con extractos enriquecidos con lipopéptidos cíclicos y la detección in situ de fengycinas con potencial inhibitorio (Toure *et al.*, 2004). Otra función identificada recientemente en cepas de *Bacillus* es la estimulación los lipopéptidos en el sistema inmunológico de la planta (Ongena *et al.*, 2007). Las surfactinas y en menor medida las fengycinas tienen la capacidad de inducir una función de cebador en la planta huésped que le permite una activación acelerada de las respuestas de defensa

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

al ataque de patógenos, lo que conlleva a una mayor resistencia al ataque de patógenos (Conrath *et al.*, 2006). Las surfactinas pueden estar asociados a patrones moleculares que pueden ser percibidos específicamente por señales en células vegetales para activar los mecanismos de defensa (Jourdan *et al.*, 2009).

Además se encontró que en la cepa *B. amyloliquefaciens* GA1 el gen de la síntesis de sideróforos; el bacillibactina, el cual ayuda a mejorar la adquisición bacteriana del hierro férrico ayudando a la biodisponibilidad en los suelos (Kloepper *et al.*, 1980).

En las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. amyloliquefaciens* GA1 fueron encontrados los genes de la síntesis del Macrolactina, Dificidina y Bacilane (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Dificidina es un antibiótico de amplio espectro bacteriano (Zimmerman *et al.*, 1987) recientemente se ha encontrado prometedor en su acción supresora contra *Erwinia amylovora*, que es una bacteria que causa una enfermedad devastadora, provocando la muerte en frutos; como manzana, pera y otras plantas rosáceas (Chen *et al.*, 2009).

En cuanto a la macrolactina y bacilane aun no se tiene investigación en relación con el control biológico, a pesar de que son agentes antimicrobianos que podrían tener utilidad potencial en la medicina, tienen la capacidad de inhibir las células del cáncer, así como también del virus simplex del herpes en mamíferos. También se encontró eficaz en la protección de células de linfoblastos del VIH (Arguelles-Arias *et al.*, 2009). Bacilane presenta actividad antimicrobiana contra los agentes de patógenos en humanos, tales como *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Patel *et al.*, 1995).

Bacilysin es uno de los antibióticos más simples conocido por sus efectos antimicóticos y su actividad antibacteriana (Kenig y Abraham, 1976) también es un inhibidor de la glucosa amino 6 fosfato sintetasa, una enzima esencial en la biosíntesis de la pared celular (Chmara *et al.*, 1985) hay reportes donde este antibiótico ha sido un eficaz agente de control biológico en particular al inhibir el crecimiento de la devastadora bacteria *E. amylovora* (Chen *et al.*, 2009). En algunas cepas de *B. subtilis* se ha encontrado chlorotetaine, un derivado clorado de bacilysin (Phister *et al.*, 2004; Rapp *et al.*, 1988). Aún no existen evidencias disponibles, pero algunos experimentos

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

sugieren que los dos compuestos podrían compartir la misma ruta biosintética (Yazgan *et al.*, 2001). El análisis de espectrofotometría de gases demostró que la cepa *B. amyloliquefaciens* produce chlorotetaine y ha sido la primera cepa en producirlo en vez de producir bacilysin (Arguelles-Arias *et al.*, 2009)

El genoma de *B. amyloliquefaciens* FZB42 tiene una amplia variedad de grupos de genes implicados en la síntesis de lipopéptidos y polipéptidos con actividad antifúngica, antibacteriana y nematocida (Chen *et al.*, 2009).

La bacteria *B. amyloliquefaciens* GA1 posee un gran potencial como bacteria controladora y en la promoción del crecimiento vegetal, por tal motivo es atractiva para investigaciones posteriores para el desarrollo de pesticidas biológicos e inocuos (Arguelles-Arias *et al.*, 2009). Por su parte, *B. amyloliquefaciens* PPCB004 aislada de cítricos se seleccionó como antagonista por su potencial en el control de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer* en melocotón (Arrebola *et al.*, 2010a). La aplicación del inhibidor de etileno 1-metil ciclopropeno (1-MCP) combinado con un tratamiento de *B. amyloliquefaciens* PPCB004 por inmersión en frutos de papaya en la etapa de 25 y 30% de madurez presentando una piel amarilla ofrece una práctica solución para garantizar la calidad de la fruta para el mercado interno, estos estudios fueron realizados en Sudáfrica, donde los frutos tratados mostraron una mejor calidad en general, con el mayor número de frutos comercializables y redujo la severidad de la enfermedad de papaya con Antracnosis y la pudrición por Phomopsis, sin embargo para que se utilice *B. amyloliquefaciens* para aplicarse en fruta fresca se requiere de mayor investigación (Osman *et al.*, 2010).

B. amyloliquefaciens y otros miembros del grupo de *Bacillus subtilis* son reconocidos como seguros GRAS (Food and Drug Administration, 1999). De acuerdo con los informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (2008), *B. amyloliquefaciens* no posee genes que codifican enterotoxinas. Sin embargo, una evaluación crítica de la seguridad de la cepa *B. amyloliquefaciens* utilizada en la superficie de la fruta debe ser investigada antes de su comercialización.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Con respecto a la bacteria *Bacillus subtilis* se ha reportado que produce una amplia variedad de antibióticos antibacterianos y antifúngicos. Algunos de estos compuestos, son: subtilin (Zuber *et al.*, 1993), subtilosin A (Babasaki *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 2004) y sublancin (Paik *et al.*, 1998), son de origen ribosomal, pero otros, como bacilysin, chlorotetain, micobacilina (Zuber *et al.*, 1993), rhizocticins (Kugler *et al.*, 1990), bacillaene (Patel *et al.*, 1995), difficidin (Zimmerman *et al.*, 1987), y lipopéptidos que pertenecen a la familias surfactina, iturina y fengycina (Zuber *et al.*, 1993), son sintetizados por sintetasas no ribosomales de péptidos. Otro mecanismo de acción de este género de bacterias antagonistas en las plantas contra el crecimiento de patógenos es por medio de enzimas que degradan los polímeros estructurales de los hongos (por ejemplo la quitinasa y la β -1,3 glucanasa) y los compuestos volátiles antifúngicos (Fiddaman y Rossall, 1993; Knox *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Pinchuk *et al.*, 2002; Leelasuphakul *et al.*, 2006). Los compuestos volátiles orgánicos secretados por la bacteria *B. subtilis* se han asociado con el favorecimiento del crecimiento de las plantas y la inducción de mecanismos de resistencia sistémica de plantas (Compant *et al.*, 2005).

Bacillus subtilis juega un papel importante en el suelo; es ubicuo, puede promover el crecimiento de plantas, protección contra el ataque de hongos patógenos (Utkhede y Smith, 1992; Asaka y Shoda, 1996; Emmert y Handelsman, 1999), también tiene la capacidad de degradar polímeros del suelo (Emmert y Handelsman, 1999). Sus esporas son resistentes a la desecación, al calor, a la radiación ultravioleta y a solventes orgánicos (Leelasuphakul *et al.*, 2008). La capacidad de *B. subtilis* de colonizar eficientemente la superficie de las raíces de las plantas es importante para la protección de las plantas. Este proceso se basa en la capacidad de moverse en la superficie y la formación de biofilms, la capacidad de evolución de las poblaciones de *Bacillus* es muy eficiente y se comportan como microcolonias para adherirse a las raíces y a la superficie de las partículas del suelo (Danhorn y Fuqua, 2007). La surfactina y la iturina modifican las propiedades de la superficie celular, influyendo positivamente en la propagación de las células, en la colonización y formación del biofilm (Kinsinger *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2004; Hofemeister *et al.*, 2004; Leclere *et al.*, 2006) por tal motivo puede favorecer la colonización en las raíces de las plantas de cualquier cultivo.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

B. subtilis aislado de suelo, ha sido reportado como agente de biocontrol contra la pudrición postcosecha de cítricos causada por hongos *Penicillium digitatum*, *A. citri*, *G. candidum*, *P. italicum* (Singh y Deverall, 1984). Según la bibliografía el biocontrol de *P. digitatum* primeramente por confrontación *in vitro* presentó un porcentaje de inhibición mayor de 60%, y posteriormente por pruebas *in vivo* aumentó su vida de anaquel en los cítricos de 5 a 9 días. Se logró una protección de 72.5 – 86.7% contra la enfermedad hasta el octavo día, con una temperatura de incubación a 25°C, con el tratamiento de la inoculación primero de los metabolitos secundarios o también con otro tratamiento de la suspensión de la bacteria *B. subtilis* directa, posteriormente a las 24h inocularon la suspensión de conidios del patógeno (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Carrillo-Fasio *et al.* (2005) evaluaron la efectividad de *Bacillus subtilis*, *Rhodotorula minuta* y su combinación en aplicaciones precosecha, para el control en postcosecha de antracnosis en mango (cultivar Kent). Los autores compararon el efecto de los biofungicidas con el efecto de un producto químico y un testigo absoluto. Se evaluaron cinco tratamientos: *R. minuta* 108 ufc/mL; *B. subtilis* 106 ufc/mL; *R. minuta* 106 ufc/mL + *B. subtilis* 104 ufc/mL; benomyl 0.5 g/L; y testigo absoluto. Se hicieron cinco aplicaciones previas a la cosecha del mango. Los frutos cosechados se almacenaron hasta por 15 días a 20°C y 85% de HR. Después de 15 días de almacenamiento, los agentes de control biológico mostraron mayor efectividad en el control de antracnosis en comparación con el control químico. Se encontró diferencia significativa entre la aplicación individual y la combinada de los microorganismos antagonistas. De acuerdo con la escala de Friedman, los frutos del testigo absoluto mostraron una severidad (en rangos) de 60.5 a los 15 días de almacenamiento, mientras que los frutos tratados con el fungicida químico presentaron una severidad de 41.7. Con la mezcla de *R. minuta* y *B. subtilis* se logró la mayor reducción de la enfermedad (severidad de 8.0), lo que resulta prometedor para su posible uso comercial. La aplicación de los tratamientos biológicos no afectó negativamente la calidad postcosecha de los frutos, observándose un desarrollo normal en los sólidos solubles totales, acidez titulable y evolución de la firmeza.

