



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**Presentada para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

Presentada Por:

Víctor Manuel Rodríguez Romero

Ingeniero en Alimentos

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Pseudomonas fluorescens* Y SU USO EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Dirigida por:

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dra. Silvia Bautista Baños

México, D.F. agosto de 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de MÉXICO siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Junio del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Pseudomonas fluorescens* Y SU USO EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Presentada por el alumno:

RODRÍGUEZ ROMERO VÍCTOR MANUEL

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	2	0	1	3	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

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

Dr. Ramón Villanueva Arce

Dra. Ana Belem Piña Guzmán

Dr. Jorge Yáñez Fernández

Dra. Silvia Bautista Baños

Dr. Gustavo Valencia del Toro

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

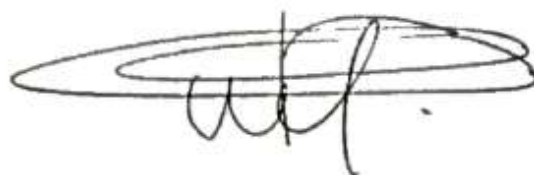
Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Victor Manuel Rodríguez Romero
Nombre y firma del alumno

Vo. Bo.

R. Villanueva
Ramon Villanueva Arce
Nombre y firma del director

Diego Bautista B.
Diego Bautista B.
Nombre y firma del Co-
director

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

Presente

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Víctor Manuel Rodríguez Romero (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "Producción de metabolitos secundarios de *Pseudomonas fluorescens* y su uso en el control de hongos fitopatógenos", en adelante "La Tesis" y de cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente "La Tesis" en el reservorio digital por un periodo de dos años a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovara automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México D.F., 30 de Junio de 2014

Atentamente



Víctor Manuel Rodríguez Romero

RESUMEN

La producción de frutas y hortalizas en México es la actividad más rentable dentro del sector agropecuario, sin embargo se ve afectada por pérdidas poscosecha causadas por hongos fitopatógenos. Para controlar a estos microorganismos, se han usado productos de origen químicos, pero la tendencia a la reducción de su uso ha motivado el interés en los microorganismos antagonistas o sus metabolitos para suprimir el desarrollo de patógenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antifúngica de los extractos libres de células y extractos crudos producidos por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* e identificar los metabolitos involucrados en proceso de biocontrol. *P. fluorescens* se cultivó en diferentes medios líquidos y para ello, se realizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial donde los factores fueron diferente medio de cultivo (KB, MG, MG+Fe) y diferente valor de pH (6.0, 7.0, 8.0) y se analizó la cantidad de biomasa por recuento de células viables, se identificó a los medios KB 6.0 y KB 7.0 como los mejores medios para acumular biomasa. Posteriormente, todos los cultivos se centrifugaron y filtraron en membranas estériles para eliminar cualquier célula remanente y se hicieron análisis *in vitro* con la técnica de difusión en agar diluyendo el extracto al 50% para probar su actividad antifúngica, identificando al medio KB 6.0 como el extracto libre de células que presentó mejor control. El extracto libre de células KB 6.0 se mezcló con acetato de etilo, se separó la fase orgánica y se concentró en rotavapor a presión reducida para obtener el extracto crudo seco, con este extracto se realizaron los ensayos *in vitro*, los cuales demostraron que son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, mostrando una relación proporcional entre la cantidad de extracto y la capacidad de biocontrol. Los extractos crudos se sometieron a una cromatografía de capa fina, que mostró la presencia de al menos cuatro compuestos, los cuales se compararon con estándares de fenazina y fluoroglucinol, las lecturas observadas indicaron que el extracto contiene al menos dos compuestos antifúngicos que pueden ser derivados de la fenazina y fluoroglucinol. Con base en los resultados *in vitro* obtenidos, los extractos de *P. fluorescens* pueden ser una alternativa para la sustitución parcial de plaguicidas de origen químico.

ABSTRACT

The production of vegetables in Mexico is the most important activity in the agricultural sector, however is affected by post-harvest losses caused by fungal phytopathogens. For the control of fungus have been used chemical products, but the trend to reduce their use has motivated interest in antagonistic microorganisms or their metabolites in order to suppressing the growth of pathogens. The aim of this study was evaluate the antifungal ability of cell-free extracts and crude extracts from *Pseudomonas fluorescens* and identify the metabolites involved in biocontrol. *P. fluorescens* was grown in different liquid media, using a completely randomized design (DCA) in factorial array, where the factors were different mediums (KB, MG, MG+Fe) and different pH (6.0, 7.0, 8.0) and the amount of biomass was analyzed by counting viable cells; the KB6.0 and KB7.0 mediums were identified as the best mediums to accumulate biomass. After, all cultures were centrifuged and sterile filtered to remove any remnant cell and *in vitro* analyzes were performed with the agar diffusion technique diluting the extract 50 % to test their antifungal activity, identifying free extract cells KB 6.0 as better control. After, the free extract cells 6.0 KB was mixed with ethyl acetate, the organic phase was separated and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure to obtain dry crude extract. *In vitro* tests with the dry extract, it was found that are capable of inhibiting the growth of phytopathogenic fungi, showing a proportional relationship between the amount of dried extract and biocontrol capability. The dry extract was subjected to thin layer chromatography and showed the presence of at least four compounds, which were compared with phenazine and phloroglucinol standard, observed that the extract contains two antifungal compounds that can be derived phenazine and phloroglucinol. Based on the results obtained in vitro test, extracts of *Pseudomonas fluorescens* may be an alternative for the partial replacement of chemical pesticides.

CONTENIDO

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> Y SU USO EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS	i
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE CUADROS	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Producción agrícola en México.....	12
1.2. Importancia del manejo poscosecha.....	13
1.3. Principales microorganismos fitopatógenos.....	14
1.3.1. <i>Fusarium</i>	15
1.3.2 <i>Botrytis</i>	16
1.3.3. <i>Colletotrichum</i>	17
1.4. Control biológico vs control químico de enfermedades poscosecha.....	18
1.4.1. Competencia.....	18
1.4.2. Producción de enzimas líticas	19
1.4.3. Inducción de resistencia sistémica (ISR).....	19
1.4.4. Antibiosis	20
1.8. Uso de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el control de enfermedades poscosecha	20
1.9. Control de enfermedades poscosecha con extractos bacterianos	21
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. OBJETIVOS	24
3.1. General	24
3.2. Específicos	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1. Obtención de hongos fitopatógenos	26
4.2 Aislamiento, caracterización e identificación del agente de control biológico	26
4.2.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco.....	26
4.2.2. Prueba de pudrición en papa	27
4.2.3. Identificación bioquímica.....	27

4.2.4. Identificación genérica de la bacteria.....	27
4.2.5. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> vs hongos fitopatógenos.....	28
4.3. Condiciones de cultivo y evaluación de producción de biomasa de <i>P. fluorescens</i>	29
4.4. Pruebas de control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con extractos libres de células.....	30
4.5. Extracción y pruebas de control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con el extracto crudo seco de mayor efectividad.....	31
4.5. Separación e identificación de los metabolitos producidos por <i>P. fluorescens</i>	32
4.6. Análisis estadístico.....	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1. Aislamiento, caracterización e identificación del material biológico	34
5.1.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco.....	34
5.1.2. Prueba de pudrición en papa	35
5.1.3. Identificación bioquímica.....	35
5.1.4. Identificación genérica de la bacteria.....	36
5.2. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>P. fluorescens</i> vs hongos fitopatógenos.....	37
5.3. Condiciones de cultivo y producción de biomasa de <i>P. fluorescens</i>	38
5.4. Pruebas de control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con extractos libres de células.....	40
5.5. Extracción y pruebas de control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con extracto crudo seco de <i>P. fluorescens</i>	52
5.6. Separación e identificación de los metabolitos producidos por <i>P. fluorescens</i>	55
VI. CONCLUSIONES.....	57
VII. REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Ciclo de la marchitez del tomate causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (Agrios, 1998)	15
Fig. 2 Desarrollo de la enfermedad causada por el moho gris <i>Botrytis cinerea</i> (Agrios, 1998).....	16
Fig. 3. Ciclo de la antracnosis causada por <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Colletotrichum</i> o <i>Gloeosporium</i> sp. (Agrios, 1998).....	17
Fig. 4 Diagrama general de la metodología dividida en cinco etapas principales.....	25
Fig. 5. Secuencia de identificación genérica de bacterias (Schaad, 1988)	28
Fig. 6. Respuesta de hipersensibilidad en hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) infiltradas con una suspensión de <i>P. fluorescens</i> , El testigo se muestra a la izquierda de la hoja y a la derecha la zona infiltrada con la suspensión bacteriana. Al día de la inoculación (A), 24 y 48 h después de la inoculación (B y C, respectivamente).....	34
Fig. 7. Pudrición negativa de rodajas de papa 48 h después de la inoculación (A y B) de <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Testigo negativo (C) y positivo (D) 48 h después de la inoculación por <i>P. viridiflava</i> (C y D Tomado de Macagnan <i>et al.</i> , 2006).	35
Fig. 8. Resultados de las pruebas realizadas a <i>P. fluorescens</i> propuestas por Schaad (1988). Bacteria Gram negativa (A), colonias cremosas en medio YDC (B), con producción de pigmento amarillo en agar King B (C) y fluorescencia bajo luz UV (D).	36
Fig. 9. Efecto de <i>P. fluorescens</i> en cultivos duales contra los hongos <i>Colletotrichum fragariae</i> (A), <i>Botrytis cinerea</i> (B) y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (C).....	38
Fig. 10. Efecto de extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (50% v/v) sobre el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG).	43
Fig. 11. Dinámica del crecimiento de <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (50% v/v).	44
Fig. 12. Dinámica del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> (BC) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (50% v/v).	44
Fig. 13. Dinámica del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (50% v/v).	45

Fig. 14. Diámetro (mm) de las colonias de <i>Botrytis cinerea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) en medio KB, pH 6.0 con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> a diferentes diluciones	47
Fig. 15. Dinámica del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (10-50% v/v).....	48
Fig. 16. Dinámica del crecimiento de <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (10-50% v/v).....	48
Fig. 17. Dinámica del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> (BC) <i>in vitro</i> con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (10-50% v/v).	49
Fig. 18. Efecto del pH sobre el color de las colonias (vista inferior de las placas de cultivo) de <i>Botrytis cinérea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) en medio PDA.....	50
Fig. 19. Efecto del medio de cultivo (KB, MG, MG+Fe y pH 6.0, 7.0 y 8.0) (adicionado con extracto libre de células (50% v/v) de sobre la coloración de las colonias de <i>Botrytis cinerea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF), y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) (vista anterior).....	51
Fig. 20 Efecto del medio de cultivo (KB, MG, MG+Fe y pH 6.0, 7.0 y 8.0) (adicionado con extracto libre de células (50% v/v) de sobre la coloración de las colonias de <i>Botrytis cinerea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF), y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) (vista posterior).....	51
Fig. 21. Efecto del extracto seco de <i>P. fluorescens</i> a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL ⁻¹) sobre el crecimiento de las colonias de <i>Botrytis cinerea</i> (BC), <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF), y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG).	52
Fig. 22. Dinámica del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> (BC) con extractos secos de <i>P. fluorescens</i> a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL ⁻¹).	53
Fig. 23. Dinámica del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (FOG) con extractos secos de <i>P. fluorescens</i> a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL ⁻¹).....	53
Fig. 24. Dinámica del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum fragariae</i> (CF) con extractos secos de <i>P. fluorescens</i> a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL ⁻¹).....	54
Fig. 25. Perfiles en cromatografía en capa fina (TLC) del extracto crudos seco (50 mL) de <i>P. fluorescens</i> y estándares de fluoroglucinol y fenazina (50 mL de 0.5 mg mL ⁻¹). en un sistema de solventes hexano:acetona (3:2). La detección de los compuestos fue en UV.	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales productos agrícolas de México clasificados por volumen de producción anual (millones de toneladas).	12
Cuadro 2. Arreglo de tratamientos para la producción de biomasa de <i>P. fluorescens</i> en un DCA en arreglo factorial.	29
Cuadro 3. Arreglo de tratamientos del control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con extractos libres de células de <i>P. fluorescens</i>	30
Cuadro 4. Arreglo de tratamientos del control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con el extracto de <i>P. fluorescens</i> de mayor efecto inhibitorio sobre su crecimiento.	31
Cuadro 5. Arreglo de tratamientos del control <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos con los extractos crudos secos de <i>P. fluorescens</i>	32
Cuadro 6. Características bioquímicas de <i>P. fluorescens</i>	37
Cuadro 7. Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> contra hongos fitopatógenos en cultivo dual.	38
Cuadro 8. Producción de biomasa de <i>P. fluorescens</i> en medios de cultivo líquido y pH diferentes.	39
Cuadro 9. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> (50%).	40
Cuadro 10. Correlación entre número de células de <i>P. fluorescens</i> y control del crecimiento colonial de hongos fitopatógenos en medios de cultivo y pH distinto.	41
Cuadro 11. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> a diferentes diluciones.	46
Cuadro 12. Porcentaje de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos en medio KB, pH 6.0 con extractos libre de células de <i>P. fluorescens</i> a diferentes diluciones.	47
Cuadro 13. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos crudos y secos de <i>P. fluorescens</i> a diferentes concentraciones.	52
Cuadro 14. Factores de retención (Rf) de extractos de <i>P. fluorescens</i> contra compuestos estándar.	55

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción agrícola en México

Desde el punto de vista de la economía total en el país, la agricultura es un sector relativamente pequeño; en 2009 representaba cerca de 4% del PIB. Sin embargo, en términos de empleo es más importante de lo que aparenta, ya que proporciona empleo a alrededor de 13% de la fuerza de trabajo, lo que representa unos 3.3 millones de agricultores directos y 4.6 millones de trabajadores asalariados y familiares no remunerados (OCDE, 2011). La producción agrícola es el principal componente del conjunto de las actividades agropecuarias en México, donde la producción de frutas y hortalizas ha significado una de las actividades más rentables y más importantes en términos de las exportaciones totales del sector, ya que contribuyen con 24% de las mismas (Mestiza y Escalante, 2003; Escalante y Catalán, 2008). En términos de importancia a nivel global, nuestro país ocupa un lugar importante en la producción mundial de algunas frutas y hortalizas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales productos agrícolas de México clasificados por volumen de producción anual (millones de toneladas).

Producto	Producción (MT)	Ranking mundial
Fresa	360.426	2 °
Aguacate	1316.104	1 °
Mangos	42139.837	7 °
Uvas	67067.129	*
Manzanas	76378.738	*
Plátanos	101992.743	10 °
Jitomate	161793.834	10 °
Papas	364808.768	*
Maíz	872066.77	8 °
Caña de azúcar	1832541.19	6 °

* Por arriba de la posición 20.

Fuente: FAO (2012)

1.2. Importancia del manejo poscosecha

El objetivo de la aplicación de técnicas poscosecha es mantener la calidad de los productos hortofrutícolas (apariencia, textura, sabor, valor nutritivo y sanitario) y reducir las pérdidas entre la cosecha y el consumo (Kitinoja y Kader, 1996).

Las causas de las pérdidas poscosecha de los productos agrícolas son muy diversas, entre ellas figuran los factores ambientales, de manejo y los relacionados a los agentes biológicos. Estudios en México durante una década (2000-2010), han permitido identificar que las mayores pérdidas poscosecha oscilan entre 20 y 40% para las regiones tropicales, mientras que en zonas templadas las pérdidas alcanzan valores entre 10 y 20%, en contraste con las regiones secas donde alcanza el 10% (García *et al.*, 2010). En lo que se refiere al manejo de los productos en poscosecha, se ha observado que la recolección en un momento inadecuado del proceso de maduración, una exposición excesiva a la lluvia, la sequía o las temperaturas extremas también ocasiona pérdidas (FAO, 2009). Con respecto a los agentes biológicos, se conoce que los microorganismos (hongos y bacterias, principalmente), ocasionan pérdidas estimadas de hasta el 15% en países desarrollados y pueden ser mayores al 50% en los países en vías de desarrollo (Kitinoja y Kader, 1996).

Con relación a lo anterior, se sabe que la mezcla de los factores que ocasionan las pérdidas, genera una sinergia que afecta negativamente a los productos hortofrutícolas, ya que las temperaturas altas o bajas pueden alterar la fisiología del producto, aumentando su susceptibilidad a ciertos patógenos (Sommer *et al.*, 2002); así como un mal manejo puede ocasionar daños físicos, que con la presencia de microorganismos fitopatógenos, representan uno de los principales problemas poscosecha (FAO, 2009) y cierran el triángulo de la enfermedad: hospedero–medio ambiente–patógeno (Sommer *et al.*, 2002).

1.3. Principales microorganismos fitopatógenos

De los diferentes microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser hongos, virus, bacterias, nematodos, fitoplasmas y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasionan, ya que representan el 60% del total de organismos causantes de enfermedades (Rodríguez, 2001).

Se sabe que más de 8 000 especies de hongos pueden causar enfermedades en plantas y sus frutos (Rodríguez, 2001). Los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor*, son conocidos como los principales microorganismos causantes de alteraciones en frutas y hortalizas, especialmente, las referidas al aspecto físico, valor nutricional, características organolépticas y dificultad de conservación, así como de las alergias e intoxicaciones en los consumidores (Filtenborg *et al.*, 1996), debido a que los hongos producen estructuras especializadas que se depositan sobre el producto hortofrutícola, estas penetran, invaden, colonizan el tejido para causar daño y finalmente segregan sustancias como consecuencia de su metabolismo secundario (Trigos *et al.*, 2008), por ejemplo las micotoxinas, entre las que pueden estar las aflatoxinas, ácido ciclopiazónico, ácido tenuazónico, los tricotecenos, zearalenona, fumonisinas B1 y B2, patulina, ocratoxina A, diplodiatoxin y diplosporin (Jelinek *et al.*, 1989; Blunden *et al.*, 1991)

Trigos *et al.* (2008) aislaron 27 especies fúngicas de frutas y hortalizas procedentes de establecimientos comerciales y observaron que el 51.8 % de ellas, mostraron la capacidad de sintetizar diferentes micotoxinas perjudiciales para la salud del hombre, donde los géneros *Fusarium*, *Botrytis* y *Colletotrichum* representan un riesgo cuando infestan, en precosecha y poscosecha, frutas y hortalizas debido a la amplia gama de metabolitos que producen. Algunas características de éstos géneros se presentan a continuación.

1.3.1. *Fusarium*

Dentro de las enfermedades causadas por patógenos destacan las producidas por el género *Fusarium*, el cual se encuentra naturalmente en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a las pudriciones de raíz y tallos de muchas plantas (Hernández *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2010). Algunos fusarios son patógenos de los cereales y pueden formar micotoxinas en los granos aún antes de la cosecha, otros pueden crecer en el refrigerador y aquellos con capacidad competitiva contribuyen a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de los fusarios en el suelo durante uno a varios años se debe, principalmente a la presencia de estructuras de resistencia o reposo llamadas clamidosporas (Carrillo, 2003). El control de este patógeno puede ser de diversas formas (cultural, biológico, químico, etc.) y para lograr una mayor efectividad, se debe conocer el ciclo de la enfermedad en cada uno de los hospedantes (Fig. 1).

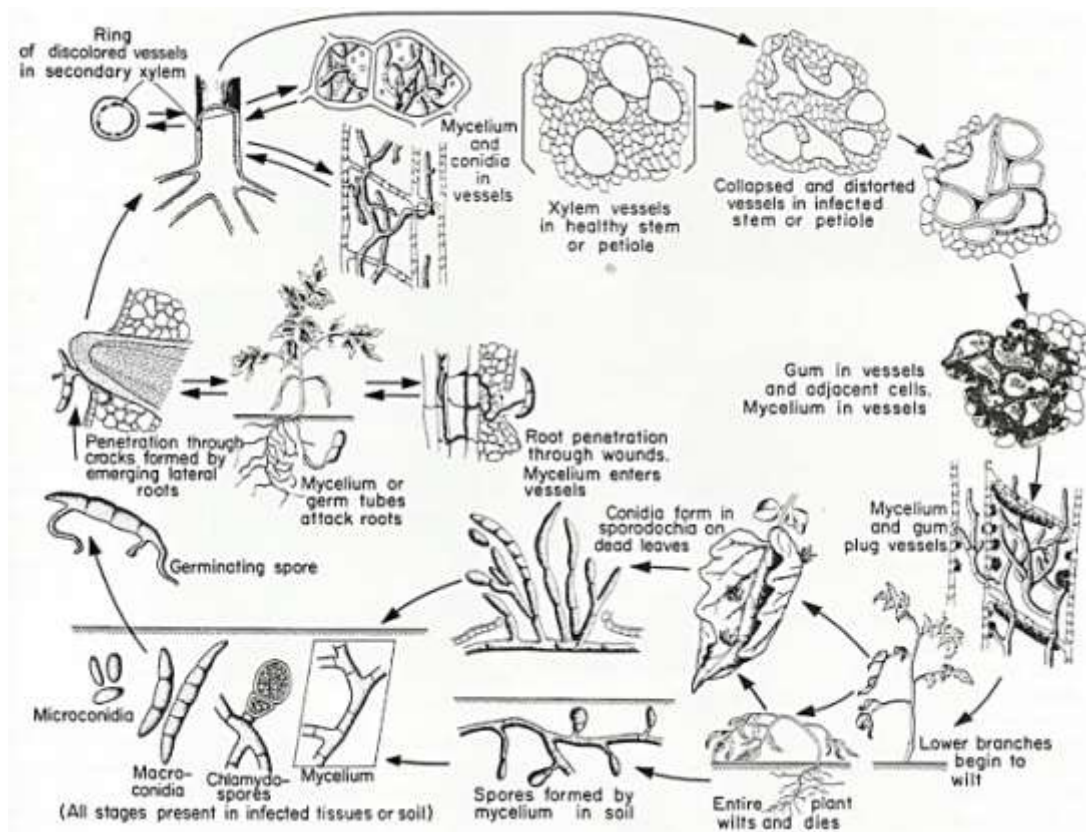


Fig. 1 Ciclo de la marchitez del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Agris, 1998)

1.3.2 *Botrytis*

Botrytis spp. es un patógeno ampliamente extendido que causa graves pérdidas en muchas frutas, vegetales y plantas ornamentales, ya que es capaz de infectar las hojas, tallos, flores y frutos, convirtiéndolo en uno de los patógenos más importantes de los cultivos hortícolas en muchos países (Elad y Shtienberg, 1995). La infección se origina con la germinación de las conidias, los cuales desarrollan un tubo germinativo, desde el cual se producen hifas de penetración capaces de infectar tejidos sanos, ya sea a través de heridas o aberturas naturales (Latorre *et al.*, 2002) (Fig. 2). *Botrytis cinerea* se encuentra distribuido en todo el mundo y afecta principalmente a regiones con climas templados y fríos, es muy común en la superficie de las hojas de un amplio número de plantas, causando pudrición de hojas, flores y frutos. Los frutos de importancia comercial mayormente dañados son uvas, fresas, coles, lechuga, etc. (Domsch *et al.*, 1980).

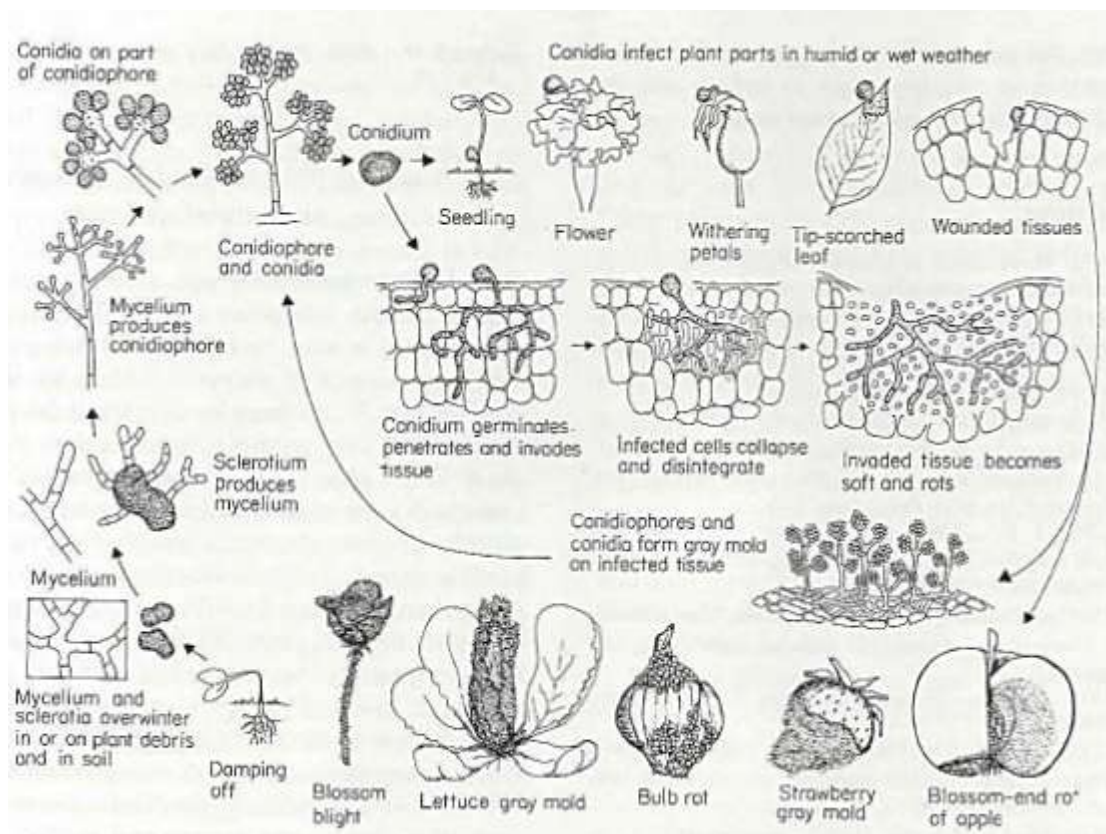


Fig. 2 Desarrollo de la enfermedad causada por el moho gris *Botrytis cinerea* (Agrios, 1998).

1.3.3. *Colletotrichum*

Entre los hongos patógenos más devastadores de los productos vegetales en poscosecha se encuentran diversas especies de *Colletotrichum*, capaces de infectar un gran número de cultivos, incluyendo mango, papaya, cítricos, guanábana, aguacate, café y otros cultivos de importancia económica (Mendoza *et al.*, 2007). La aparición de las enfermedades relacionadas con este hongo en los cultivos tiende a ser esporádica y está relacionada directamente con las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo de la enfermedad y los altos niveles de inóculo (Lubbe *et al.*, 2004). A diferencia de otros géneros, como *Botrytis* y *Fusarium*, donde el mecanismo de infección es a través de heridas o aberturas naturales, *Colletotrichum* es capaz de penetrar células intactas debido a que posee un mecanismo de infección por la vía de unas estructuras llamadas apresorios (Fig. 3).

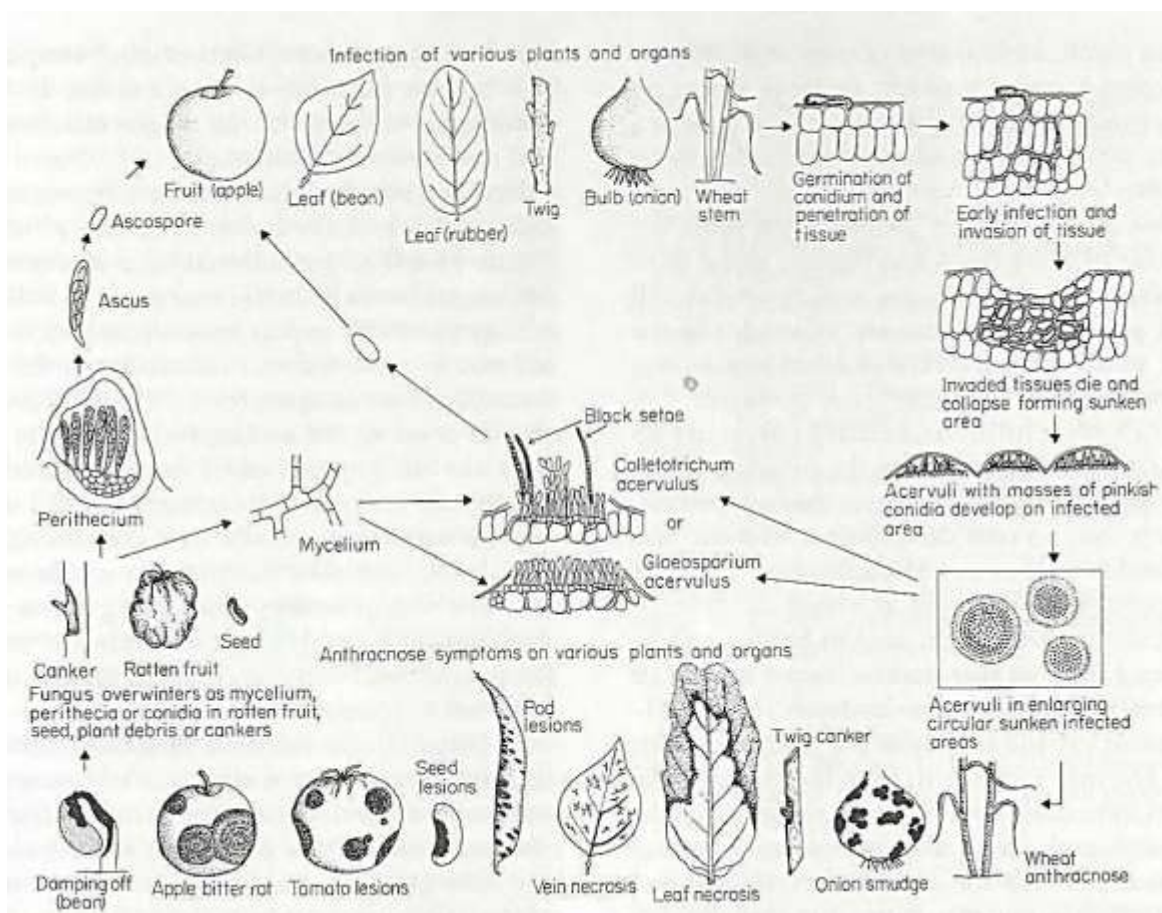


Fig. 3. Ciclo de la antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum* o *Gloeosporium* sp. (Agrios, 1998).