Con respecto a *B. subtilis* Fiddaman y Rossal (1993) observaron vacuolización y deformación de las hifas de *Rhizotocnia solani* y *Pythium ultimum*, provocadas por la formación de un compuesto

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

volátil con propiedades fungicidas. También se observó el efecto antagonista contra los hongos fitopatógenos de suelos en plantas de tomate, reduciendo la severidad de *Rhizotocnia solani*, *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Fusarium oxisporum* (Matar *et al.*, 2009).

B. subtilis ha sido autorizada por la Organización para la Autorización de Drogas en los alimentos de los Estados Unidos (FDA) y es uno de los organismos catalogados como seguros (GRAS) para su uso en la industria alimentaria (Denner y Gillanders, 1996).

La cepa B-3 *Bacillus subtilis* fue el primer organismo patentado para su uso en control biológico postcosecha de frutas que tienen semilla en los EE.UU (Pusey y Wilson, 1984). Pusey *et al.* (1988) llevaron a cabo una prueba piloto en condiciones comerciales simuladas para el control de la podredumbre parda de la los melocotones, B-3 se incorporó efectivamente en la cera que normalmente se utiliza en la línea de embalaje, controlando eficazmente *Botrytis*.

El desarrollo de Avogreen basado en *B. subtilis*, fue probado en el campo para el control biológico, se utiliza en el sur de África para el control de las especies de *Cercospora* y la antracnosis del aguacate (Korsten *et al.*, 1997; Janisiewicz y Korsten, 2002).

Cepas de *B. subtilis* han sido comercializadas como agentes de biocontrol para enfermedades de los cultivos producidas por hongos (Emmert y Handelsman, 1999). El biofungicida, *Serenade*, contiene la cepa de *B. subtilis*, ah sido eficaz contra una variedad de bacterias patógenos, incluyendo la *Erwinia*, *Pseudomonas*, y *Xanthomonas* (Pal *et al.*, 2004).

Los productos comerciales para el biocontrol basados en *Bacillus* (Schisler *et al.*, 2004) son los siguientes: *B. subtilis* QST 713 es el producto llamado *Serenade* y es eficiente contra algunos hongos y bacterias en frutas. *B. licheniformis* es conocido como *Ecoguard* y es efectivo contra hongos en césped. *B. subtilis* GB03 es el producto *Kodiak* y sirve contra hongos en algodón y soya. *B. pumilis* GB34 es el producto comercial *Yield Shield* y ayuda en el rendimiento contra los hongos en algodón. *B. amyloliquefasciens* y *B. subtilis* GB122 es *BioYield* es efectivo contra algunos hongos en plantas. *B. subtilis* MBI600 es *Subtilex* contra hongos en algon y soya. *B. subtilis* MBI600 y *Rhizobium es* *Hi Stick* es efectivo contra hongos de la soya (Jesper, 2008).

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

El otro género de importancia en el control biológico por su potencial antagonista son las *Pseudomonas* y han sido estudiadas desde hace décadas como organismos modelo para el control biológico de enfermedades de las plantas (Stockwell y Stack, 2007).

Las *Pseudomonas* es un género de bacterias ampliamente distribuido en muchas especies de plantas y tejidos (Bacon y Hiton, 1996), durante los últimos 20 años las *Pseudomonas* se han encontrado ampliamente encontrados en asociación con varias plantas huésped, incluido el algodón, chícharo y arroz (Chen, 1995; Cankar *et al.*, 2005). Además, otros mecanismos de protección que ofrecen las *Pseudomonas* spp. incluyen la producción de sideróforos (Bar-Ness *et al.*, 1991; Páez *et al.*, 2005) la inducción de resistencia (Ongena *et al.*, 2002; Pieterse *et al.*, 2000) y la competencia de *P. putida* por los nutrientes (Elad y Chet, 1987). Por lo tanto la bacteria *P. putida*, puede tener un importante papel en la inhibición de enfermedades de las plantas (Shi *et al.*, 2010). El primer informe sobre el aislamiento de *P. putida* MGP1 aislada del pericarpio de frutos de papaya, fue una bacteria endófito capaz de controlar agentes patógenos que se producen en la cosecha de frutos de papaya. Esta cepa tenía un amplio espectro para el control de fitopatógenos e inhibió a los diez patógenos probados: *Phytophthora nicotianae*, *Peronophythora litchii*, *Erwinia carotovora*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum higginsianum*, *Alternaria tenuis*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* (Shi *et al.*, 2010). *P. putida* MGP1 de frutos de papaya pudo colonizar, ya que se transporta y se propaga en la planta huésped después de ser inoculada artificialmente (Chen *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 2005; Quadt-Hallman *et al.*, 1997), y resultó eficaz en el control de la antracnosis (63%), cuando se aplicó en la etapa de florecimiento de la papaya (Shi *et al.*, 2010).

En la actualidad, hay tres formulaciones comerciales con el registro de inocuidad al medio ambiente en los EE.UU. por la Agencia de Protección para la supresión de enfermedades de las plantas, Bio-Ahorre 10 LP, Bio-Save 11 LP y A506 BlightBan (Stockwell y Stack, 2007).

Bio-Ahorre 10 LP y Bio-Ahorro 11 LP, contienen *Pseudomonas syringae* cepas ESC-10 y ESC-11, respectivamente, estos productos se aplican en las empacadoras para prevenir las enfermedades de postcosecha de hongos durante el almacenamiento de cítricos, frutas de pepita,

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

frutas de hueso y papas. Bio-Ahorre 10 LP está registrado para uso en cítricos (limón, naranja y pomelo) para el control de *P. digitatum*, *P. italicum* y *Geotrichum candidum*; en las cerezas se recomienda para el control de *P. expansum* y *Botrytis cinérea*; en manzanas y peras para el control de *P. expansum*, *B. cinerea*, *Mucor* y piramidal; y en las papas para el control de *F. sambucinum* y *Helminthosporium solani*.

Bio-Save 11 LP está registrado para su uso en papa para el control de *Rhizopus stolonifer* y para el mismo patógeno *Rhizopus stolonifer* en manzana, pera y patata: Bio-Ahorre 10 LP (Stockwell y Stack, 2007).

BlightBan A506, contiene *P. fluorescens* cepa A506 y se aplica principalmente a los árboles de peras y manzanos durante la floración para eliminar la plaga bacteriana *Erwina*. La combinación de BlightBan A506 con el antibiótico estreptomina mejora el control del fuego bacteriano, incluso en áreas con poblaciones resistentes a la estreptomina del patógeno. Adicionalmente, puede reducir las lesiones por las heladas en frutos rojizos (Stockwell y Stack, 2007).

Estos productos de control biológico que consiste en *Pseudomonas* spp. proporcionan una excelente eficacia contra las limitaciones de producción múltiple, son relativamente fácil de aplicar, y pueden ser integrados con productos convencionales para el control de la enfermedad. Estas características contribuyen a la adopción de estos productos por los productores y empacadoras (Stockwell y Stack, 2007).

P. aureofaciens cepa Tx-1 fue comercializado por Sistemas EcoSoil como biofungicida Spot-less, este producto está destinado a ser aplicado a través de sistemas de riego en césped de golf para controlar la enfermedad de antracnosis, moho rosa causado por la nieve y las enfermedades causadas por *Pythium* spp. Aunque Spot-less ya no está disponible comercialmente, este producto sigue siendo bioplaguicida registrado en la EPA (Stockwell y Stack, 2007).

Sin embargo, resultaron con menor potencial que *Bacillus* spp. en las pruebas de antagonismo *in vitro*. Esto podría deberse al mecanismo de acción utilizado por estas bacterias para el control del hongo fitopatógeno, podría ser que sea preponderante la inducción de resistencia que causa al interactuar con la planta, lo cual no se refleja en las pruebas *in vitro*.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Los resultados del presente estudio son de gran relevancia en el manejo de antracnosis postcosecha en papaya mediante microorganismos antagonistas; al parecer la estrategia adecuada sería hacer uso de mezclas de estas bacterias para ampliar el espectro del control biológico de la antracnosis en papaya.

Se han encontrado diferencias genéticas entre aislados bacterianos del genero *Bacillus*, incluso entre la misma especie, así como también diferentes niveles de actividad biocontroladora, de tal manera que las interacciones y el reconocimiento entre las bacterias benéficas y el fitopatógeno podrían tener cierta especificidad como lo han mostrado las interacciones bacteria-fitopatógeno-planta. Esto no es tan sorprendente ya que la interacción específica entre ciertos agentes de control biológico y algunos cultivos comerciales ya ha sido previamente demostrada (Jesper, 2008). Es importante señalar que los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a efectos de interacción bacteria-patógeno, donde la especie de ambos determina el grado de biocontrol.

Habría que destacar que la mayoría de los biocontroladores se que se comercializan son para precosecha y lo que se busca con este trabajo es mejorar el manejo postcosecha y reducir el uso de fungicidas químicos en esta etapa. Para ello deben realizarse estudios con las bacterias con potencial biocontrolador en ensayos postcosecha, para evaluar su efectividad y proponerlas par el desarrollo de productos alternativos, esto permitirá establecer mejores bases para un control biológico más efectivo, pretendiendo reducir el uso de plaguicidas.

También es importante profundizar en estudios futuros sobre la patogenicidad de los aislados de *Colletotrichum*; si existe patogenicidad diferencial entre ambas especies, si *C. capsici* es un patógeno secundario o si el mismo puede causar lesiones iniciales o si pudiese darse un efecto sinérgico de ambas especies para incrementar su patogenicidad, también sería interesante hacer estudios de pruebas de confrontación *in vivo* y evaluar su efecto en la vida de anaquel en frutos de papaya.

7. CONCLUSIONES

La identificación de los aislados fúngicos por RFLP reveló la diversidad genética de *Colletotrichum* presente en frutos de papaya, la cual se relacionó con la variabilidad morfológica microscópica y macroscópica.

Se identificaron tres especies de *Colletotrichum*: *C. capsici*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.* aislados de Tecoman Estado de Colima.

Los aislados con mayor actividad antagonista *in vitro* fueron *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* contra todos los aislados fúngicos de *Colletotrichum*.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adaskaveg JE, Föster H (2000) Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. Prusky D, Freeman S, Dickman M (eds). American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp. 317-336.

Adaskaveg JE, Hartin RJ (1997) Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87:979-987.

Adikaram NKB, Karunaratne A (1998) Suppression of avocado anthracnose and stem end rot pathogens by endogenous antifungal substances and a surface inhabiting *Pestalotiopsis* sp. *ACIAR Proceedings Series* 80:72-77.

Afanador-Kafuri L, Minz D, Maymon M, Freeman S (2003) Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93:579-587.

Agrios GN (2002) *Fitopatología* Editorial Limusa S.A de C.V. México D.F., México. 838 p.

Aharoni Y, Fallik E, Copel A, Gil A, Grinberg S, Klein JD (1997) Sodium carbonate reduces postharvest decay development on melons. *Postharvest Biology and Technology* 10:201-206.

Álvarez MA, Nishijima TW (1987) Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease* 71:681-686.

Arauz LF (2000) Mango Anthracnose: Economy Impact and current options for interfrated management. *Plant Dis* 84:600-611.

Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8:1-12.

Arias C (1992) Programa de pérdidas de postcosecha de frutales en los países menos desarrollados de la FAO. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Italia. 183 p.

Arras G, De-Cicco V, Arru S, Lima G (1998) Biocontrol by yeasts of blue mold of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73:413-418.

Arras G (1996) Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruit. *Postharvest Biology and Technology* 8:191-198.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Arrebola E, Sivakumar D, Bacigalupo R, Korsten L (2010a) Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils on the control of postharvest diseases in peach cv. Transvaal. *Crop Prot.* 29:369-377.

Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl Environ Microbiol* 62:4081-4085.

Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, Kurahashi K (1985) Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem. (Tokyo)* 98:585-603.

Bacon CW, Hinton DM (1996) Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi, in *Manual of Environmental Microbiology*, ed. by Hurst CJ, Knudsen GR, Mcinerney MJ, Stetzenbach C and Walter MV. ASM Press, Washington, DC. pp. 413-421.

Badii M, Jerónimo L (2007) Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT Toxicología de Plaguicidas* 19:21-34.

Badillo VM (2002) *Carica* L. vs. *Vasconcella* St. Hil. (*Caricaceae*) con la Rehabilitación de este Ultimo. *Ernstia* 10:74-79.

Bailey JA, Jeger JM (1992) *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 p.

Bais H, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology* 134:307-319.

Banat I, Makkar R, Cameotra S (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology* 53:495-508.

Barkai-Golan R (2001) *Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.

Bar-Ness E, Chen Y, Hadar Y, Marschner H and Römheld V (1991) Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant Soil* 130:231-241.

Barnet HL, Hunter BB (1998) *Illustrated genera of imperfect fungi*. Cuarta edición. Minesota. APS Press. 218 p.

Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosque-Molina E, Wilson CL (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1089.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 51:215-229.

Biggs AR, Miller SS (2001) Relative susceptibility of selected apple cultivars to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 85:657-660.

Bonaterrea A, Mari M, Casalini L, Montesinos E (2003) Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology* 84:93-104.

Bonde MR, Peterson GL, Maas JL (1991) Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81:1523-1528.

Brown AGE, Sreenivasaprasad S, Timmer LW (1996) Molecular characterization of slow growing orange and Key lime Anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.

Bruns TD, White TJ, Taylor JW (1991) Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22:525-564.

Buensanteai N, Yuen GY, Prathuangwong S (2008) The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces Auxin, Surfactin and Extracellular Proteins for Enhanced Growth of Soybean Plant. *Thai Journal of Agricultural Science* 41:101-116.

Burkill IH (1966) A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula (2nd Edn), Malay Ministry of Agriculture and Cooperatives, Kuala Lumpur.

Calvente V, Benuzzi D, De Tosetti MID (1999) Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 43:167-172.

Cankar K, Kraigher H, Ravnikaar M, Rupnik M (2005) Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiol Lett* 244:341-345.

Cannon P, Bridge PD, Monte E (2000) Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction*. Prusky, D., S. Freeman, and M. Dickman (Eds.). APS Press. USA. pp. 1-20.

Cappellini RA, Cepones MJ, Lightner GW (1988) Disorders in apricot and papaya shipments to the New York market. *Plant Disease* 72:366-368.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Carillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Muy-Rangel MD, Sañudo-Barajas A, Márquez Zequera I, Allende-Molar R (2005) Control Biológico de Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su Efecto en la Calidad Postcosecha del Mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32.

Castoria R, De Curtis F, Lima G, Caputo L, Pacifico S, De Cicco V (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30), an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action. *Postharvest Biology and Technology* 32:717-724.

Castoria R, Curtis F, Lima G, Cicco V (1997) b-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 12:293-300.

Chanchaichaovivat A, Ruenwongsa P, Panijpan B (2007) Screening and identification of yeast strains from fruit and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control* 42:326–335.

Chau KF, Alvarez AM (1983) A histological study of anthracnose on *Carica papaya* L. *Phytopathology* 73:1113-1116.

Chauhan OP, Raju PS, Shylaja R, Dasgupta DK, Bawa AS (2006) Synergistic effects of modified atmosphere and minimal processing on the keeping quality of pre-cut papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81:903-909.

Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW (1995) Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biol Control* 5:83–91.

Chen X, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mogel G, Kunz S, Borriss R (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* Dare efficient in controlling fire blight disease. *Journal of biotechnology* 140:38-44.

Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal Biotechnology* 140:27-37.

Chernin L, Chet I (2002) Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Chmara H (1985) Inhibition of glucosamine synthase by bacilysin and anticapsin. *Journal of general microbiology* 131:265-271.

Cia P, Pascholati FS, Benato EA, Camili CE, Santos AC (2007) Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 43:366-373.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka, E (2005) Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.

Conrath U, Beckers G, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman M, Pieterse C, Poinssot B, Pozo M, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch Mani B (2006) Priming: getting ready for battle. *Molecular plant microbe interaction* 19:1062-1071.

Contreras C (2006) Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Magnifera indica* L) y tallos de mora (*rubís glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Trabajo de grado presentado como requisito para la carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana.

Cook JR (1985) Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology* 75:25-29.

Cook JR, Baker FK (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press. 539 p.

De Costa DM, Erabadupitiya HRUT (2005) An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology* 36:31-39.

Costa Rica (1991) Diagnóstico sobre el manejo postcosecha y determinación de pérdidas en naranja y papaya, destinadas al mercado nacional de Costa Rica. Programa Integral de Mercadeo Agropecuario. 50 p.

Dade HA, Gunnell J (1969) *Classwork with Fungi*. CMI, Kew.

Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of microbiology* 61:401-422.

De los Santos F, Becerra EN, Mosqueda R, Vázquez A, Vargas AB, Pérez LE (1997) Manual de producción de papaya en el Estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental. Folleto Técnico N° 17 División Agrícola. 86 p.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Dembele A, Karim TS, Kone M, Coulibaly DT (2005) Export papaya postharvest protection by fungicides and the problems of the maximal limits of residues. *African Journal of Biotechnology* 4:109-112.

Denner WHB, Gillanders, TGE (1996) The legislative aspects of user of industrial enzymes in the manufacture of food ingredients. In: Godfrey, T., West, S. (Eds.), *Industrial Enzymology*, 2nd ed. The Macmillan Press Ltd., Basingstoke. pp. 397-411.

Denoyes-Rothan B, Guérin G, Lerceteau-Köhler E, Risser G (2005) Inheritance of resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* 95:405-412.

Devi AN, Arumugam T (2005) Studies on the shelf life and quality of Rasthali banana as affected by postharvest treatments. *Orissa Journal of Horticulture* 33:3-6.

Dikin A, Sijam MA, Abidim Z, Zacaria HM, Idris AS (2002) Interaction between *Schizophyllum commune* and antagonistic bacteria isolated from rotted fruits of oil palm. In: Proceedings of Towards Commercialization of Microbiology Research. 25th Malasian Microbiology Symposium and 5th UNESCO National Workshop for the Promotion of Microbiology in Malasia, 8-9 September 2002, Kota Bahru, Kelantan Darul Naim, Malaysia.

Dionisio GA, Keiko TN (2008) Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens.

Dodd JC, Estrada A, Jeger MJ (1992) Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). p. 308-325. CAB International. Wallingford, U.K.

Droby S (2006) Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulture* 709:45-51.

Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski ME (1989) Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology* 35:794-800.

Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski ME (1992) Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica* 20:1495-1503.

Elad Y, Chet I (1987) Possible role of competition for nutrient in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77:190-195.