1.4. Control biológico vs control químico de enfermedades poscosecha.

El uso de productos químicos para control de enfermedades poscosecha, en general está basado en la modificación del medio ambiente de la superficie de la fruta, ya sea mediante la remoción del inóculo como una práctica de desinfección o mediante la inhibición del crecimiento y la reproducción de los organismos fitopatógenos (James *et al.*, 2008). El problema con los productos químicos es que a menudo son nocivos para la salud de los consumidores, ya sea porque no se cumplen los plazos adecuados antes de la salida al mercado, porque los productores no los utilizan en las dosis correctas. Además, estos productos resultan costosos y suponen un peso en los ingresos de los productores (FAO, 2000).

El uso de tratamientos de origen químico, puede sustituirse con técnicas de control biológico; en sentido estricto, el término control biológico se refiere al uso de microorganismos antagonistas que suprimen el desarrollo de patógenos específicos (Pal y McSpadden, 2006). Más recientemente, de acuerdo con Serrano y Galindo (2007) el biocontrol o control biológico se define como el uso de organismos (de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. Las características que debe tener un microorganismo antagonista para su uso poscosecha son las siguientes: 1) estabilidad genética, 2) efectivo a bajas concentraciones, 3) no ser exigente en cuanto a requerimientos de nutrientes, 4) capacidad para sobrevivir a diferentes condiciones ambientales, 5) no producir sustancias que afecten la salud humana, 6) ser resistente a los pesticidas, 7) eficaz contra una amplia gama de patógenos en gran variedad de frutas y vegetales (Wisniewski y Wilson, 1992).

El control biológico es el resultado de muchos tipos diferentes de interacciones entre los microorganismos, el medio ambiente y el patógeno a controlar. Los modos de acción más importantes son los siguientes.

1.4.1. Competencia

En este mecanismo, el biocontrol ocurre cuando los microorganismos no patógenos compiten con los patógenos por los nutrientes alrededor de la planta huésped (Pal y

McSpadden, 2006), en este caso, el microorganismo de biocontrol posee un mejor mecanismo de absorción de nutrientes o enzimas extracelulares más activas, de forma que obtiene más nutrientes mientras que el fitopatógeno no obtiene nutrientes suficientes para crecer. La competencia también puede ser por el espacio, donde el agente de biocontrol presentan una agresiva colonización de la rizósfera y desplaza así a otras bacterias y hongos perjudiciales para la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Se ha demostrado que el mecanismo de competencia también es posible para otros requerimientos diferentes a las fuentes carbono, tales como oxígeno, hierro y en el caso de autótrofos, por la luz (Moretti *et al.*, 2008). Por ejemplo, para que los microorganismos puedan disponer del hierro, estos quelan la mayor parte del Fe^{+3} presente en el suelo, disminuyendo su disponibilidad para los microorganismos patógenos (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Sarabia *et al.*, 2010).

1.4.2. Producción de enzimas líticas

Entre los mecanismos de acción, se encuentra el generado por las enzimas que degradan las paredes celulares de los hongos, enzimas quitinolíticas, junto con glucanasas o celulasas, son las enzimas consideradas para el control biológico (Harman *et al.*, 1993). Las enzimas líticas pueden descomponer compuestos poliméricos, incluyendo quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y ADN (Asghar y Pessaraki, 2010). Actualmente, no está claro qué cantidad de la actividad de la enzima lítica detectada en el entorno natural representa una respuesta específica a las interacciones entre microorganismos. Es más probable que la actividad de las enzimas sea en gran medida por la necesidad de degradar polímeros complejos a fin de obtener la nutrición de carbono (Pal y McSpadden, 2006).

1.4.3. Inducción de resistencia sistémica (ISR)

Las plantas responden activamente a una variedad de estímulos ambientales, incluyendo gravedad, luz, temperatura, estrés físico, agua y disponibilidad de nutrientes, pero también responden a una variedad de estímulos químicos producidos por el suelo y las plantas asociadas a los microorganismos (Pal y McSpadden, 2006). La ISR se asocia con un aumento en la sensibilidad de hormonas y posteriormente una activación de un conjunto de

genes de defensa lo que induce las defensas de las plantas huésped, aumentando la resistencia contra la subsiguiente infección por una variedad de patógenos (Compant *et al.*, 2005). Aunque se desconoce el mecanismo de ISR, se ha encontrado que el ácido salicílico induce la síntesis de proteínas causantes de una hipersensibilidad y patogenicidad (HRp), estas proteínas denominadas harpinas participan en la inducción de resistencia (Hammerschmidt, 1999).

1.4.4. Antibiosis

Los antibióticos son el mecanismo más estudiado de antagonismo entre microorganismos, aunque estos se producen industrialmente en medios ricos, en la mayoría de los hábitats asociados a las plantas son medios pobres en fuentes de carbono y en estas condiciones la producción de antibióticos se ve influenciada por diversos factores (Rubio y Fereres, 2005). Varios microorganismos producen y secretan uno o más componentes con actividad antibiótica, estos componentes son tóxicos y de esta manera manifiestan un control efectivo contra organismos patógenos, suprimiendo su desarrollo en condiciones *in vitro* y/o *in situ*. La capacidad de producción de varios antibióticos resulta en la supresión de diversos patógenos en plantas (Asghar y Pessarakli, 2010).

1.8. Uso de *Pseudomonas fluorescens* en el control de enfermedades poscosecha

Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, bacilos rectos o ligeramente curvados, sin esporas, siempre móviles por flagelos polares; ubicuas en los suelos agrícolas y se adaptan bien al cultivo en la rizosfera (Weller, 2007). Una de las características que más llama la atención de las *Pseudomonas*, es la amplia gama de compuestos que puede utilizar como fuentes de carbono, como ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos, alcoholes, polialcoholes, glicoles, compuestos aromáticos, aminoácidos; algunas especies utilizan más de 100 compuestos para sus requerimientos energéticos (Madigan *et al.*, 2003).

De los diversos tipos de *Pseudomonas*, las fluorescentes están valoradas como microorganismos que ofrecen resultados satisfactorios para el control de hongos fitopatógenos por las propiedades que presentan como colonización de los órganos de la planta y la rizósfera, utilización de un gran número de sustratos orgánicos comúnmente

encontrados en los exudados de las raíces, producción de una gran variedad de metabolitos, crecimiento rápido y compatibilidad con plaguicidas (Villa *et al.*, 2009). Entre los metabolitos más importantes para el biocontrol se encuentran los sideróforos y los antibióticos (Aguado *et al.*, 2012). El uso de las pseudomonas en agricultura y productos poscosecha ofrece una manera atractiva de sustituir los fertilizantes, pesticidas y suplementos químicos (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009).

Villa *et al.* (2009) demostraron que varias cepas de *P. fluorescens* presentan efectos antagónicos frente al hongo *Sclerotium rolfsii*, al producir inhibición del crecimiento micelial entre el 60-90%, por la excreción de los sideróforos y metabolitos anti fúngicos. Otros estudios demostraron que las cepas de *P. fluorescens* fueron eficientes para el control de *F. oxysporum* en plantas de chícharo en condiciones de invernadero, disminuyendo la incidencia de la enfermedad en un 90.3% con relación al testigo sin presencia de la bacteria (Guerra *et al.*, 2011).

Sin embargo no siempre se ha observado consistencia al extrapolar los resultados de laboratorio en condiciones *in situ*, ya que la eficiencia en el efecto de control depende del momento en que se aplique el inóculo, pues en la mayoría de los casos, si la aplicación de los microorganismos antagonistas hacia hongos fitopatógenos se realiza previamente o al mismo tiempo, los resultados son positivos, pero este efecto no se mantiene si el patógeno se inocula antes que la bacteria de control (Hernández *et al.*, 2007), existe la posibilidad transferencia de resistencia a los antibióticos a otras bacterias (Courvalin, 1994) y otra limitación para el uso directo de células viables, es la de grandes lotes para su uso continuo (Sabaratnam y Traquair, 2002).

1.9. Control de enfermedades poscosecha con extractos bacterianos

El uso de extractos producidos por *Pseudomonas* spp. representa una alternativa interesante para abordar las limitaciones de uso directo biomasa celular, debido a los numerosos metabolitos extracelulares que se producen durante el cultivo bacteriano y que inducen una respuesta de defensa o que producen una acción antifúngica (Oyoque *et al.*, 2011).

En la naturaleza, estos metabolitos extracelulares se producen en presencia o ausencia de diversos nutrientes o bajo la influencia de ciertas condiciones ambientales, factores como la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, hierro presente en el medio de cultivo o valores del pH son algunos de los más importantes en la producción de compuestos que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (Alström, 1987) y pueden modificarse para optimizar la producción de metabolitos con amplio espectro o mejor efecto anti fúngico.

En este sentido, Battu y Reddy (2009) cultivaron *Pseudomonas fluorescens* en medios con glucosa como fuente de carbono, posterior al cultivo, utilizaron extractos crudos secos obtenidos con acetato de etilo, logrando inhibir hasta un 89 y 90 % a los hongos fitopatógenos *Pyricularia. oryzae* y *Rhizotonia solani* respectivamente en ensayos *in vitro*, el análisis de los extractos confirmó que esta fuente de carbono inducen la producción de metabolitos antifúngicos como el fluoroglucinol. Manikandan *et al.* (2010) estudiaron el efecto de biocontrol de un extracto total obtenido del cultivo de *P. fluorescens Pfl* en medio con glicerol como fuente de carbono, registraron una incidencia de 17.3% de daño causado por *Fusarium* en tomate en condiciones de invernadero y de 4.8% en un cultivo en campo, ambos con respecto a los testigos sin extractos, el estudio identifico la producción de fenazinas que son metabolitos claves para el biocontrol en la naturaleza y cuya producción se indujo por la presencia del glicerol. Brisbane *et al.*, (1987) demostraron que el pH del suelo modifica la efectividad de los compuestos antifúngicos, aumentando la efectividad biológica en pH inferiores de 7. Otro factor importante para el uso de extractos bacterianos es la densidad celular del cual se obtienen, Mavrodi *et al.*, (2012) identificaron que la producción de fenazina y fluoroglucinol es directamente proporcional a la densidad celular del cultivo.

II. JUSTIFICACIÓN

En México, la calidad de los productos hortofrutícolas se ve afectada por la presencia de microorganismos fitopatógenos de origen diverso, los cuales causan una disminución en su apariencia, textura, sabor, valor nutritivo, sanitario, etc. En el caso específico de los microorganismos del suelo, se ha demostrado que ciertas bacterias provenientes de la rizósfera, tienen un impacto benéfico en las plantas a través diferentes mecanismos de acción, tales como producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas o HCN, que reducen el crecimiento de los fitopatógenos (*in vitro*). Aunque el efecto de las bacterias no se observan de la misma manera en la fase *in situ* o *in vivo* en poscosecha, se tiene la ventaja de usar los extractos bacterianos o metabolitos libres de células con un efecto similar al de los microorganismos vivos, por lo tanto, este trabajo propone la producción de metabolitos secundarios de *Pseudomonas fluorescens* contenidos en los extractos y su actividad fungicida *in vitro* control de hongos fitopatógenos.

III. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la capacidad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas fluorescens* contenidos en los extractos libres de células y extractos crudos.

3.2. Específicos

Identificación genérica del agente de biocontrol.

Evaluar la producción de biomasa de cultivos de *Pseudomonas fluorescens* en medios de cultivo líquidos y pH diferentes a nivel matraz

Obtener extractos libres de células y realizar pruebas de control *in vitro* contra los hongos *Colletotrichum fragariae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

Obtener extracto crudo seco y realizar pruebas de control *in vitro* contra los hongos *Colletotrichum fragariae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

Identificar los metabolitos presentes en el extracto crudo seco.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se dividió en cinco etapas que se identifican a continuación (Fig. 4)

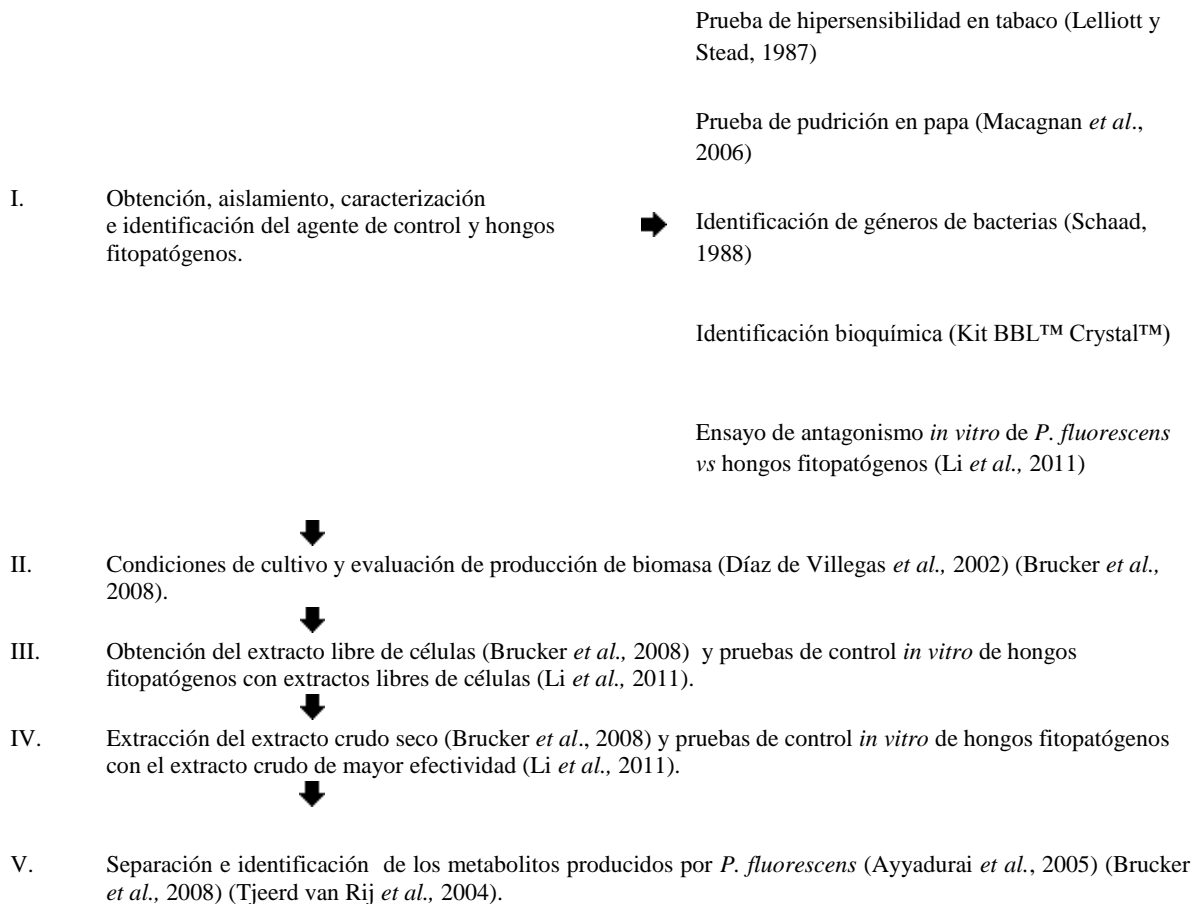


Fig. 4 Diagrama general de la metodología dividida en cinco etapas principales

4.1. Obtención de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos usados en este estudio, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG), *Botrytis cinerea* (BC) y *Colletotrichum fragariae* (CF) fueron proporcionados por el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN y el Colegio de Postgraduados, cada aislado fúngico se cultivó en agar papa-dextrosa (PDA) y se incubó de 4-7 días a temperatura ambiente; discos de micelio de 5 mm de diámetro fueron tomados de las placas de PDA para las pruebas de control *in vitro* posteriores.