El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski ME (1998) Ultrastructural and cytochemical aspects of biocontrol activity of *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88:282-291.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski ME (2004) Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), Diseases of Fruit and Vegetables, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 511-535.

El Moussaoui A, Nijs MP, Wintjens RC, Vincentelli J, Azarkan M, Looze Y (2001) Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. Cell and Molecular Life Sciences 58:556-570.

Elósegui OC, Ibis AES (2010) Evaluación microbiológica *in vitro* de muestras de especies de hongos entomopatógenos ingredientes activos de bioplaguicidas cubanos. Fitosanidad 14:102-109.

Emmert EAB, Handelsman J (1999) Biocontrol of plant disease: a gram positive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 171:1-9.

FAO (2010). FAOSTAT agriculture data. The Statistics Division. <http://apps.fao.org/faostat>

FAO (2008). FAOSTAT. <http://www.fao.org/Ag/agl/agll/rla128/UNSM/unsm8/unsm8.htm>

Fiddaman PJ, Rossall S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74:119-126.

Food and Drug Administration (1999) Code of Federal Regulations, Title 21: Food and Drugs, Chapter 1: Food and Drug Administration Department of Health and Human Services, Part 184: Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe. US Government Printing Office, Washington, DC.

Freeman S (2000) Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp. 131-144.

Freeman S, Katan T (1997) Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Phytopathology 87:516-521.

Freeman S, Katan T, Shabi E (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease 82:596-604.

Freeman S, Minz D, Maymon M, Zvaibil A (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum dentatum* sensu Simmonds. Phytopathology 91:586-592.

Gamagae SU, Sivakumar D, Wilson-Wijeratnam RS, Wijesundra RLC (2003) Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. Crop Protection 22:775-779.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can J Bot* 69:180-190.

González-Aguilar GA, Buta JG, Wang CY (2003) Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. *Postharvest Biology and Technology* 28:361-370.

Govender V, Korsten L, Sivakumar D (2005) Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology* 38:57-65.

Guedner RC, Reilly CC, Pussey PL, Costello CE, Arrendale RF, Cox RH, Himmelsbach DS, Crumley FG, Culter HG (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36:366-370.

Guerber JC, Correll JC (2001) Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* 93:216-229.

Gunnell PS, Gubler WD (1992) Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84:157-16.

Gutiérrez JGA, Gutiérrez OA, Nieto DA, Téliz DO, Zavaleta EM, Delgadillo FS, Vaquera HH (2003) Evaluación de resistencia a imazlil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. y control de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:379-383.

Gutiérrez JGA, Nieto DÁ, Téliz DO, Zavaleta EM, Vaquera HH, Martínez TD, Delgadillo FS (2001) Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:90-93.

Gutiérrez OA, Nieto DA, Gutiérrez JGA, Delgadillo FS, Domínguez JJA (2002) Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:24-30.

Guzmán D (1998) Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.). Sistema Unificado de Información Institucional. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José, Costa Rica. 26 p.

Hewajulige IGN, Sivakumar D, Sultanbawa Y, Wilson RSW, Wijesundera RLC (2007) Effect of chitosan coating on the control of anthracnose and overall quality retention of papaya (*Carica papaya* L.) during storage. *Acta Horticulturae* 740:245-250.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Hipolito A, El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski MA (2000) Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology* 19:265-272.

Hofemeister J, Conrad B, Adler B, Hofemeister B, Feesche J, Kucheryava N, Steinborn G, Franke P, Grammel N, Zwintscher A, Leenders F, Hitzeroth G, Vater J (2004) Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A 1/3. *Molecular genetic and genomics* 272:363-378.

Holliday, P. 1995. *Fungus diseases of tropical fruits*. Dovel Publication, Inc. New York. 624 p.

INIA, 1981. *El cultivo de papaya en Colima*. DF. México. 12 p.

INIA, 1982. *Ciclos de cultivos*, DF. México.

Intra B, Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarashi Y, Panbangred W (2011) Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes* 4:1-9.

Ippolito A, Nigro F (2000) Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruit and vegetables. *Crop Protection* 19:715-723.

Janisiewicz WJ, Korsten L (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.

Janisiewicz WJ, Roitman J (1988) Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697-1700.

Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Sharer C (2000) Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruit with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90:1196-1200.

Janisiewicz WJ, Yourman L, Roitman J, Mahoney N (1991) Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease* 75:490-494.

Jeffries P, Dodd JC, Jeger MJ, Plumbley RA (1990) The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39:343-366.

Jesper D (2008) *Bacillus* based biocontrol on brassica. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Plant Biology and Forest Genetics Uppsala Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. pp. 1-38.

Jiang YM, Zhu XR, Li YB (2001) Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 34:430-436.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Jijakli MH, Grevesse C, Lepoivre P (2001) Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases: challenges and difficulties. *Bulletin-OILB/SROP* 24:317-318.

Jobin-Décor MP, Graham GC, Henry RJ, Drew RA (1996) RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:1-7.

Johnston PR, Jones D (1997) Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruits rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420-430.

Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthelemy JP, Thonart P, Ongena M (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular plant microbe interactions* 22:456-468.

Kader A (1999) Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Hort* 485:203-209.

Kakaew P, Nimitkeatkai H, Srilaong V, Kanlayanarat S (2007) Effects of CaCl₂ dips and heat treatments on quality and shelf-life of shredded green papaya. *Acta Horticulturae* 746:335-342.

Karamanoli K, Menkissoglu-Spirodi U, Bosabalidis AM, Vokou D, Constantinidou HIA (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. *Chemoecology* 15:59-67.

Kefialew Y, Ayalew A (2008) Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology* 50:8-11.

Kenig M, Abraham E (1976) Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. *Journal of general microbiology* 94:37-45.

Kim MS, Moore PH, Zee F, Fitch MM, Steiger DL, Manshardt RM, Paull RE, Drew RA, Sekioka T, Ming R (2002) Genetic and molecular characterization of *Carica papaya* L. *Genome* 45:503-512.

Kim SH, Chi JG, Reith A, Kadenbach B, Piano S, Neyrotti V, Mihgeli Q, Gullino ML (1997) Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apples. *Postharvest Biology and Technology* 11:131-140.

Kinsinger R, Shirk M, Fall R (2003) Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of bacteriology* 185:5627-5631.

Kloepper J, Leong J, Teintze M, Schroth M (1980) *Pseudomonas* siderophore: a mechanism explaining disease-suppressive soil. *Current microbiology* 4:317-320.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Knox OGG, Killham K, Leifert C (2000) Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Appl. Soil Ecol.* 15:227-231.

Korsten L (2006) Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation* 1:48-61.

Korsten L, De-Villiers EE, Wehner FC, Kotze JM (1997) Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81:455-459.

Koutmoussi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186:1084-1096.

Kugler M, Loeffler W, Rapp C, Kern A, Jung G (1990) Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Arch. Microbiol.* 153:276-281.

Latunde-Dada AO (2001) *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2:187-198.

Leclere V, Marti R, Bechet M, Fickers P, Jacques P (2006) The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Archives of microbiology* 186:475-483.

Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S (2008) Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48:113-121.

Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S (2006) Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight pathogens. *Enzym. Microb. Technol.* 38:990-997.

Lenné JM (1992) *Colletotrichum* diseases of legumes. In: *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.) CAB International. Wallingford, U.K. pp. 134-166.

Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M (1992) Surfactin iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74:1047-1051.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Maharaj A, Rampersad SN (2011) Genetic Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* Associated with Anthracnose Disease of Papaya (*Carica papaya* L.) and Bell Pepper (*Capsium annuum* L.) Based on ITS PCR-RFLP Fingerprinting. Mol Biotechnol DOI 10.1007/s12033-011-9434-2.

Mari M, Neri F, Bertolini P (2007) Novel Approaches to Prevent and Control Postharvest Diseases of Fruit. Stewart Postharvest Review 3:1-4.

Martínez-Culebras P, Barrio E, Garcia MD, Querol A (2000) Identification of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose of strawberry based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. FEMS Microbiology 189:97-101.

Matar SM, El-Kazzaz SA, Waigih EE, El-Diwany AI, Moustafa HE, Abo-Zaid GA, Abd-Elsalam HE, Hafez EE (2009) Antagonistic and Inhibitory Effect of *Bacillus subtilis* Against Certain Plant Pathogenic Fungi, I. Biotechnology 8:53-61.

Mc Laughlin RJ, Wilson CL, Chalutz E, Kurtzman WF, Osman SF (1990) Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. Applied and Environmental Microbiology 56:3583-3586.

Mena G (1999) Epidemiología y control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en mango. México.

Mercier J, Wilson CL (1994) Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biological Control 4:138-144.

Montealegre JR, Reyes R, Perez LM, Herrera R, Silva P, Besoain X (2003) Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Journal of Biotechnology 6(2).

Montero TV, Montalvo HL, Morales GL, Azpiroz RS (1998) Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de DNA amplificados al azar. Memorias del XVII Congreso de Fitogenética. Acapulco, Guerrero, México. 348 p.

Morales JLG (1996) Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De México. 96 p.

Morales JLG, Azpiroz HSR, Pedraza MES (2009) Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. Revista UDO Agrícola 9:848-856.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Mosca JL, Durigan JF (1995) Post-harvesting conservation of papaya fruits *Carica papaya* L. 'improved Sunrise Solo line 72/12', with utilization of protector films and wax, associated with refrigeration. *Acta Horticulturae* 370:217-222.

Nakasone HY, Paull RE (1998). Tropical fruits. CAB International, Wallingford, Oxon UK.

Nelson RR (1979) The evolution of parasitic fitness. In: J.G. Horsfall and E.B. Cowling (eds.). *Plant Disease an Advanced Treatise*. Vol IV. Academic Press, N. Y. 23-46.