4.2 Aislamiento, caracterización e identificación del agente de control biológico

De julio a septiembre del 2011 se realizó el aislamiento de hongos fitopatógenos de frutos y tallos de fresa provenientes de la localidad de Ejido de la Finca, en el Municipio de Villa Guerrero, Estado de México. Durante este proceso, se observó la presencia de una bacteria contaminante que inhibía el crecimiento de los hongos. La bacteria se aisló y purificó en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, evidenciando una tinción de Gram negativa y forma de bacilos, posteriormente se realizaron las siguientes pruebas para identificar el agente de control biológico.

4.2.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco

Se preparó una suspensión de la bacteria aislada (24-48 h de incubación) con una concentración aproximada 10^8 UFC mL⁻¹ de acuerdo a la escala de McFarland. La suspensión se infiltró en los espacios internerviales de hojas bien desarrolladas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Como control negativo, se infiltró agua destilada en otra hoja de la misma planta. La respuesta de hipersensibilidad positiva se evaluó a las 24-48 h siguientes como una necrosis o desecamiento brusco de la zona infiltrada y como respuesta negativa, el desarrollo de un color amarillo en el tejido. La prueba se realizó por triplicado.

4.2.2. Prueba de pudrición en papa

Se cortaron rodajas de papa de aproximadamente 5 mm de grosor, se lavaron con agua destilada estéril y se esterilizaron por flameo. La superficie de las rodajas de papa se inoculó con la bacteria con una concentración aproximada de 10^8 UFC mL⁻¹ de acuerdo a la escala de McFarland. Las rodajas se depositaron sobre tubos de vidrio estéril e incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Como prueba positiva se evaluó el ablandamiento del tejido. Como control negativo se usaron rodajas de papa inoculadas con agua destilada estéril. La prueba se realizó por triplicado.

4.2.3. Identificación bioquímica

Se realizaron pruebas de urea, arginina y citrato y la identificación se realizó por medio del montaje y la lectura de las placas con el Kit BBL™ Crystal™ que están basadas en la producción de metabolitos y vire de color de los reactivos de cada poso.

4.2.4. Identificación genérica de la bacteria

La identificación se realizó de acuerdo con el procedimiento propuesto por Schaad (1988), que consiste en tinción de Gram, crecimiento en medio dura-dextrosa-carbonato de calcio YDC) y crecimiento en medio B de King (KB) (Fig. 5).

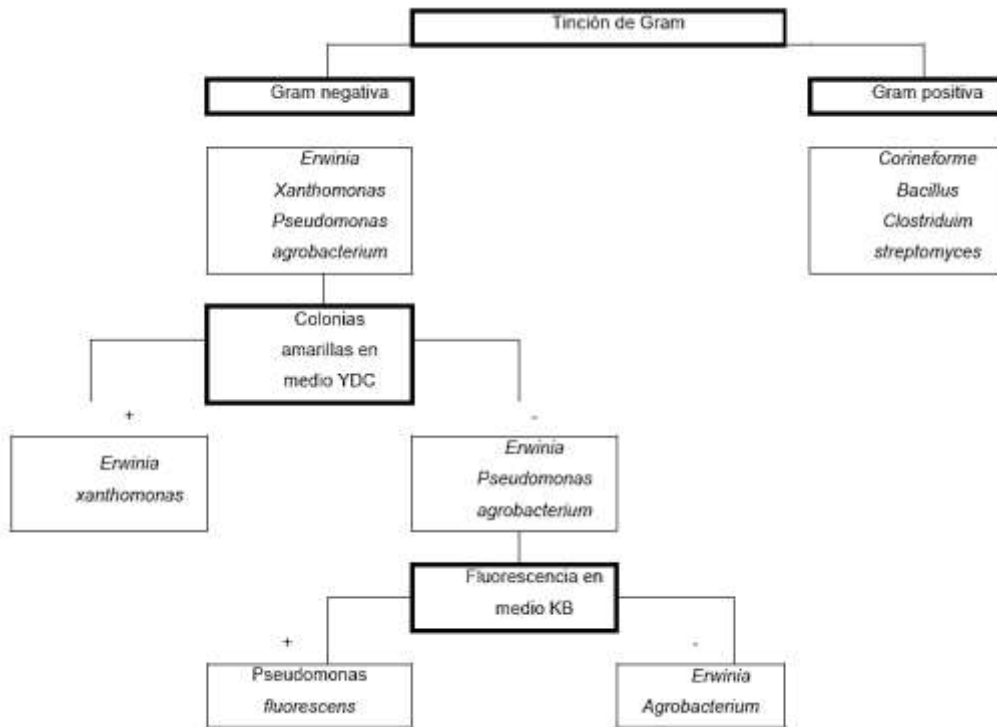


Fig. 5. Secuencia de identificación genérica de bacterias (Schaad, 1988)

4.2.5. Antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* vs hongos fitopatógenos

Para evaluar el potencial antagonismo de la cepa contra diferentes hongos fitopatógenos se utilizó el método de control dual. Se preparó una suspensión microbiana con una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹ la cual se inoculó en placas Petri (10 µL) con agar papa y dextrosa (PDA) y a una distancia de 45 mm se colocaron discos de 5 mm de diámetro con micelio de 7 días de crecimiento de cada uno de los diferentes hongos fitopatógenos (*Colletotrichum fragariae*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*). Como control negativo, se inoculó 10 µL de solución salina estéril y a 45 mm de distancia se colocaron discos de 5 mm con micelio de cada uno de los hongos. Se midió la zona no invadida por el hongo en los tratamientos en el momento en que el crecimiento de las colonias de cada hongo alcanzó el borde de la placa control.





































4.3. Condiciones de cultivo y evaluación de producción de biomasa de *P. fluorescens*

Para evaluar el crecimiento y producción de biomasa de *P. fluorescens* en medios líquidos, se realizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial. Los factores y niveles evaluados fueron: medio de cultivo [King B (KB), medio glucosa (MG) y medio glucosa adicionado con hierro (MG+Fe)] y pH (6.0, 7.0 y 8.0).

La constitución de los medios de cultivo líquidos fue la siguiente: KB (20 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de glicerol, 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O disueltos en 1 L de agua destilada), MG (10 g de glucosa, 0.56 g de K₂HPO₄, 0.85 g de KNO₃ y 1 g de ácido glutámico disueltos en 1 L de agua destilada) y MG+Fe (10 g de glucosa, 0.56 g de K₂HPO₄, 0.85 g de KNO₃, 1 g de ácido glutámico y 1.5 mL de una solución de cloruro de hierro 0.2 M disueltos en 1 L de agua destilada).

En cada medio de cultivo y distinto pH (25 mL) contenido en un matraz, se inóculo con una cantidad aproximada de 10⁸ UFC en la escala de McFarland (Cuadro 2). Los matraces se incubaron con agitación constante (120 rpm) a 28°C ± 2 °C. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Se evaluó el número de células viables. Las muestras se tomaron cada 1.5 h durante 24 h.

Cuadro 2. Arreglo de tratamientos para la producción de biomasa de *P. fluorescens* en un DCA en arreglo factorial.

Medio de cultivo	KB			MG			MG+Fe		
	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
I									
II									
III									
IV									

Medio King B (KB), medio glucosa (MG), medio glucosa adicionado con hierro (MG+Fe).

4.4. Pruebas de control *in vitro* de hongos fitopatógenos con extractos libres de células

Se evaluó la actividad antifúngica con cada uno de los extractos crudos libres de células mediante la técnica de difusión en agar. Para esto, los extractos libres de células obtenidos de los diferentes tratamientos del apartado 4.2 (incubados durante 72 h a 28°C±2 °C con agitación constante de 120 rpm) se vertieron en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 8.500 rpm x 9 g durante 15 min, el sobrenadante se filtró con membranas estériles de 25 mm con poros de 0.22 µm (Cole-Parmer) para retener cualquier célula remanente. Cada extracto se incorporó en medio PDA hasta alcanzar diluciones finales de 0% (control negativo) y 50 %. Después, se sembraron discos de micelio de los hongos fitopatógenos (antes mencionados) en la parte central de las placas Petri y se incubaron a temperatura ambiente hasta que los hongos de las placas control alcanzaron el borde. Se determinó el efecto antagónico del medio a través de mediciones del diámetro de la colonia del hongo (mm). Se realizaron seis repeticiones por tratamiento (Cuadro 3). Se eligió el extracto libre de células que mostró el mayor control de los hongos fitopatógenos.

Cuadro 3. Arreglo de tratamientos del control *in vitro* de hongos fitopatógenos con extractos libres de células de *P. fluorescens*.

Medio de cultivo		KB / MG / MG+Fe								
pH		6.0			7.0			8.0		
Hongo	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	
I										
II										
III										
IV										
V										
VI										

Medio King B (KB), medio glucosa (MG), medio glucosa adicionado con hierro (MG+Fe), *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG).

Con el extracto libre de células que mostró la mayor inhibición del crecimiento de los hongos se realizaron diluciones finales de 0% (control negativo), 10, 20, 30, 40 y 50%. Para esto, se sembraron discos de micelio de los distintos hongos fitopatógenos en la parte central de las placas Petri, se incubaron a temperatura ambiente hasta que los hongos de las placas control alcanzaron el borde de la placa. El efecto antagonístico del medio se determinó a través de mediciones del diámetro de la colonia del hongo (mm). Se realizaron seis repeticiones por tratamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Arreglo de tratamientos del control *in vitro* de hongos fitopatógenos con el extracto de *P. fluorescens* de mayor efecto inhibitorio sobre su crecimiento.

Medio de cultivo	Extracto mejor inhibición															
	% de dilución	50 %			40 %			30 %			20%			10 %		
		Hongo	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF
I																
II																
III																
IV																
V																
VI																

Botrytis cinerea (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG).

4.5. Extracción y pruebas de control *in vitro* de hongos fitopatógenos con el extracto crudo seco de mayor efectividad

El extracto crudo libre células más eficiente se mezcló con acetato de etilo (EtOAc) en una relación 1:1 y se agitó durante 2 h a 120 rpm. Después de la separación de la capa acuosa, se separó la fracción orgánica y se evaporó a presión reducida, de esta manera se obtuvo el extracto crudo seco. Para evaluar la capacidad antifúngica se usó la técnica de difusión en agar. El extracto crudo seco se diluyó en 1 mL de acetato de etilo y se añadió al medio PDA hasta obtener concentraciones finales de 0.0 mg mL⁻¹ (control negativo) 0.05 mg mL⁻¹, 0.1 mg mL⁻¹, 0.2 mg mL⁻¹, 0.3 mg mL⁻¹ y 0.4 mg mL⁻¹.

Posteriormente, se sembraron discos de micelio de los tres distintos hongos fitopatógenos en la parte central de las placas, se incubaron a temperatura ambiente hasta que los hongos de las placas control alcanzaron el borde de la placa. El efecto antagónico del medio se determinó a través de mediciones del diámetro de la colonia del hongo (mm). Se realizaron seis repeticiones por tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Arreglo de tratamientos del control *in vitro* de hongos fitopatógenos con los extractos crudos secos de *P. fluorescens*.

Medio de cultivo	Mejor inhibición														
	0.05			0.1			0.2			0.3			0.4		
[] ECS mg/mL															
Hongo	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC	FOG	CF	BC
I															
II															
III															
IV															
V															
VI															

Extracto crudo seco (ECS), Botrytis cinerea (BC), Colletotrichum fragariae (CF) y Fusarium oxysporum f. sp. gladioli (FOG).

4.5. Separación e identificación de los metabolitos producidos por *P. fluorescens*

Muestras de 50 µL del extracto crudo y de compuestos estándares de fluoroglucinol y fenazina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) se sometieron a cromatografía en capa fina (TLC; silica gel. 60 F254, 20 x 20, 0.5 mm, Merck and Co, Inc) con un sistema solvente hexano:acetona 3:2. La placa se secó completamente y los compuestos eluidos se detectaron a 254 nm.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* de la cantidad de células producidas en medios de cultivo, control dual, con extractos libres de células y crudos secos de hongos fitopatógenos, se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) para el diseño experimental utilizado. Para esto se usó el paquete estadístico SAS System V. 9.0 software para Windows. La comparación de medias se realizó mediante diferencia mínima significativa de Fisher Test $P < 0.05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento, caracterización e identificación del material biológico

5.1.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco

La bacteria aislada exhibió una reacción positiva de hipersensibilidad en cada una de las zonas donde se infiltró en el lapso de 24-48 h (Fig. 6). El tejido infiltrado con la suspensión bacteriana mostró un desecamiento, característico de una reacción de hipersensibilidad positiva; esta reacción tiene como propósito, confinar y eliminar al microorganismo invasor para que no se propague a las células adyacentes (Czernic *et al.*, 1996). Esta reacción indica de manera indirecta que la bacteria es fitopatógena de algún otro hospedante, pero no de tabaco (Llácer *et al.*, 2000). Entre las especies de *Pseudomonas* que inducen una reacción de hipersensibilidad y que causan lesiones necróticas en hojas y tallos, se encuentran *Pseudomonas chicorri*, *Pseudomonas fluorescens* biovar II, *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas marginalis* aunque estas son fenotípicamente indistinguibles entre sí (Braun-Kiewnick y Sands, 2001; Oyoque, 2008).

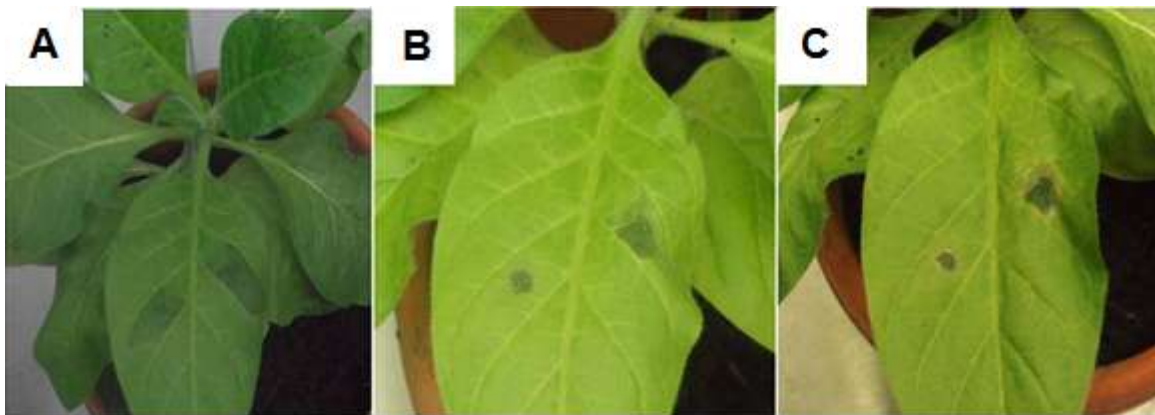


Fig. 6. Respuesta de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infiltradas con una suspensión de *P. fluorescens*, El testigo se muestra a la izquierda de la hoja y a la derecha la zona infiltrada con la suspensión bacteriana. Al día de la inoculación (A), 24 y 48 h después de la inoculación (B y C, respectivamente).

5.1.2. Prueba de pudrición en papa

La bacteria aislada no causó ablandamiento en los tejidos (Fig. 7 A y B). La desintegración de los tejidos es más característica de *P. marginalis* y de cierto grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes (Starr, 1983). La prueba de pudrición en papa, sirve para distinguir entre especies de *Pseudomonas* pectinolíticas y las únicas especies con esta actividad son a *P. marginales* y *P. viridiflava* (Fig. 7 D) (Macagnan *et al.*, 2006)

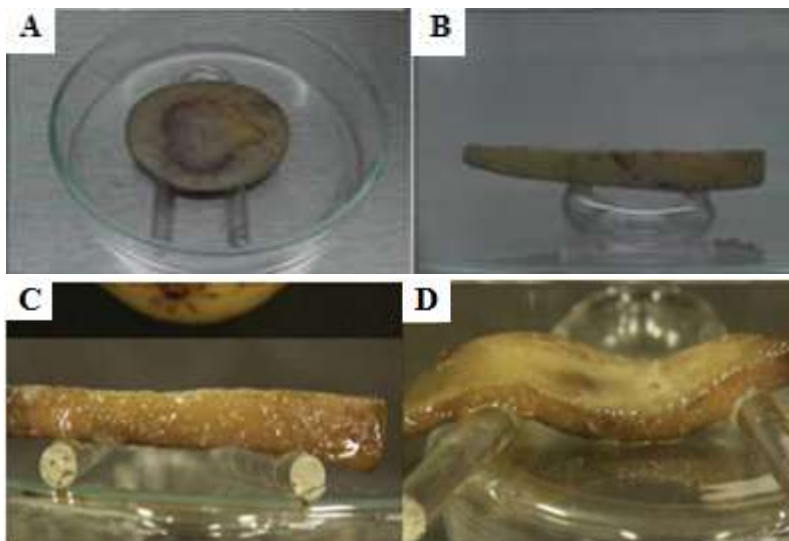


Fig. 7. Pudrición negativa de rodajas de papa 48 h después de la inoculación (A y B) de *Pseudomonas fluorescens*. Testigo negativo (C) y positivo (D) 48 h después de la inoculación por *P. viridiflava* (C y D Tomado de Macagnan *et al.*, 2006).

5.1.3. Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas que se realizaron mediante el Kit BBL™ Crystal™ mostraron como resultado del metabolismo de la bacteria positivo para urea, arginina y citrato. La identificación se hizo con base al cambio de color de los indicadores de cada uno de los pozos de las placas, de ahí que la hidrólisis de la urea con la consecuente producción de amonio, cambió el color del indicador azul de bromotimol, la degradación de la arginina elevó el pH y cambió el color del indicador púrpura de bromocresol, mientras que la degradación del citrato liberó metabolitos alcalinos que cambiaron el color del indicador azul de bromotimol. Estos resultados metabólicos, son característicos de género *Pseudomonas* (Kojima y Shimizu, 2003).

5.1.4. Identificación genérica de la bacteria

De acuerdo con la metodología seguida y propuesta por Schaad (1988), la bacteria se tiñó como Gram negativa, las colonias presentaron una coloración crema-blanca después de una incubación de 48 h en medio agar YDC. Este medio permite diferenciar entre géneros según la coloración de las colonias, así colonias amarillas son características del género *Xanthomonas* y colonias no amarillas puede corresponder a los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia* o *Agrobacterium*, mientras que en agar *Pseudomonas* F (King B) y después de una incubación de 48 h, las colonias produjeron un pigmento de color amarillo, amarillo-verdoso fluorescente bajo luz UV, que rodeó la colonia y se difundió por todo el medio de cultivo. De acuerdo con este autor, el desarrollo de pigmentos de este tipo, es característico de *P. fluorescens* (Fig. 8).

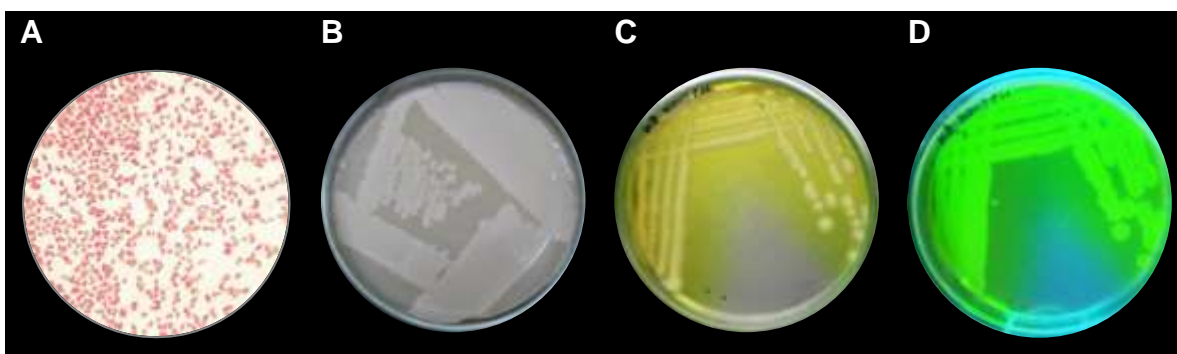


Fig. 8. Resultados de las pruebas realizadas a *P. fluorescens* propuestas por Schaad (1988). Bacteria Gram negativa (A), colonias cremosas en medio YDC (B), con producción de pigmento amarillo en agar King B (C) y fluorescencia bajo luz UV (D).

Las características bioquímicas encontradas para la bacteria de este trabajo fueron similares a las reportadas por Bhattacharya (2010) y Ramyasmruthi *et al.*, (2012) quienes describen a una cepa identificada como *Pseudomonas fluorescens* (Cuadro 6). Con base a los resultados obtenidos, la bacteria aislada de frutos y tallos de fresa se identificó como *P. fluorescens*.

Cuadro 6. Características bioquímicas de *P. fluorescens*

Pruebas	Este estudio	Bhattacharya. 2010	Ramyasmruthi <i>et al.</i> , 2012
Test de hipersensibilidad	+	NR	NR
Test de pudrición en papa	-	NR	NR
Colonias amarillas en YDC	-	NR	NR
Ureasa	+	+	NR
Arginina	+	+	+
Citrato	+	+	+
pigmento en Agar PF (King B)	+	+	+
Fluorescencia UV	+	+	+
Tinción de Gram	-	-	-

NR= Prueba no realizada

5.2. Antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* vs hongos fitopatógenos

El cultivo dual de la bacteria, aislada de frutos y tallos de fresa e identificada como *P. fluorescens*, con los tres diferentes hongos fitopatógenos, mostró un claro efecto inhibitorio en el desarrollo y crecimiento de las colonias (Fig. 9). El efecto inhibitorio, de mayor a menor grado, fueron para *Colletotrichum fragariae*, *Botrytis cinerea* y finalmente sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, respectivamente. Las zonas de inhibición (Cuadro 7) que se observaron entre los diferentes hongos fitopatógenos oscilaron de 19.40 hasta 28.21 mm y representaron unos porcentajes de crecimiento de 61.8 a 72.7%, para *C. fragariae* y *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Ramyasmruthi *et al.* (2012) para *C. gloeosporioides* (58.3%) y muy por arriba para *F. oxysporum* (14.2%) en cultivos con una cepa de *P. fluorescens* aislada de la rizósfera.

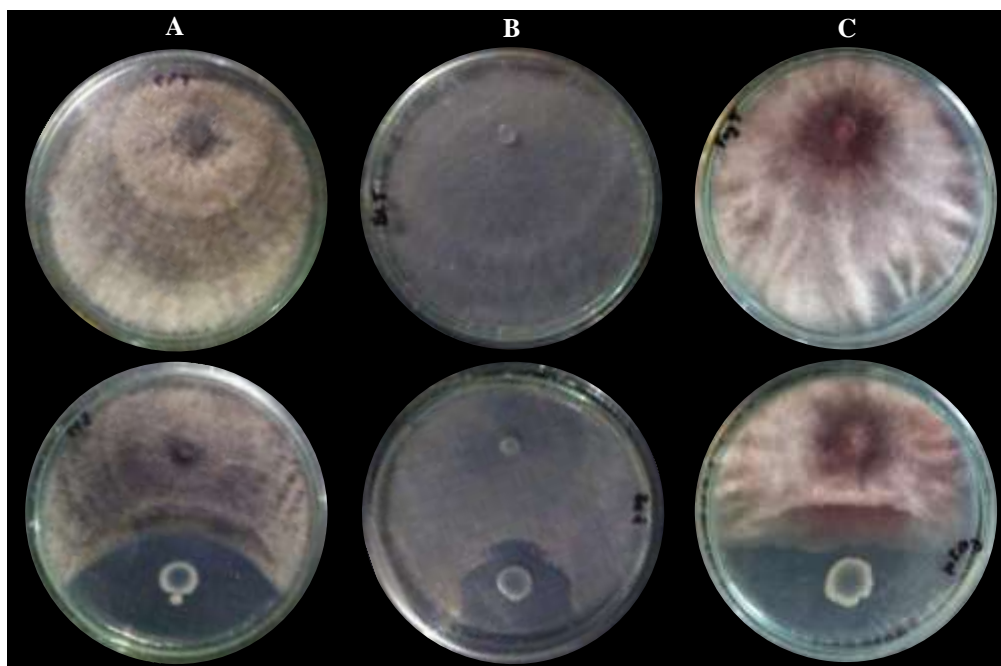


Fig. 9. Efecto de *P. fluorescens* en cultivos duales contra los hongos *Colletotrichum fragariae* (A), *Botrytis cinerea* (B) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (C).

Cuadro 7. Antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas fluorescens* contra hongos fitopatógenos en cultivo dual.

Hongo fitopatógeno	Hospedante	Halo de inhibición (mm)	Crecimiento (%)
<i>Colletotrichum fragariae</i>	Chirimoya	34.8 ± 1.37	61.85 ^b
<i>Botrytis cinerea</i>	Fresa	63.4 ± 1.37	62.60 ^b
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	Gladiola	24.5 ± 0.57	72.78 ^a

Los datos representan la media ± desviación estándar Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

5.3. Condiciones de cultivo y producción de biomasa de *P. fluorescens*

De acuerdo con la comparación de medias de los tratamientos (Cuadro 8), los tres medios cultivo son significativamente diferentes en cuanto a producción de biomasa (Ln UFC/mL), mientras que en el caso del pH, sólo hubo diferencias con respecto al pH 8.0. De esta forma, la mayor producción de biomasa se obtuvo en medio de cultivo KB a pH 6 y 7. La producción de células en medio MG+Fe, fue mayor respecto al que no se adicionó hierro

(MG), comportamientos similares fueron obtenidos por Bakker y Schippers (1986) quienes obtuvieron mayor cantidad de biomasa de una cepa de *Pseudomonas* aislada de la rizósfera al adicionar hierro al medio. Este elemento es esencial para el metabolismo celular como cofactor de numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, en este caso la división celular (Greenshields *et al.*, 2007). Slininger y Shea-Wilbur (1995) cultivaron la cepa de *P. fluorescens* 2-79 y obtuvieron altas concentraciones celulares en fuentes de carbono como glicerol, glucosa, xilosa y fructosa. Estos resultados son similares con los encontrados por Zhan *et al.* (1998) quienes cultivaron una cepa de *P. fluorescens* y determinaron que se generó una mayor densidad celular en un medio donde la fuente de carbono fue glicerol y una menor densidad celular con una fuente de glucosa. Aunque, de acuerdo con Tjeerd van Rij *et al.* (2004) en fuentes de carbono como la glucosa, la generación celular de *Pseudomonas* es más elevada que en medios con glicerol, aunque este rápido aumento en la biomasa podría conducir a un rápido consumo de glucosa, agotándola y limitando el crecimiento que se ve reflejado en el recuento de células viables de la cinética, por el contrario, con el glicerol, la generación celular es menor, además de servir como fuente de carbono, protege a las células (Manikandan *et al.*, 2010) aumentando la supervivencia y la densidad celular en el medio de cultivo, lo que se refleja en el recuento final en placa.

Cuadro 8. Producción de biomasa de *P. fluorescens* en medios de cultivo líquido y pH diferentes.

Factor	Nivel	Especificaciones	Observaciones (n)	Biomasa (Ln UFC mL ⁻¹)
Medio de cultivo	1.00	KB	12.00	20.30 ^a
	2.00	MG	12.00	17.23 ^c
	3.00	MG+Fe	12.00	17.63 ^b
pH	1.00	6.00	12.00	18.44 ^a
	2.00	7.00	12.00	18.43 ^a
	3.00	8.00	12.00	18.30 ^b

Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

5.4. Pruebas de control *in vitro* de hongos fitopatógenos con extractos libres de células

Las pruebas de control realizadas con los extractos libres de células (50% v/v) demostraron que hubo una inhibición del crecimiento con todos los tipos de tratamiento y para todos los hongos fitopatógenos probados en el estudio. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos libre de células de *P. fluorescens* (50%).

Factor	Nivel	Especificaciones	Observaciones	Diámetro de la colonia (mm)
Medio de cultivo	1.0	KB	54.0	19.87 ^c
	2.0	MG	54.0	48.63 ^b
	3.0	MG+Fe	54.0	70.46 ^a
pH	1.0	6.0	54.0	42.97 ^c
	2.0	7.0	54.0	46.08 ^b
	3.0	8.0	54.0	49.93 ^a
Hongo	1.0	<i>F. oxysporum</i>	54.0	46.47 ^b
	2.0	<i>C. fragariae</i>	54.0	44.32 ^c
	3.0	<i>B. cinerea</i>	54.0	48.19 ^a

Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

El efecto de los medios de cultivo libres de células de *P. fluorescens* en el crecimiento de los hongos *in vitro* puede ser atribuido a los compuestos producidos extracelularmente por la bacteria tales como derivados de fluoroglucinol, derivados de fenazina, pioverdinas, piocianinas (Keel *et al.*, 1990; Lemanceau *et al.* 1992; Pierson y Pierson, 1996; Baron *et al.* 1997) Al comparar el número de células producidas en las cinéticas con el crecimiento (diámetro de la colonia) de los hongos en las placas con extracto libre de células (Cuadro 10), se observaron diferentes comportamientos:

Cuadro 10. Correlación entre número de células de *P. fluorescens* y control del crecimiento colonial de hongos fitopatógenos en medios de cultivo y pH distinto.