Noa CJC (2003) Estudio molecular de enfermedades virales en el cultivo de papayo en México. Tesis Doctoral. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico. Unidad Irapuato. Departamento de ingeniería genética. 1-8 pp.

O'connell S, Perfect S, Hughes B, Carzaniga R, Bailey J, Green J (2000) Dissecting the Cell Biology of *Colletotrichum* Infecting Processes. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. D. Prusky. S. Freeman and M.B. Dickman, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp 57-77.

Oliveira R, Moral J, Bouhmidi K, Trapero A (2005) Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum spp.* causantes de la Antracnosis del olivo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 31:531-548.

Olivera, S. y Daniel, R. 2008. Pesticidas, Salud y Ambiente. Revista Posdata.

Ongena M, Giger A, Jacques P, Dommès J, Thoart P (2002) Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Eur J Plant Pathol* 108:187-196.

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology* 16:115-125.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology* 9:1084-1090.

Osman MS, Sivakumar D, Korsten L (2010) Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Protection* 1-6. doi:10.1016/j.cropro.2010.09.014.

Páez M, Martínez-Nieto P, Bernal-Castillo J (2005) Siderophore producing *Pseudomonas* as pathogenic *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* antagonists. *Univ Sci* 10:65-74.

Paik SH, Chakicherla A, Hansen JN (1998) Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 273:23134-23142.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Pal HB, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology* 134:307-319.

Palhano FL, Vilches TTB, Santos RB, Orlando MTD, Ventura JA, Fernandez PMB (2004) Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 95:61-66.

Parra L (2008) Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica* L) variedad hilacha. Memoria de Microbiólogo Agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias Básicas Carrera De Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogota. 21 p.

Patel PS, Huang S, Fisher S, Pirnik D, Aklonis C, Dean L, Meyers E, Fernandes P, Mayerl F (1995) Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physicochemical characterization and biological activity. *Journal of antibiotic* (Tokyo) 48:997-1003.

Paull RE (1990) Postharvest heat treatments and fruit ripening. *Postharvest News and Information* 1:355-363.

Paull RE (1996) Ripening behavior of papaya (*Carica papaya* L.) exposed to gamma radiation. *Postharvest Biology and Technology* 7:359-370.

Paull RE, Chen NJ (1989) Waxing and plastic wraps influence water loss from papaya fruit during storage and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114:937-942.

Paull RE, Nishijima W, Reyes M, Cavaletto CC (1997) Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology* 11:165-179.

Peres NA, Timmer LW, Adaskaveg JE, Correll JC (2005) Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89:784-796.

Pérez LM, Baquero MJ, Beltran JD (2003) Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Rev Col Biotechnology* V. pp. 24-35.

Pérez M (2006) Avances en las principales técnicas y tratamientos de reducción de pérdidas y conservación postcosecha de frutas. UCLA- Postgrado de Horticultura. pp. 31-45.

Phister TG, O'Sullivan DJ, McKay L (2004) Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough. *Applied and environmental microbiology* 70:631-634.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ (2000) Rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol* 57:123-134.

Pimentel RMA, Walder JMM (2004) Gamma radiation in papaya harvested at three stages of maturation. *Scientia Agricola* 61:146-150.

Pinchuk IV, Bressollier P, Sorokulova IB, Verneuil B, Urdaci MC (2002) Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Res. Microbiol.* 153:269–276.

Proexant (2008) <http://www.proexant.org.ec/Manual%20de%20papaya.htm>

Prusky D, Freeman S, Rodriguez RJ, Keen NT (1994) A nonpathogenic mutant strain of *Colletotrichum magna* induces resistance to *C. Gloeosporioides* in avocado fruit. *Molecular Plant Microbe Interaction* 7:326–333.

Pusey PL (1989) Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pesticide Science* 27:133-140.

Pusey PL, Hotchkiss MW, Dulmage HT, Banumgardner RA, Zehr EI (1988) Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Disease* 72:622-626.

Pusey PL, Wilson CL (1984) Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68:753-756.

Quadt-Hallman A, Hallman J, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. *Can J Microbiol* 43:254-259.

Rahman MA, Kadir J, Mahmud TMM, Abdul RR, Begum MM (2007) Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. *Asian Journal of Plant Sciences* 6:12-20.

Rapp C, Jung G, Katzer W, Loeffler W (1988) Chlorotetain from *Bacillus subtilis*, an antifungal dipeptide with an unusual chlorine containing amino acid. *Angewandte chemie interationnal edition* 12:1733-1734.

Righi E, Giacomazzi CG, Bassetti M, Bisio F, Soro O, McDermott JL, Varnier OE, Ratto S, Viscoli C (2007) Soft-tissue infection with *Absidia corymbifera* and kidney complications in an AIDS patient. *Medical Mycology* 45:637-640.

Roberts RG (1990a) Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80:526-530.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Rodríguez AN, Jiménez FC, Sánchez GM (2002) Producción Económica de papaya Maradol. FUPPUE - ITa 32 – INIFAT. 178 p.

Rodríguez AR, Rodríguez AN, Corrales RS (1966) “La Fruta bomba Maradol”, Congreso Nacional Fruticultores, Habana.

Rodríguez RG, Ramírez MTR, Simpson J (2004) Capacidad de anastomosis de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Sociedad Mexicana de Fitopatología 22:37-43.

Ron E, Rosenberg E (2001) Natural roles of biosurfactants. Environmental microbiology 3:229-236.

Rosewich UL, McDonald BA (1994) DNA fingerprinting in fungi. Methods in Molecular and Cellular Biology 5:41-48.

SAGARPA (2010) Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.

SAGARPA (2012) Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/index.php>

Saldarriaga-Cardona AJ, Castaño-Zapata R, Arango-Isaza R (2008) Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 32:145-156.

Saravanakumar D, Ciavorella A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML (2008) *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH-1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. Postharvest Biology and Technology 49:121–128.

Schisler D, Slininger P, Behle R and Jackson M (2004) Formulation of Bacillus spp. for biological control of plant diseases. Phytopathology 94:1267-1271.

Sepiah M (1993) Efficacy of propiconazole against fungi causing postharvest diseases on Eksotika papaya. In: Champ BR, Highley E, Johnson GI (Eds) Postharvest Handling of Tropical Fruits, ACIAR Conference Proceedings, Chiangmai, Thailand, 50:455-457.

Sharma RR, Dinesh S, Rajbir S (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50:205–221.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Shi J, Liu A, Li J, Feng S, Chen W (2010) Identification of endophytic bacterial strain MGP1 selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. *J Sci Food Agric* 90:227-232.

Smilanick JL, Denis-Arrue R (1992) Control of green molds of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease* 76:481-485.

Simmonds JH (1965) A study of species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 22:437-459.

Singh D, Sharma RR (2007) Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), *Sustainable Pest Management*. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Singh P, Cameotra S (2004) Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemistry and Biophysical Research Communication* 319:291-297.

Singh V, Deverall BJ (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions in British Mycological Society* 83:487-490.

Sitterly WR, Keinath AP (1996) Anthracnose. In: *Compendium of cucurbit diseases*. Zitter, T.A., Hopkins, D.L., and Thomas, C.E. (Eds.) APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 24-25.

Sivakumar D, Hewarsthamagae NK, Wilson RSW, Wijesundera RLC (2002) Effect of ammonium carbonate and sodium bicarbonate on anthracnose of papaya. *Phytoparasitica* 30:486-492.

Sivakumar D, Sultanbawa Y, Ranasingh N, Wijesundera RLC (2005) Effect of the combined application of chitosan and carbonate salts on the incidence of anthracnose and on the quality of papaya during storage. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80:447-452

Smith BJ, Black LL (1990) Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis* 74:69-76.

Sobiczewski P, Bryk H, Berezynski S (1996) Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in the control of postharvest diseases. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 4:35-45.

Singh P, Cameotra S (2004) Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemistry and Biophysical Research Communication* 319:291-297.

Srilaong V, Chansamrankul C (2007) Comparison of active and passive modified atmospheres on quality of shredded green papaya. *Acta Horticulturae* 746:443-448.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Stein T, Düsterhus S, Stroh A, Entian KD (2004) Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2349-2353.

Stockwell VO, Stack JP (2007) Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* 97:244-249.

Sutton BC (1980) The *Coelomycetes* fungi imperfecti with pyrenidia, acervula and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 696 p.

Sutton BC (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey JA, Jeger MJ (eds). CAB Internacional. Wallingford, UK. pp. 1-26.

Sutyak KE, Wirawan R, Aroutcheva A, Chikindas M (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of applied microbiology* 104:1067-1074.

Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H (2004) Population diversity and pathogenicity mechanisms of *Colletotrichum* spp. causing olive anthracnose. Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology. University of Aberdeen, UK.

Tapia RT, Quijano AR, Cortes AV, Lappe P, Larque AS, Perez DB (2008) PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Mol Biotechnology* 40:293-298.

Tavares GM (2004) Control químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita. In: Silva K S, T. N. Hojo, O. L. Lemos, M. P. Bomfim, A. A. Bomfim, G. L. Esquivel, A. P. B. Prado, A. R. São José, N. O. Dias, G. M. T. 2006. Patogenicidad causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) em diferentes espécies frutíferas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28:131-133.

Teixeira SJ, Rashid Z, Tan ND, Sivakumar D, Gera A, Teixeira SM, Tennant FP (2007) Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1:47-73.

Tong K, Rohrbock KG (1980) Role of *Penicillium funiculosum* strains in the development of pineapple fruit diseases. *Phytopathology* 70:663-665.