Factor	Especificaciones	Número de células (Ln UFC mL ⁻¹)	Media diámetro de colonia (mm)
Medio de cultivo	KB	20.30 ^a	19.87 ^c
	MG	17.23 ^c	48.63 ^b
	MG+Fe	17.63 ^b	70.46 ^a
pH	6.0	18.44 ^a	42.97 ^c
	7.0	18.43 ^a	46.08 ^b
	8.0	18.30 ^b	49.93 ^a

Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

El medio KB mostró una mayor densidad celular y generó un menor crecimiento de los hongos fitopatógenos respecto a los otros medios (Fig. 10) de esta manera, se puede decir que la densidad celular de *P. fluorescens* está directamente correlacionado con la producción de compuestos antifúngicos, los cuales se producen a finales del crecimiento exponencial y la fase estacionaria temprana (Chin-A-Woeng *et al.*, 2002). La producción varios metabolitos secundarios de *Pseudomonas* son regulados por la detección de *quórum* (Pierson y Thomashow, 1992; Pearson *et al.*, 1997; Bassler, 1999; Chin-A-Woeng *et al.*, 2001), que es la capacidad de las bacterias para detectar moléculas que permiten iniciar la producción de metabolitos (Whitehead *et al.*, 2001). La señal más común encontrada en bacterias Gram (-), como *Pseudomonas*, es la producción, y acumulación de homoserina, una lactona autoinductora difusible (Cook *et al.*, 1995). Cuando la concentración del autoinductor excede una cierta densidad celular y alcanza el nivel umbral, inicia una cascada de transducción de señales que conducen a la producción de los metabolitos (Bassler, 1999). En los medios MG y MG+Fe se observó una menor cantidad de biomasa con respecto a KB. En el caso del medio MG, la cantidad de células al final del cultivo fue menor con respecto al adicionado con hierro (MG+Fe), pero el efecto inhibitorio no mostró una dependencia con la densidad celular (Fig. 10), esto se pudo deber a la adición exógena de hierro al medio, ya que *P. fluorescentes* se caracterizan por producir metabolitos anti fúngicos (sideróforos) que están ligados al contenido de hierro en el medio (Kloepper *et al.*, 1980) se sabe que la producción de estos compuestos es inversamente proporcional a la

concentración del hierro en el medio de crecimiento (Ratledge y Dover, 2000; Clark, 2004). Estos compuestos no son considerados metabolitos secundarios ya que su producción comienza pocas horas después de iniciados los cultivos y su máxima concentración se encuentra justo cuando inicia la fase estacionaria (Jadhav y Desai, 1992); se sintetizan principalmente en la etapa exponencial donde la población requiere más nutrientes (hierro) para la división celular (O'Sullivan y O'Gara, 1992), por lo tanto la disponibilidad de hierro en el medio, suprime la producción de este tipo de metabolitos anti fúngicos; de esta manera, estos metabolitos juegan un papel importante en el control de hongos fitopatógenos, pero aún con la supresión de estos compuestos en MG+Fe, se puede observar una reducción en el crecimiento de los hongos, debido a la producción de otros metabolitos secundarios que también están implicados en el control como por ejemplo los antibióticos. Los comportamientos encontrados en este trabajo concuerdan con los reportados por Sridevi y Mallaiah (2008), donde una cepa de *Rhizobium* productora de sideróforos incrementó su densidad celular cuando el medio fue suplementado con hierro pero disminuye la producción de sideróforos, y por lo tanto su capacidad de biocontrol. De la Rosa *et. al.* (2007) mencionan que de 46 aislados bacterianos donde se incluyó a la especie *Pseudomonas*, el 86% produjo sideróforos, el 30% disminuyó su capacidad inhibitoria en presencia de hierro exógeno y el 13% perdió completamente el efecto antimicrobiano al adicionar el metal.

Con respecto al pH, se observó que la inhibición del crecimiento fue menor a medida que el pH aumentó. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Brisbane *et al.* (1997) quienes demostraron que la fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) producida por la cepa *P. fluorescens* 2-79, presentó una mejor actividad inhibitoria de *Gibberella graminis* a pH menores de 7.0. Por otra parte, Bonnie *et al.* (2003) encontraron que el crecimiento micelial *in vitro* de *Gaeumannomyces. graminis* f. sp *tritici* fue menor a valores de pH del medio entre 6.0 y 6.6; y un menor efecto de biocontrol a pH entre 6.8 y 8.0, por lo que la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por *P. fluorescens* 2-79, estaba relacionada con la concentración protonada de los mismos, lo que sugiere que a medida que el pH aumenta, el biocontrol es menos eficaz por la predominancia de la forma aniónica de la PCA.

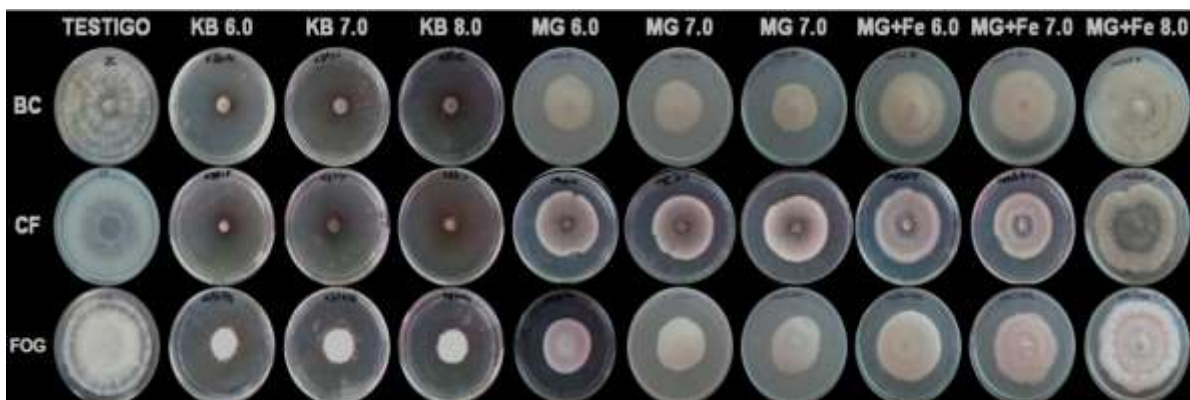


Fig. 10. Efecto de extractos libre de células de *P. fluorescens* (50% v/v) sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG).

El efecto de los distintos tratamientos usados en el estudio, se observa claramente en la dinámica del crecimiento de los distintos hongos en placas con extractos libres de células de *P. fluorescentes*, el crecimiento se observó claramente menor con respecto a la placa control en un periodo de incubación de 12 días; en la figura 11 se observa la dinámica de crecimiento de *C. fragariae*, este hongo invadió la placa Petri en diez días con porcentajes que oscilaron de 54.1% para MG+Fe, 35.9% para MG y 7.2% para KB y hasta los doce días que duro el experimento, los tres medios mostraron una reducción en el crecimiento de los hongo.

En la figura 12 se observa la dinámica de crecimiento de *B. cinérea* y se apreció que este hongo es el que tiene un mayor desarrollo micelial invadiendo completamente la placa Petri en ocho días con porcentajes de crecimiento que variaron de 45.3% para MG+Fe, 22.9% para MG y 7.7% para KB y hasta los doce días que duro el experimento, los tres medios mostraron una reducción en el crecimiento de los hongos. Para los hongos *B. cinérea* y *C. fragariae* cabe destacar el efecto fungistático durante los primeros seis días del experimento.

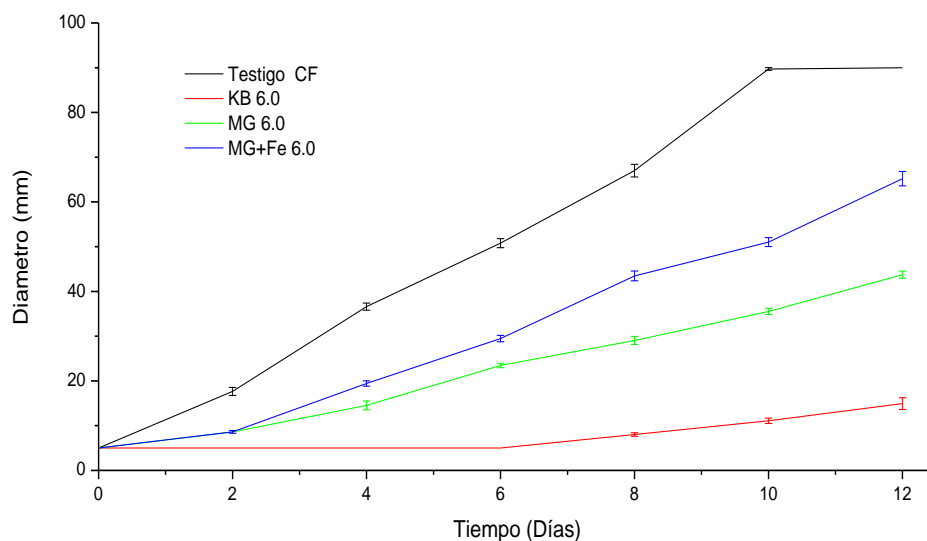


Fig. 11. Dinámica del crecimiento de *Colletotrichum fragariae* (CF) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (50% v/v).

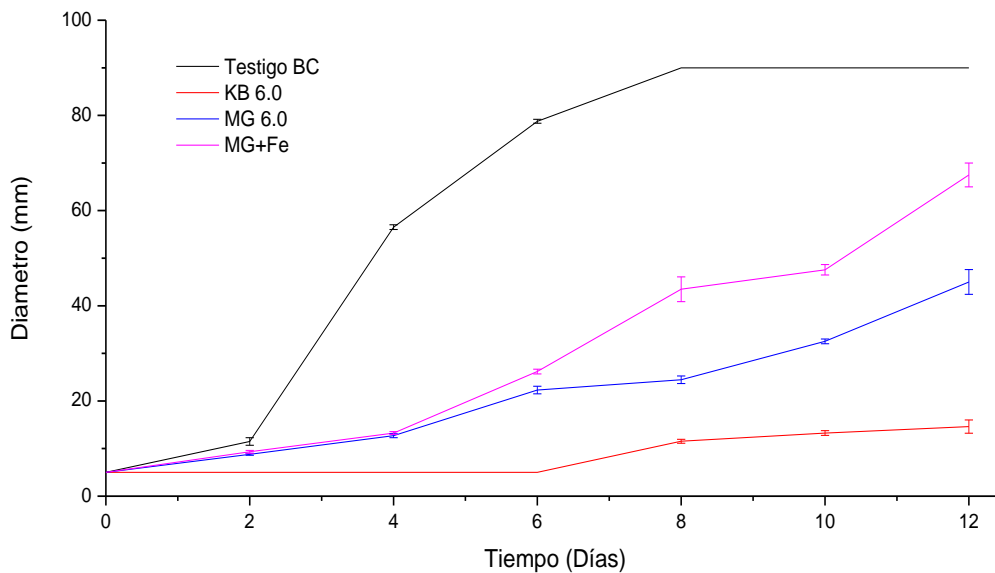


Fig. 12. Dinámica del crecimiento de *Botrytis cinerea* (BC) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (50% v/v).

En la figura 13 se observa que el crecimiento de *F. oxysporum* es el menos acelerado con respecto a los otros hongos del estudio, invadiendo la placa hasta los doce días del experimento, además mostró una mayor resistencia a los metabolitos contenidos en los extractos presentando los porcentajes de crecimiento más altos oscilando del 59.7% para MG+Fe 44.7% para MG y 25.8% para KB.

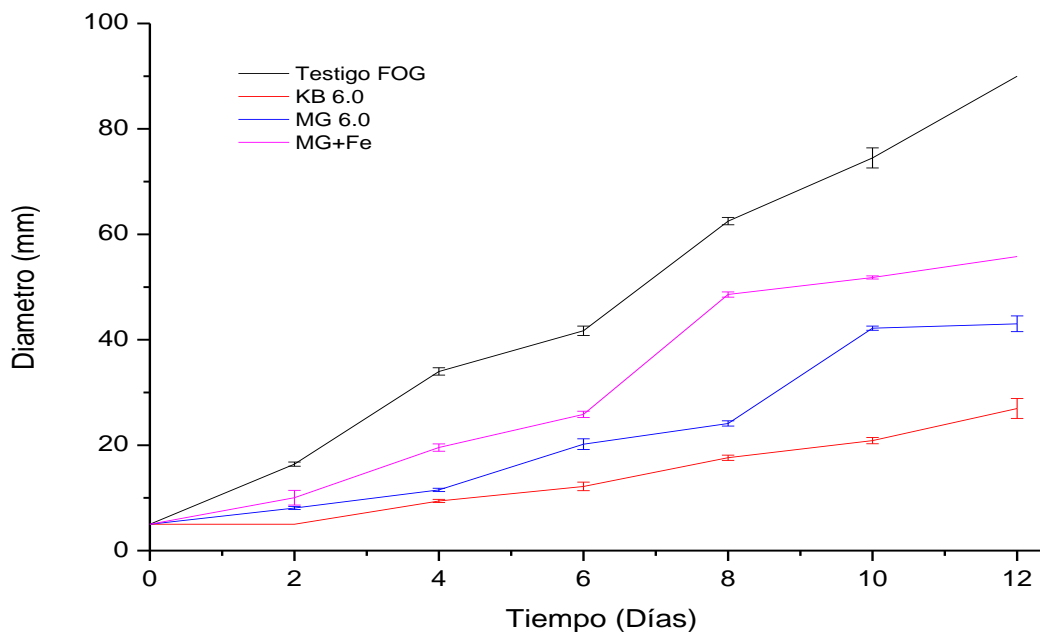


Fig. 13. Dinámica del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (50% v/v).

De esta manera, el tratamiento (extracto libre de células 50 % v/v) que mostró el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los fitopatógenos fue KB pH 6.0; Durante los doce días que duro el cultivo *in vitro*, este extracto permitió el mínimo crecimiento para los tres distintos hongos, que fue de 11.7% para *C. fragariae*, 11.3% para *B. cinerea* y 25.8% para *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en comparación con el crecimiento del testigo que fue de 100%.

Un factor importante en el efecto de biocontrol de los extractos libres de células sobre el crecimiento de las colonias de los diferentes hongos es la dilución a la que se usan en el cultivo *in vitro*, ya que el efecto de biocontrol fue inversamente proporcional a la dilución de los extractos libres de células, en cuanto más se diluyó el extracto, fue menor el efecto de control (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos libre de células de *P. fluorescens* a diferentes diluciones.

Factor	Nivel	Especificaciones	Observaciones	Diámetro de colonia (mm)
Dilución	1	10%	18	30.63 ^a
	2	20%	18	24.25 ^b
	3	30%	18	21.46 ^c
	4	40%	18	20.02 ^d
	5	50%	18	18.83 ^e
Hongo	1	<i>F. oxysporum</i>	18	29.82 ^a
	2	<i>C. fragariae</i>	18	18.08 ^c
	3	<i>B. cinerea</i>	18	21.23 ^b

Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

En el cuadro 11 y figura 14 se puede ver más claramente el efecto que tiene la dilución del extracto, para *F. oxysporum* se observó un porcentaje de crecimiento de 32.7% con 10% del extracto que disminuyó a 25.8% con 50% del extracto, para *B. cinerea* de 37.4% con 10% del extracto que disminuyó a 11.3% con 50% del extracto y *C. fragariae* de 22.2% con 10% del extracto que disminuyó a 10.5% con 50% del extracto en un tiempo de incubación de 14 días.

Cuadro 12. Porcentaje de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos en medio KB, pH 6.0 con extractos libre de células de *P. fluorescens* a diferentes diluciones.

Hongo	Dilución v/v (%)					Testigo
	10	20	30	40	50	
<i>F. oxysporum</i>	32.7	30.8	28.8	27.8	25.8	100.0
<i>B. cinerea</i>	37.4	20.2	14.5	13.9	11.3	100.0
<i>C. fragariae</i>	22.2	16.9	14.9	11.3	10.5	100.0

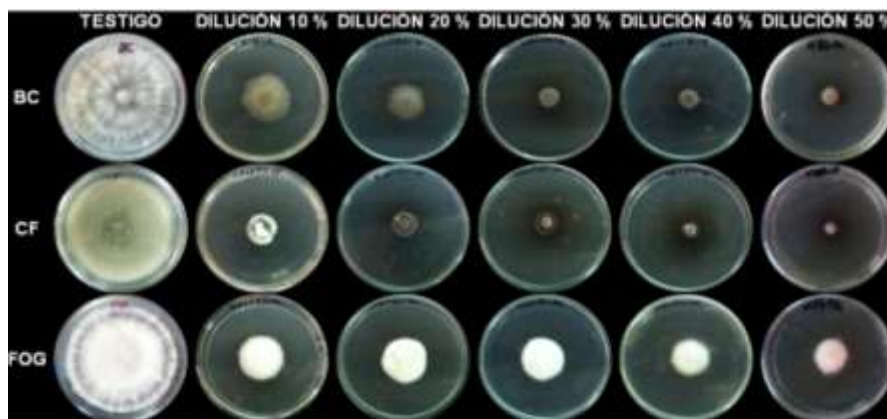


Fig. 14. Diámetro (mm) de las colonias de *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) en medio KB, pH 6.0 con extractos libre de células de *P. fluorescens* a diferentes diluciones

En las Fig. 15, 16 y 17 se observa que *B. cinerea* tuvo el desarrollo micelial más rápido, seguido de *C. fragariae* y finalmente *F. oxysporum*, las dinámicas se mantienen proporcionales y estables entre diluciones; aunque la diferencia entre diluciones es estadísticamente significativa, en las figuras de la dinámica de crecimiento se observa que tratamientos que usan solo 10% del volumen de extractos libres de células mantienen un biocontrol aceptable, permitiendo el máximo crecimiento de 37.4% para el hongo *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.