Torres MR (1977) Papaya en frutales. Manual de Asistencia Técnica No. 4 Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá, Colombia.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Torres R, Teixido N, Vinas I, Mari M, Casalini L, Giraud M, Usall J (2006) Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. *Journal of Food Protection* 69:2703-2711.

Toure Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology* 96:1151-1160.

USDA (2004) Agricultural Quarantine Inspection Monitoring (AQIM) Handbook. USDAAPHIS,PPQ. http://www.aphis.usda.gov/ppq/manuals/pdf_files/AQIM_Handbook.pdf.

USDA (2008) Importation of Fresh Papaya Fruit, *Carica papaya* L., into the Continental United States from Ecuador. A Pathway-Initiated Risk Assessment. Rev. 004.

Utkhede RS, Smith EM (1992) Promotion of apple tree growth and fruit production by the EBW-4 strain of *Bacillus subtilis* in apple replant disease soil. *Can J Microbiol* 38:1270-1273.

Villanueva RA, Yáñez MJM, Hernández AMA (2008) Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia* 42:689-701.

Villegas VN (1997) Edible fruits and nuts *Carica papaya* L. In EWM Verheij, RE Coronel, Eds, volume 2. Wageningen University, The Netherlands.

Waller JM (1992) *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). CAB International. Wallingford, U.K. pp. 167-185.

Waller JM, Bridge PD (2000) Recent advances in understanding *Colletotrichum* diseases of some tropical perennial crops. In: *Colletotrichum: Host specificity, pathogenicity, and hostpathogen interactions*. Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B. (Eds.) APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 337-345.

Watson, B. (1997) Agronomy agroclimatology notes for the production of papaya. MAFFA, Australia.

Wharton PS, Diéguez-Uribeondo J (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anuales del Jardín Botánico de Madrid*, 61:3-22.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, California, USA. pp. 315-322.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

Wilson CL, Wisniewski ME (1989) Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27:425-441.

Wisniewski M, Biles C, Droby S (1991) The use of yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. In: Wilson, C.L., Chalutz, E. (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables*. Proc. Workshop, US Department of Agriculture, ARS-92. pp. 167-183.

Wisniewski ME, Wilson CL, Hershberger W (1989) Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. *Plant Disease* 81:204-210.

Yahia E, Paull R (1997) The future of modified atmosphere (MA) and Controlled atmosphere (CA) uses with tropical fruits. *Cronica Horticulture* 37:18-19.

Yakoby N, Zhou R, Koblier I, Dinoor A, Prusky D (2001) Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose in avocado fruit. *Phytopathology* 91:143-148.

Yazgan A, Ozcengiz G, Marahiel M (2001) Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin. *Biochimica biophysica Acta* 1518:87-94.

Zhao M, Moy J, Paull RE (1996) Effect of gamma-irradiation on ripening papaya pectin. *Postharvest Biology and Technology* 8:209-22.

Zhu SJ (2006) Non chemical approaches to decay control in postharvest fruit. In: Nouredine, B., Norio, S. (Eds.), *Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 297-313.

Zhou T, Northover J, Schneider KE (1999) Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 21:375-381.

Zimmerman SB, Schwartz CD, Monaghan RL, Pelak BA, Weissberger B, Gilfillan EC, Mochales S, Hernandez S, Currie SA, Tejera E (1987) Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *Journal of antibiotic (Tokyo)* 40:1677-1681.

Zuber P, Nakano MM, Marahiel MA (1993) Peptide antibiotics. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 897-916.

9. APÉNDICE

APÉNDICE I

Preparación de agar dextrosa papa (PDA)

Extracto de papa (preparada a partir de 200g de papa por litro)
Dextrosa 10g
Agar bacteriológico 18g

Esterilizar a 121°C a 15lb por 15 minutos en autoclave

APÉNDICE II

Extracción de DNA genómico de hongo (Dellaporta et al., 1983)

Para la extracción de DNA de *Colletotrichum* se utilizó el método Dellaporta modificado (Dellaporta S.L., Wood J., and Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Versión II. Plant Mol Biol Rep 1: 19-21).

01. Se colectó aproximadamente 100mg de tejido
02. Se procedió a molerlo en presencia de nitrógeno líquido para colectarlo en tubos eppendorf
03. Se adicionó 600µL de buffer Dellaporta (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA, 500mM NaCl, 10Mm beta-mercaptoetanol (10µL para 10 mililitros) 1.3% SDS)
04. Se calentó la muestra a 65°C durante 10 minutos
05. Se agregó 5µL de RNAasa y se agitó en el vortex por 5 minutos
06. Se adicionó 600µL de acetato de potasio 5M para colocarlo en hielo por 30 minutos más.
07. Se centrifugó a 12 000 g y se separo el sobrenadante en un tubo eppendorf esterilizado.
08. Se Agregó 500µL de cloroformo para separar el sobrenadante

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

09. Se adicionó 600 μ L de etanol absoluto, se mezcló y se incubó a -20°C por 10 minutos.
10. Se centrifugó a 12 000 g
11. El sobrenadante se tiró y se seco un poco
12. La pastilla obtenida se lavó con 200 μ L etanol al 70%
13. Se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm
14. Se tiró el sobrenadante cuidando la pasilla
15. Se secó a temperatura ambiente 65°C
16. Se resuspendió en 20 μ L de agua ultrapura esterilizada.

APÉNDICE III

En el siguiente apartado se muestran las fotografías de las electroforesis analíticas de digestiones enzimáticas generadas de RFLP de todos hongos aislados e identificados.

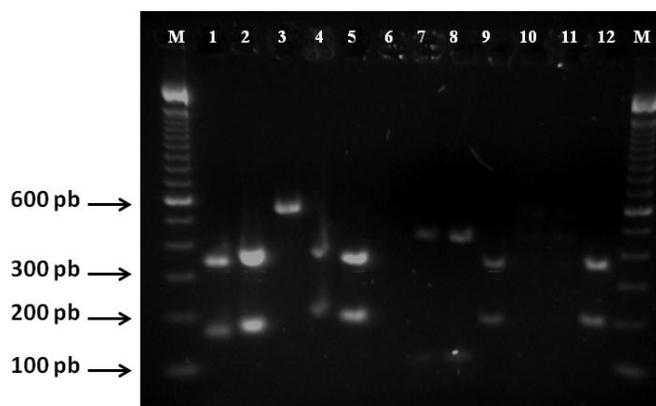


Figura A. Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción *Alu* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 1-12 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

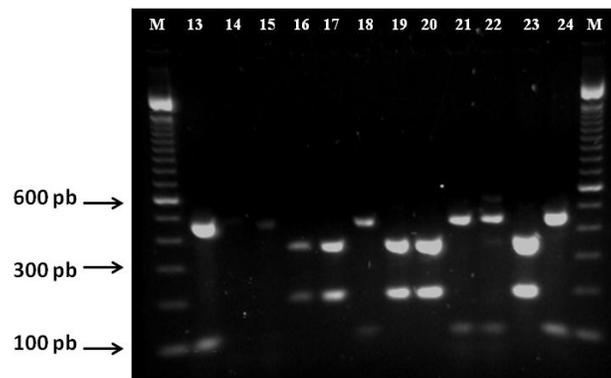


Figura B. Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción *Alu I* mediante RFLP para los aislados fúngicos 13-24 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

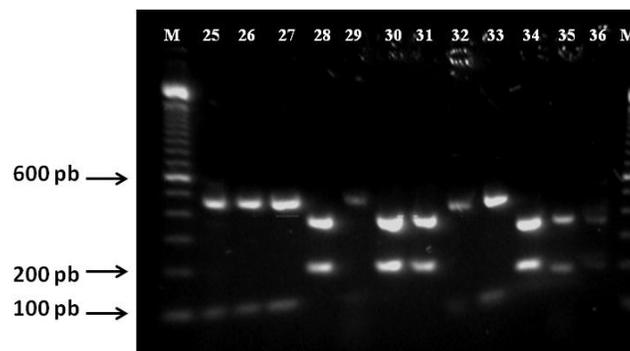


Figura C. Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción *Alu I* mediante RFLP para los aislados fúngicos 25-36 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

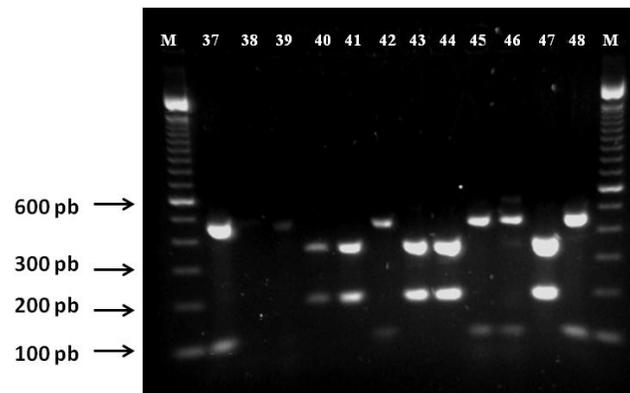


Figura D. Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción *Alu I* mediante RFLP para los aislados fúngicos 37-48 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

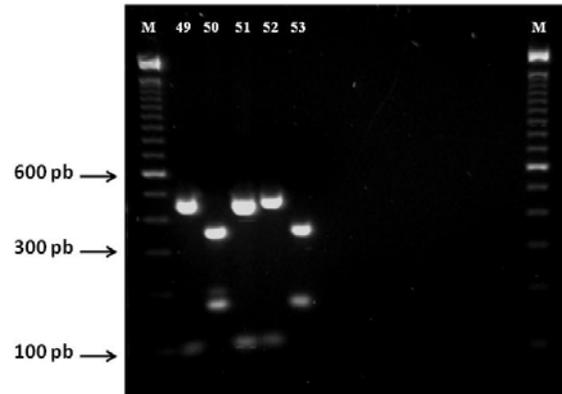


Figura E. Productos de la digestión, utilizando la enzima de restricción *Alu I* mediante RFLP para los aislados fúngicos 49-53 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

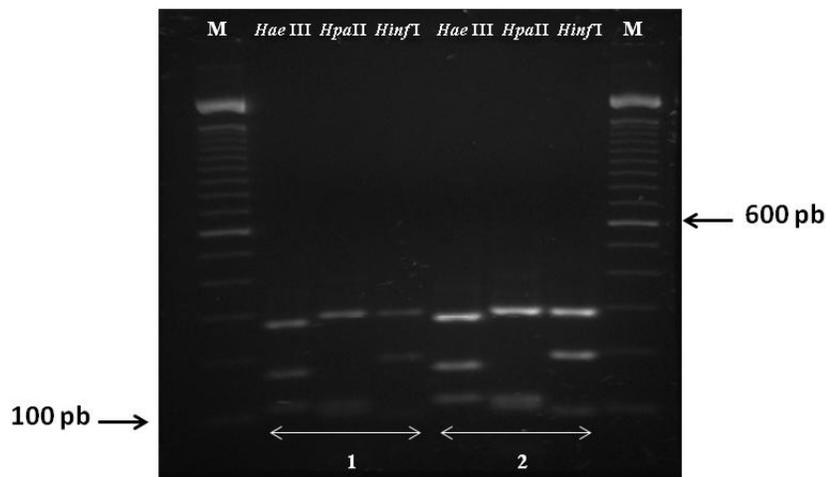


Figura F. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción *Hae III*, *Hpa II* e *Hinf I* mediante RFLP para los aislados fúngicos 1 y 2 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

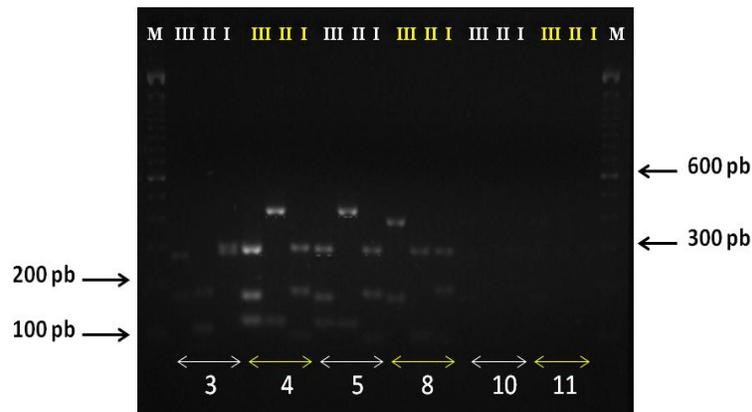


Figura G. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 3-5 y 8-11 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

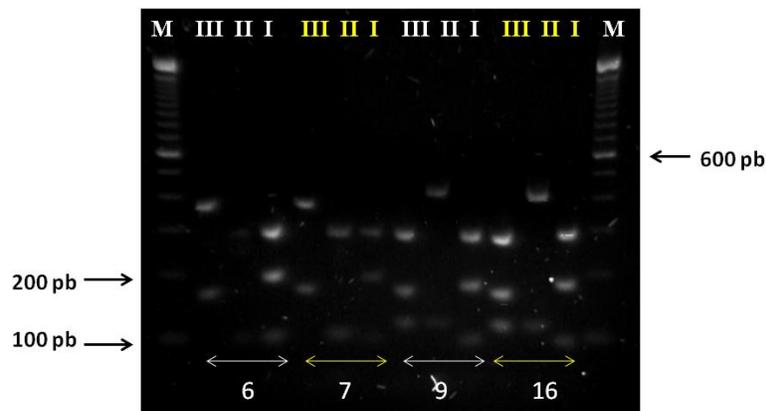


Figura H. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 6-7, 9 y 16 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

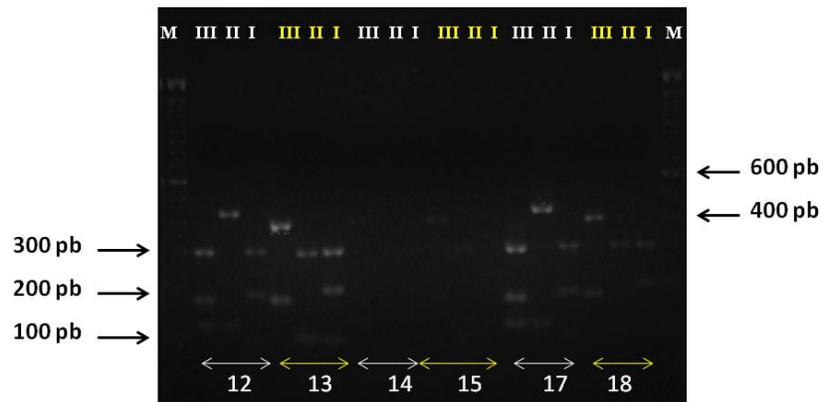


Figura I. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 12-15 y 17-18 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

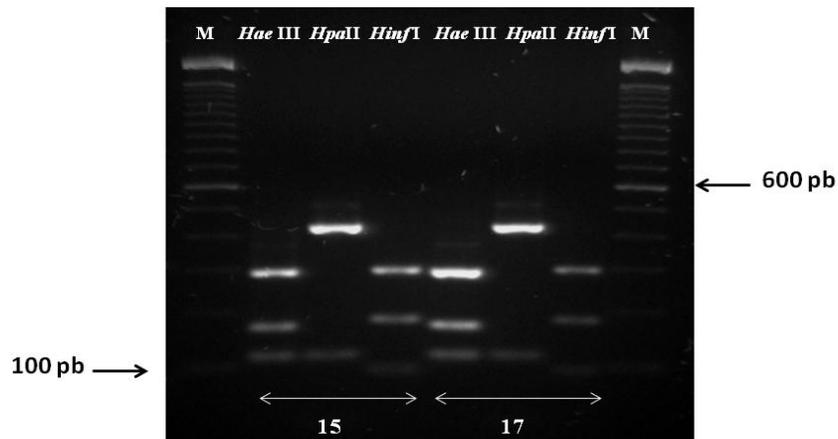


Figura J. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción *Hae* III, *Hpa* II e *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 15 y 17 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

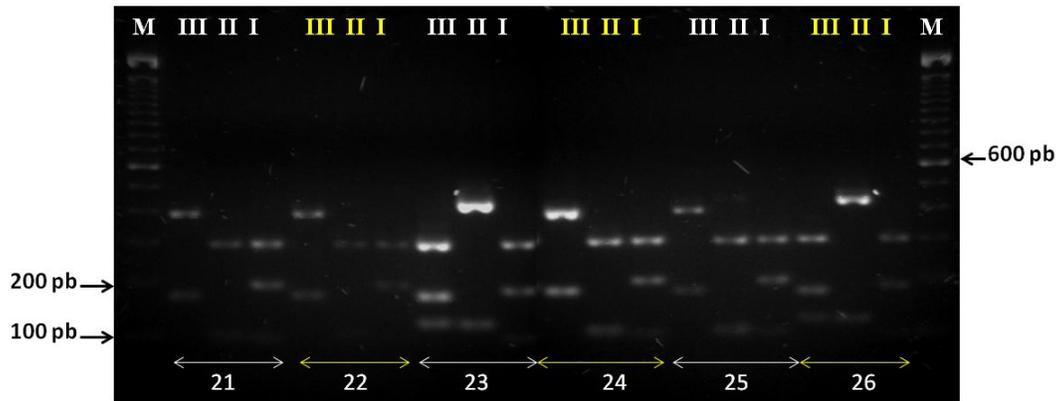


Figura K. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 21-26 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

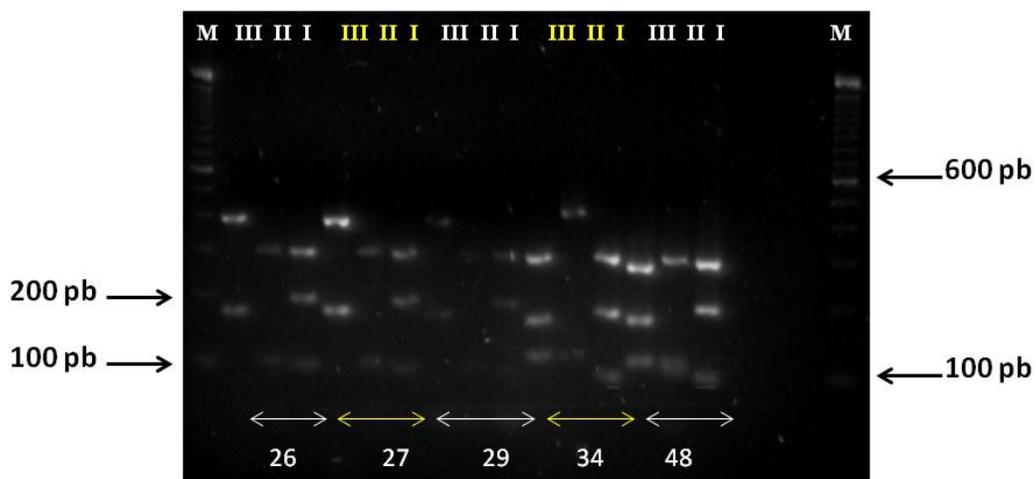


Figura L. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 26, 27, 29, 34, 48 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