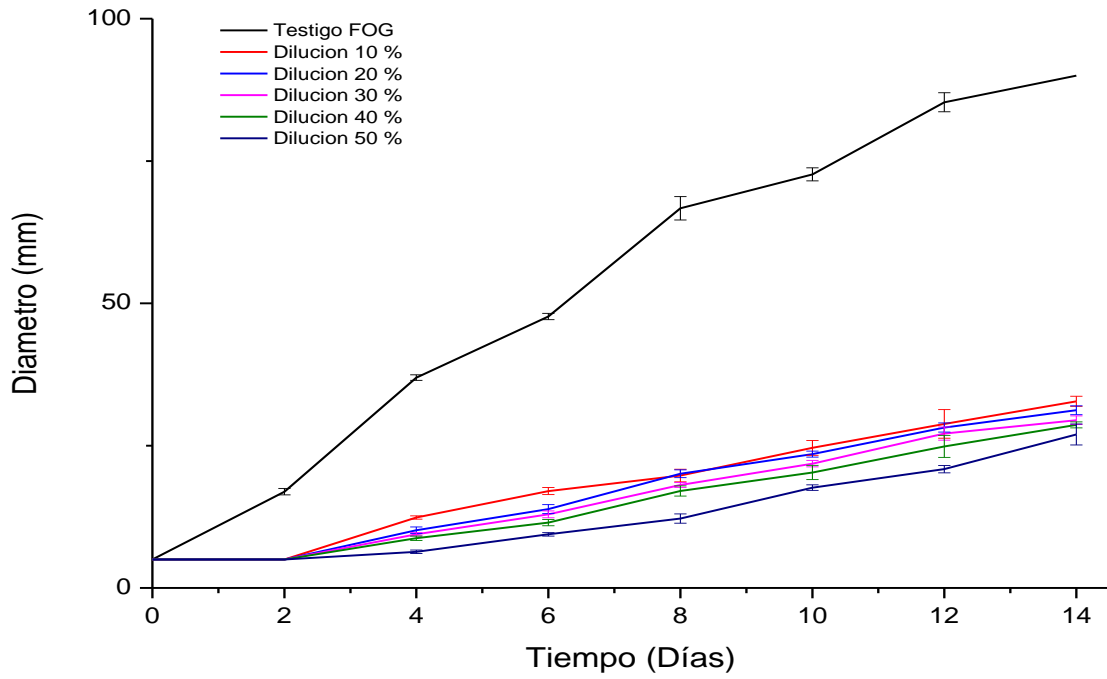


Fig. 15. Dinámica del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (10-50% v/v).

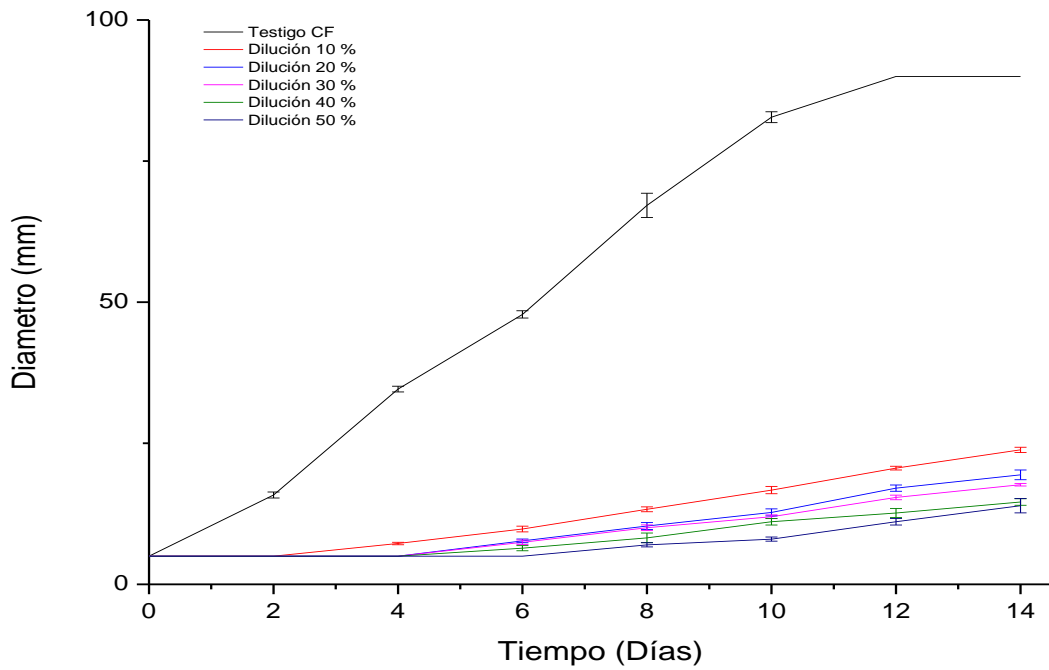


Fig. 16. Dinámica del crecimiento de *Colletotrichum fragariae* (CF) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (10-50% v/v).

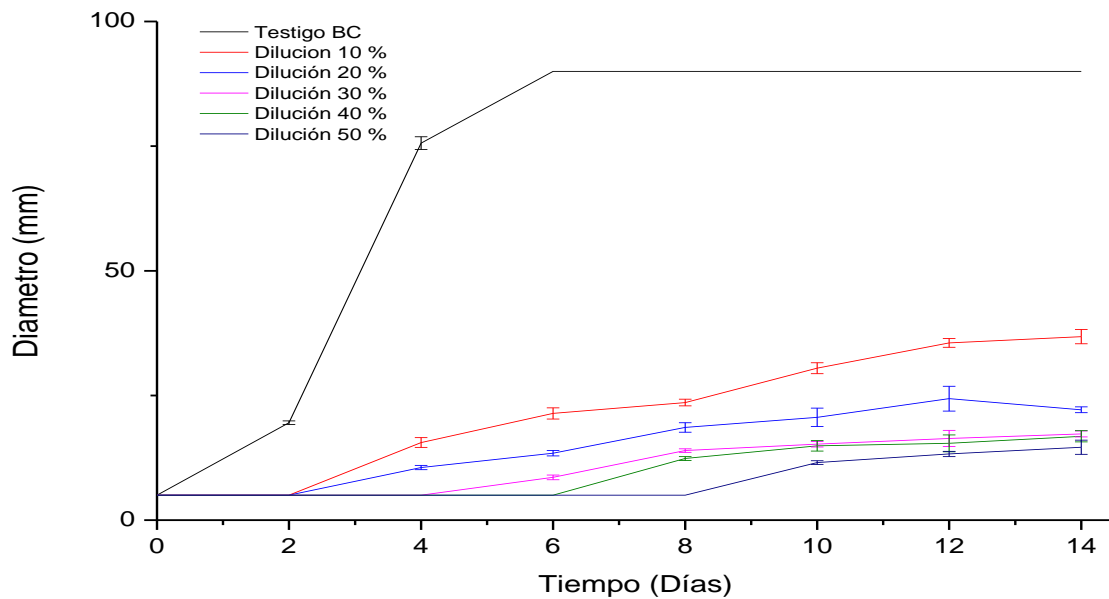


Fig. 17. Dinámica del crecimiento de *Botrytis cinerea* (BC) *in vitro* con extractos libre de células de *P. fluorescens* (10-50% v/v).

Un fenómeno independiente de la inhibición de crecimiento de los hongos fitopatógenos, fue la variedad de colores que se observaron en los medios de cultivo en función de la especie. Respecto al pH se observó que el color y morfología de la colonia de los tres diferentes hongos se mantuvo similar cuando se cultivan en PDA y se varia el pH desde 5.0 (testigo) hasta 8.0 (Fig. 18), aunque la pigmentación de la mayoría de los hongos se ve notablemente afectada por la variación del pH en el medio, especies como las usadas en este trabajo tienen la capacidad para modificar el pH del medio para sus requerimientos óptimos para la formación de pigmentos (Booth, 1971).

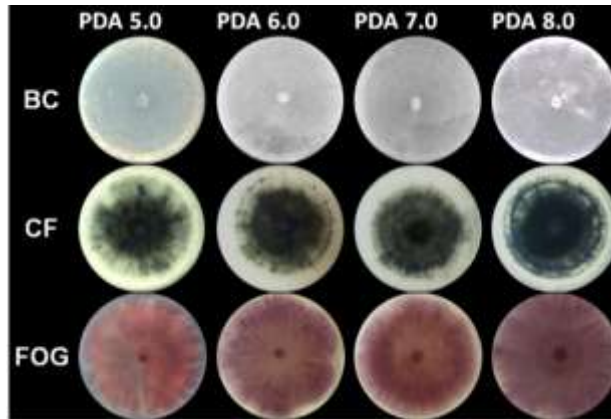


Fig. 18. Efecto del pH sobre el color de las colonias (vista inferior de las placas de cultivo) de *Botrytis cinérea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) en medio PDA.

Cuando los hongos se cultivaron en medio KB, MG y MG+Fe a pH 6.0, 7.0 y 8.0 con una concentración del extracto (50 % v/v) de *P. fluorescens* se observó, en el caso de *B. cinerea*, que las colonias presentaron un rápido crecimiento con micelio raso de color blanco a gris claro, las variaciones más evidentes fueron en la producción de esporas que se perciben visualmente, las cuales se incrementaron en los medios con glucosa (Fig. 19 y Fig. 20). Estos comportamientos son similares a los reportados por Phillips *et al.*, (1987) quienes identificaron que el incremento en la producción de esporas por *B. cinerea* fue proporcional a la concentración de glucosa en el medio de crecimiento.

Para el caso de *C. fragariae*, se presentaron colonias de color amarillo-naranjas con micelio aéreo blanco en medios con glicerol como fuente de carbono (Fig. 198 y Fig. 20), el color anaranjado se asocia con masas de conidios producidos en esporodoquios (Villanueva *et al.*, 2008) cuya formación podría estar estimulada por el glicerol. Para los medios con glucosa como fuentes de carbono y glucosa con hierro, el micelio aéreo fue de verde olivo a gris-oscuro con colonias negras (Fig. 19 y Fig. 20), similar a la morfología colonial observada en PDA. Esta morfología concuerda con la reportada por Smith y Black (1990) y Gunnell y Gubler (1992) quienes mencionan que el color de las colonias de *C. fragariae* en PDA es blanco a gris, gris-olivo hasta gris oscuro, por lo que la adición de glucosa parece no tener efecto en el color de la colonia. Para *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, en las placas donde se añadió glicerol, las colonias fueron amarillo-naranja con micelio aéreo

blanco (Fig. 19 y Fig. 20), y concuerda con lo reportado por Nelson *et al.* (1983) quienes indican que en PDA, *F. oxysporum* presenta micelio aéreo blanco y pigmentos de color púrpura, características que cambian con una mínima alteración en la composición del medio, desarrollando colores de colonias que incluyen color blanco, crema, naranja, café claro, marrón, rojo, rosa, azul. Para las placas con adición de glucosa y glucosa con hierro, presentó colonias con micelio de color púrpura, característico de este hongo, seguido de una abundante formación de micelio blanco raso (Fig. 19 y Fig. 20), lo anterior es acorde con lo reportado por Booth (1971) quienes observaron un excesivo desarrollo micelial de *Fusarium* cuando se cultivó en medios que contenían glucosa.

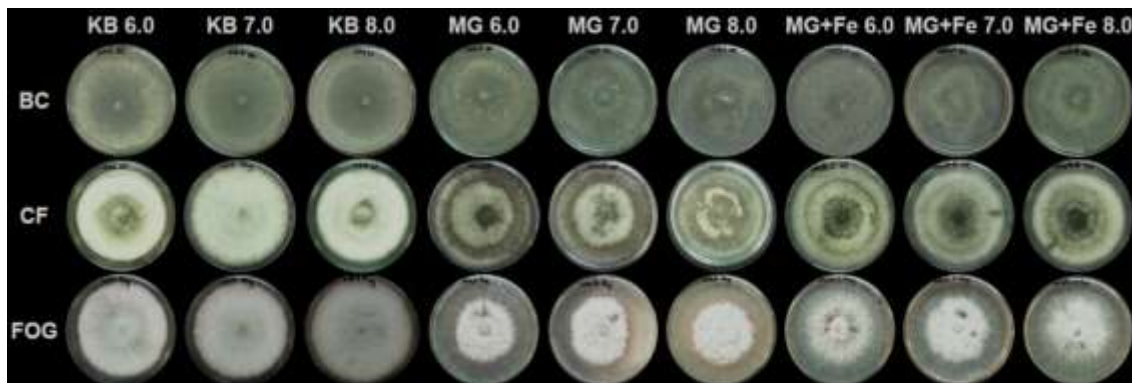


Fig. 19. Efecto del medio de cultivo (KB, MG, MG+Fe y pH 6.0, 7.0 y 8.0) (adicionado con extracto libre de células (50% v/v) de sobre la coloración de las colonias de *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF), y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) (vista anterior).

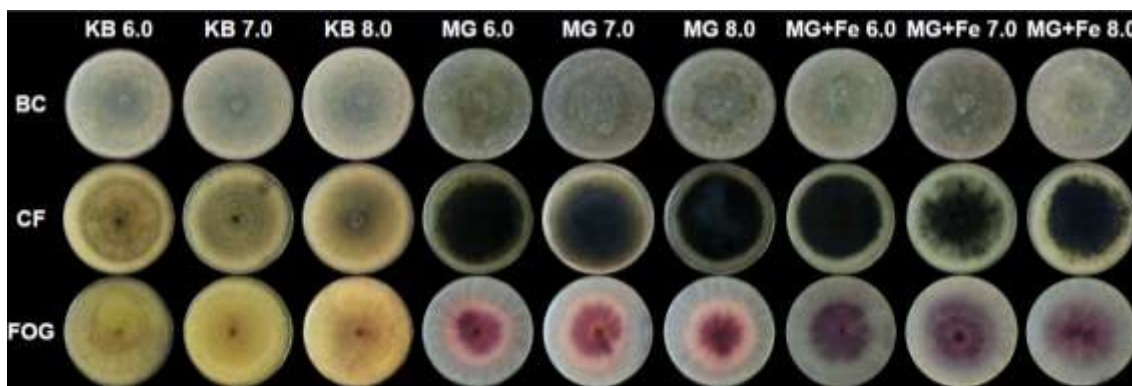


Fig. 20 Efecto del medio de cultivo (KB, MG, MG+Fe y pH 6.0, 7.0 y 8.0) (adicionado con extracto libre de células (50% v/v) de sobre la coloración de las colonias de *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF), y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) (vista posterior).