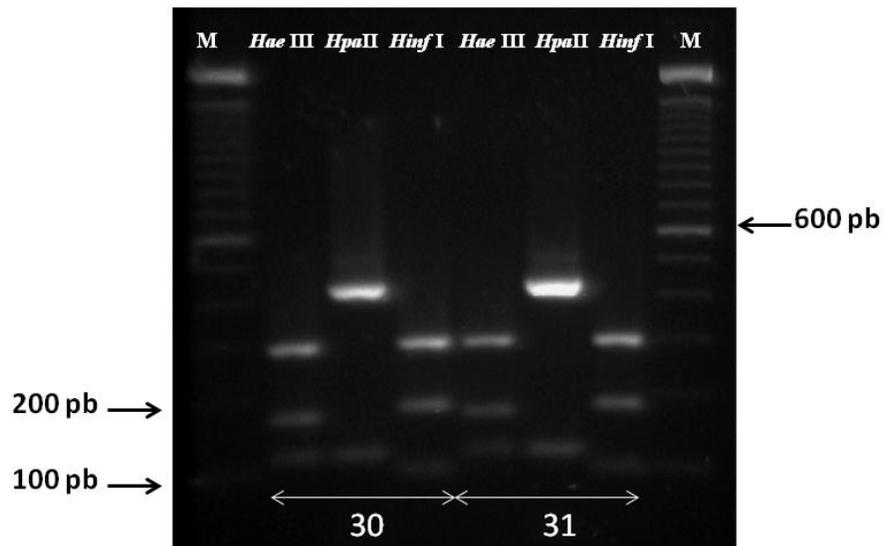


Figura M. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción *Hae* III, *Hpa* II e *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 30 y 31 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

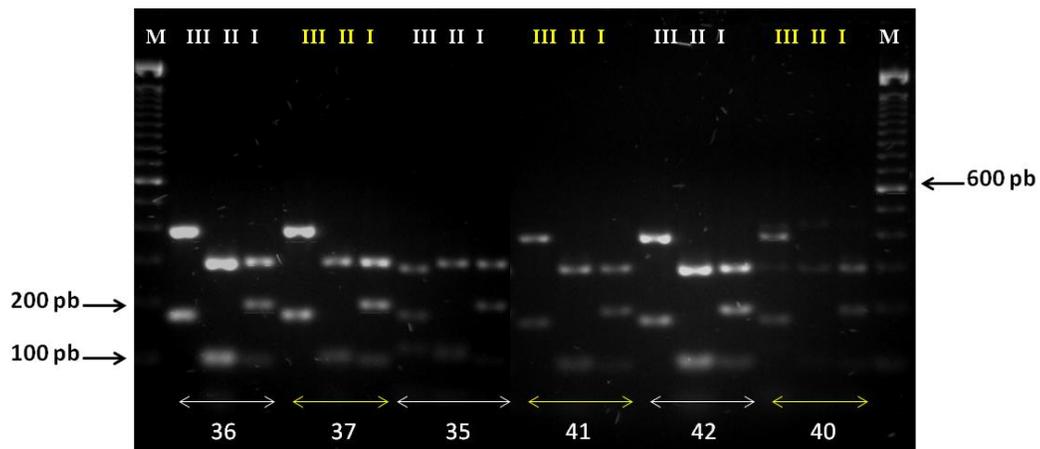


Figura N. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III=*Hae* III, II=*Hpa* II e I=*Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 35-37, 40-42 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

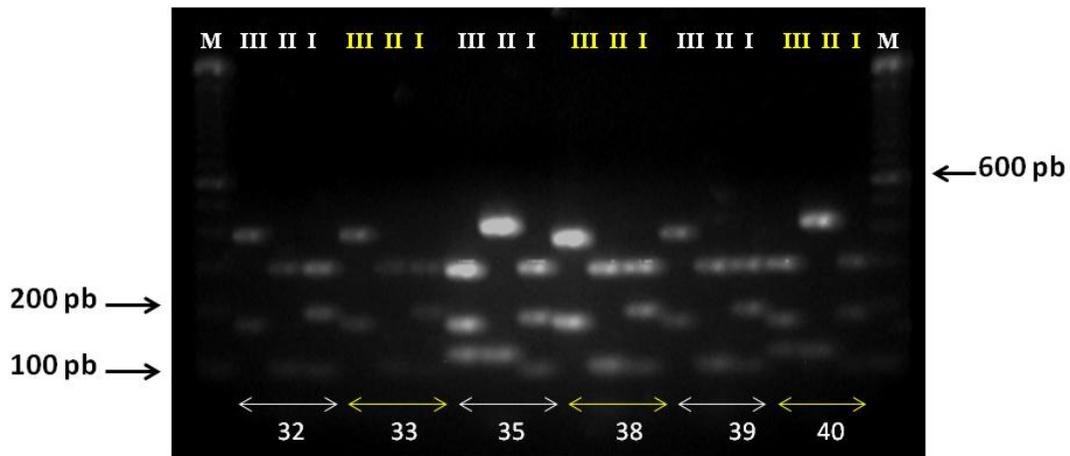


Figura O. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 32-33, 35, 38-40 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

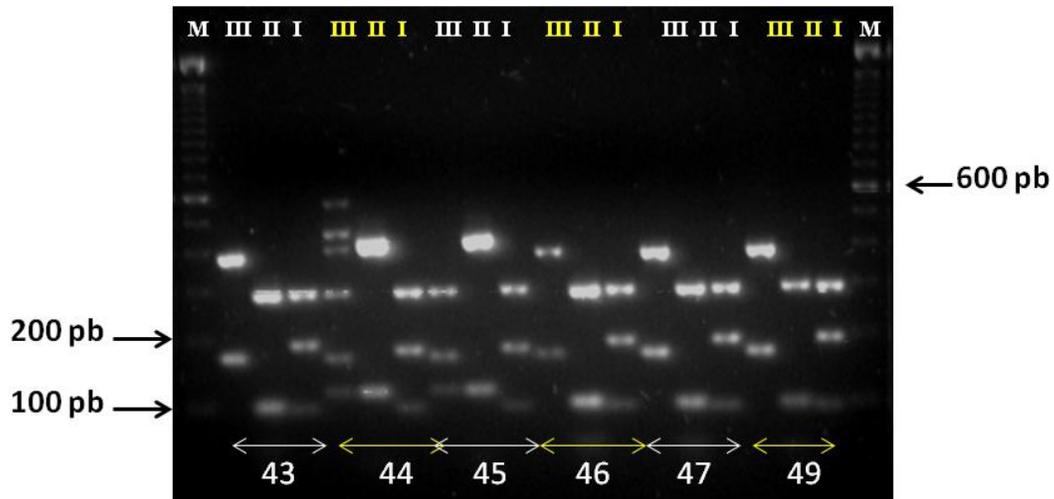


Figura P. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción III= *Hae* III, II= *Hpa* II e I= *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 43-47, 49 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya

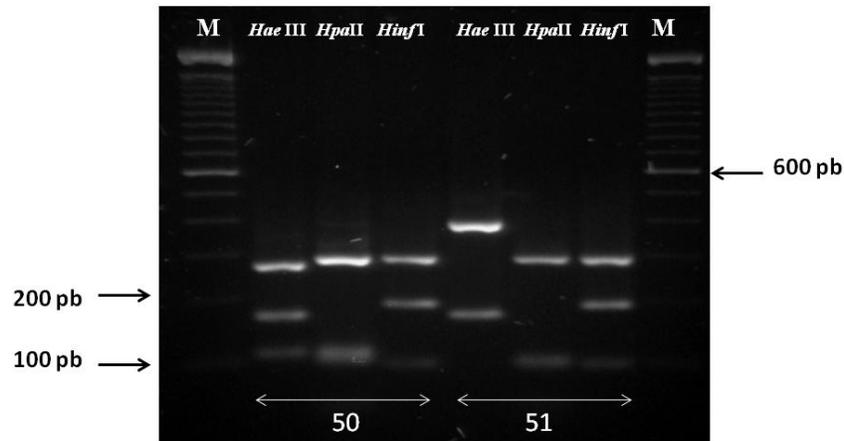


Figura Q. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción *Hae* III, *Hpa* II e *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 50 y 51 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.

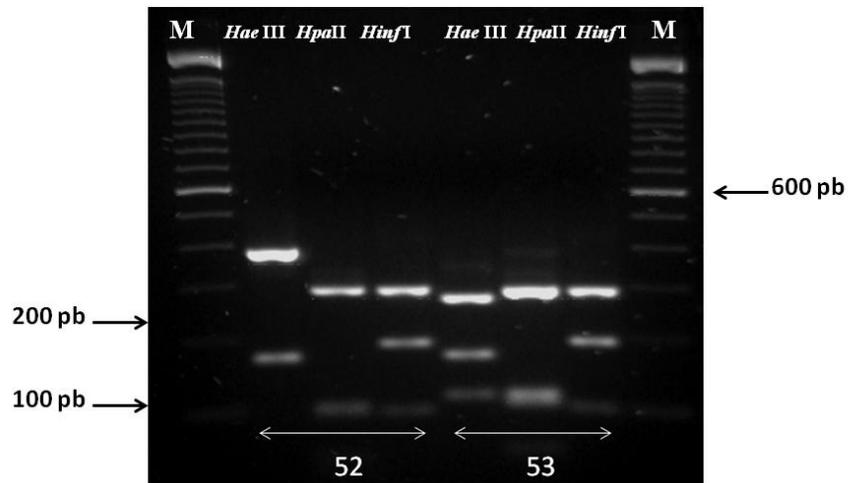


Figura R. Productos de la digestión, utilizando enzimas de restricción *Hae* III, *Hpa* II e *Hinf* I mediante RFLP para los aislados fúngicos 52 y 53 en agarosa al 3%. Marcador de 100 pb.