5.5. Extracción y pruebas de control *in vitro* de hongos fitopatógenos con extracto crudo seco de *P. fluorescens*

Los extractos crudos obtenidos de *P. fluorescens* cultivada en *KB* pH 6.0 mostraron un efecto de inhibición en el crecimiento de los hongos fitopatógenos en los ensayos *in vitro*. La concentración más elevada de extracto crudo resultó en una mayor inhibición en el crecimiento de los hongos y se observó una progresiva disminución estadísticamente significativa con menores concentraciones (Cuadro 13 y Fig. 21)

Cuadro 13. Comparación de medias del diámetro (mm) de crecimiento de las colonias de hongos fitopatógenos con extractos crudos y secos de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones.

Factor	Nivel	Especificaciones	Observaciones	Media
Concentración (mg/mL)	1.0	0.05	18.0	35.26 ^a
	2.0	0.1	18.0	32.36 ^b
	3.0	0.2	18.0	29.67 ^c
	4.0	0.3	18.0	26.49 ^d
	5.0	0.4	18.0	23.21 ^e
Hongo	1.0	FOG	30.0	37.64 ^a
	2.0	CF	30.0	21.09 ^b
	3.0	BC	30.0	29.46 ^c

Las letras de superíndice indican la significación estadística (Fisher 5%).

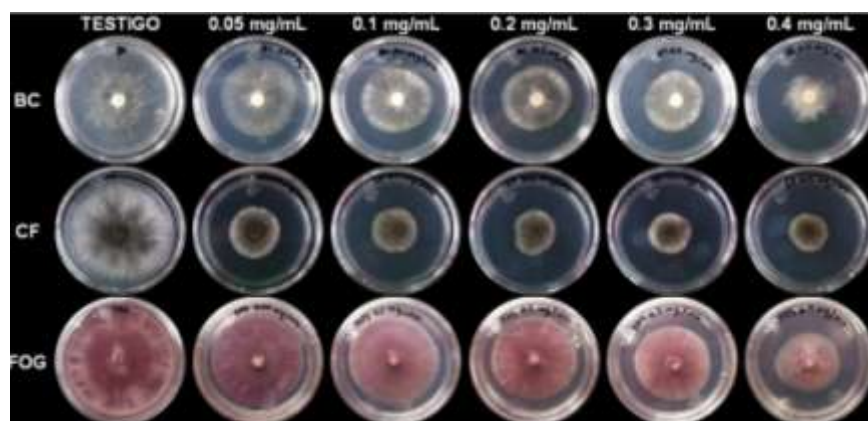


Fig. 21. Efecto del extracto seco de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL⁻¹) sobre el crecimiento de las colonias de *Botrytis cinerea* (BC), *Colletotrichum fragariae* (CF), y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG).

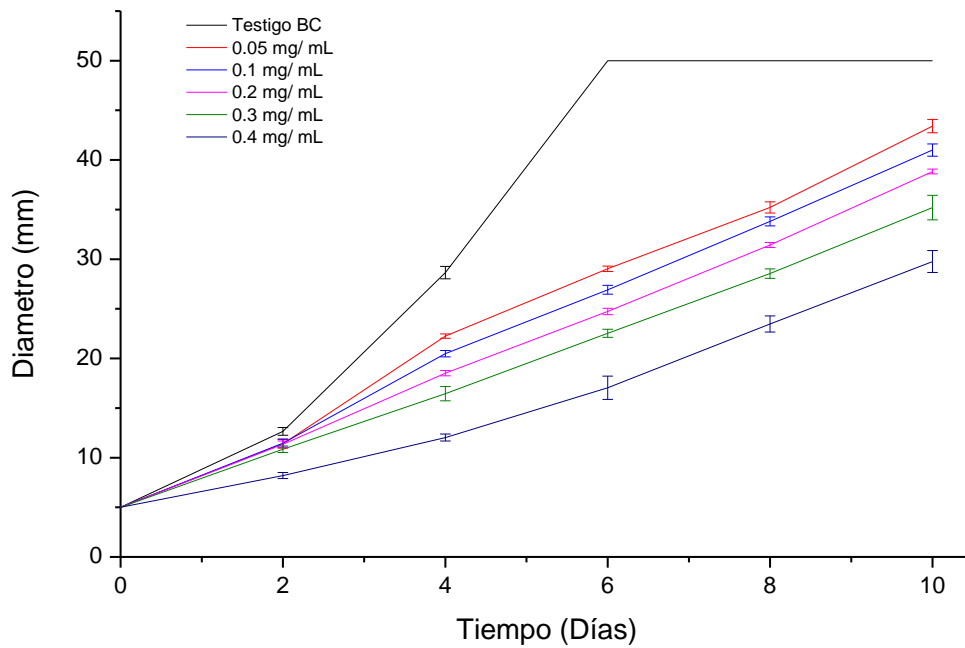


Fig. 22. Dinámica del crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* (BC) con extractos secos de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL⁻¹).

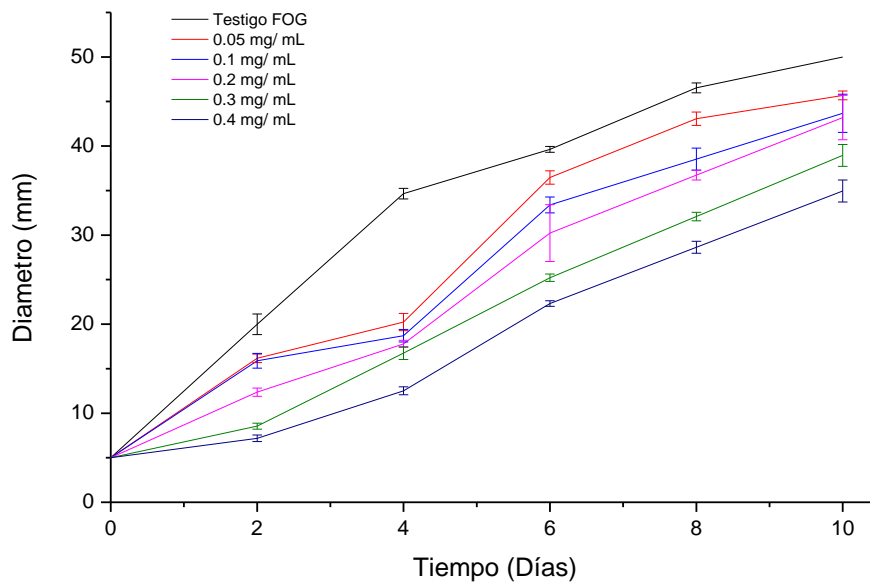


Fig. 23. Dinámica del crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) con extractos secos de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL⁻¹).

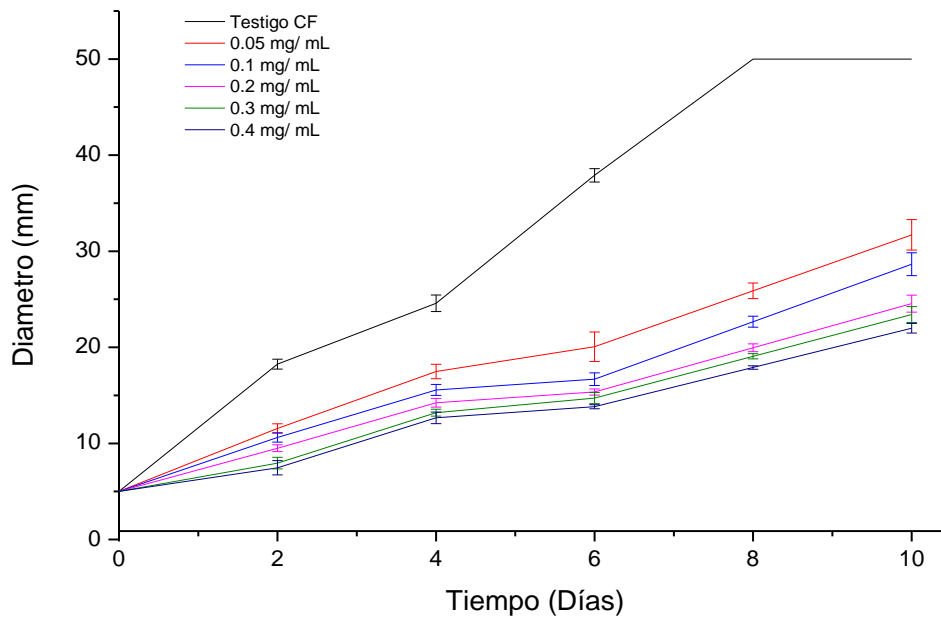


Fig. 24. Dinámica del crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum fragariae* (CF) con extractos secos de *P. fluorescens* a diferentes concentraciones (0.05 a 0.4 mg mL⁻¹).

Para las figuras 22, 23 y 24 se observa que existe una disminución en el crecimiento de los hongos, presentando mejor efectos de biocontrol en *C. fragariae*, posteriormente en *B. cinerea* y finalmente con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, sin embargo las etapas subsecuentes que se requieren para obtener el extracto crudo seco pueden ser la diferencia entre el uso de extractos libres de células y extractos secos.

5.6. Separación e identificación de los metabolitos producidos por *P. fluorescens*

La cromatografía en capa fina de los extractos crudos secos de *P. fluorescens* mostró la presencia de al menos cuatro compuestos, los cuales se compararon con los estándares de fenazina y fluoroglucinol (Cuadro 14 y Fig. 25), las lecturas observadas podrían indicar que el extracto crudo de *P. fluorescens* contiene al menos dos compuestos antifúngicos que pueden ser derivados de la fenazina y fluoroglucinol y pueden conferirle el carácter antifúngico.

Cuadro 14. Factores de retención (Rf) de extractos de *P. fluorescens* contra compuestos estándar.

Sustancia	Rf
Mancha 1	0.16
Mancha 2	0.26
Mancha 3	0.61
Mancha 4	0.80
Fenazina	0.61
Fluoroglucinol	0.17

Concentraciones de estándares (0.5 mg mL⁻¹) y el extracto crudo seco (1 mg mL⁻¹) Sistema Hexano: acetona (3:2). Revelados en UV.

La identificación de estos compuestos coincide con lo reportado por Keel *et al.* (1990); Georgakopoulos *et. al.* (1994); Chin-A-Woeng *et al.* (1998); quienes reportan que *P. fluorescens* produce una amplia gama de metabolitos secundarios, donde sobresalen antibióticos como las derivados de fluoroglucinol o derivados de la fenazina, los cuales presentan actividad antifúngica contra los distintos géneros de hongos fitopatógenos de este estudio.

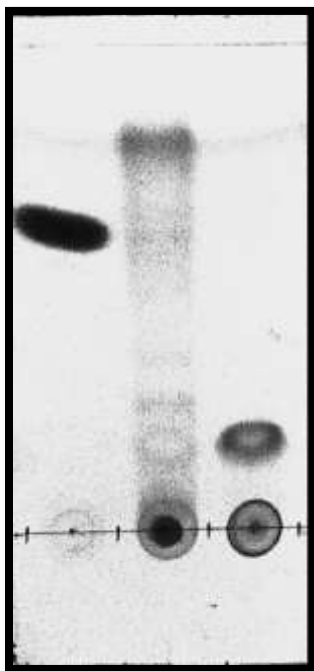


Fig. 25. Perfiles en cromatografía en capa fina (TLC) del extracto crudos seco (50 mL) de *P. fluorescens* y estándares de fluoroglucinol y fenazina (50 mL de 0.5 mg mL⁻¹). en un sistema de solventes hexano:acetona (3:2). La detección de los compuestos fue en UV.

Kavitha *et al.*, (2005) y Chin-A-Woeng *et al.* (1998, 2001), documentaron que la producción de fenazina por *P. fluorescens* es un factor determinante en el biocontrol, disminuyendo evidentemente el crecimiento de colonia de hongos como *F. oxysporum*; aunque los mecanismos de acción de las fenazinas son poco conocidos, se supone que se difunden a través de la membrana actuando como agente reductor, lo que conduce a la formación de superóxido (O₂), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) o radical hidroxilo (HO) que son tóxicos para las células, afectando la morfología de las hifas y acelerando el proceso de muerte (Hassett *et al.* 1992, Chin-A-Woeng *et al.* 2002). Respecto a la producción de derivados de fluoroglucinol como agente de control, de Souza *et al.* (2003) mencionan que estos compuestos actúan sobre la membrana plasmática de las células y en general provoca la desintegración del contenido celular, lo que deriva en daño a la morfología de las hifas y problemas de crecimiento.

VI. CONCLUSIONES

El agente de biocontrol se identificó a nivel género como *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens presentó un mayor desarrollo de biomasa en el medio donde la fuente de carbono fue glicerol, posteriormente glucosa adicionada con hierro y finalmente glucosa: valores de pH 6.0 y 7.0 fueron los mejores para el desarrollo de biomasa.

El ensayo *in vitro* con el extracto libre de células mostró un claro efecto antifúngico, destacando la mayor efectividad del extracto libre de células proveniente del cultivo en medio KB y pH 6.0.

Los resultados del ensayo *in vitro* con el extracto crudo seco mostraron que la actividad antifúngica se conserva después del proceso de separación y secado.

Los extractos libres de células y extractos secos mostraron mayor control sobre *Colletotrichum fragariae*, seguido de *Botrytis cinerea* y finalmente *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* identificando que el efecto de biocontrol es proporcional a la concentración o volumen utilizado.

El control *in vitro* puede estar relacionado a la producción de compuestos como fenazina y fluoroglucinol por parte de *P. fluorescens*.

VII. REFERENCIAS

- Agrios, G. 1998. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. pp. 838
- Aguado G.A., Moreno G.B., Jiménez F.B., García M.E. y Preciado O.E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una Síntesis. Revista Fitotecnia Mexicana. 35(1):9-21.
- Alemu Fekadu y Alemu Tesfaye. 2013. Antifungal activity of secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* isolates as a biocontrol agent of chocolate spot disease (*Botrytis fabae*) of faba bean in Ethiopia. African Journal of Microbiology Research. 7(4): 5364-5373.
- Alström S. 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant and Soil. 102:3-9
- Asghar H. y Pessarakli M. 2010. A Review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of biological sciences. 10(4):273-290.
- Ashrafuzzaman M., Farid Akhtar H., Razi I.M., Anamul H.Md., Zahurul M.I., Shahidullah S.M. y Sariah M. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology. 8(7):1247-1252.
- Ayyadurai N., Ravindra N.P., Sreehari R.M., Sunish K.R., Samrat S.K., Manohar M. y Sakthivel N. 2005. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. Journal of Applied Microbiology. 100:926–937.
- Baron S.S., Teranova G. y Rowe J.J. 1997. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. Current Microbiology 18: 223–230.
- Bakker A.W. y Schippers B. 1986. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp.* mediated plant growth-stimulation. AIMSSoil Biology & Biochemistry. 19(4):451-457.

- Bassler B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. 2:582–587.
- Battu P.R. y Reddy M.S. 2009. Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its Characterization. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2(1):26-29.
- Bhattacharya A. 2010. Siderophore mediated metal uptake by *Pseudomonas fluorescens* and its comparison to iron (III) chelation. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*. 39(2):147-155.
- Blunden G., Roch O. G., Rogers D.J., Coker R.D., Bradburn N. y John A. E. 1991. Mycotoxins in food. School of Pharmacy and Biomedical Sciences, Portsmouth Polytechnic, England, UK. *Medical Laboratory Sciences*. 48(4):271-282.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. 130-154.
- Bonnie H. O. Duffy B. K. y Weller D. M. 2003. Identification and Manipulation of Soil Properties to Improve the Biological Control Performance of Phenazine-Producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6):3333–3343.
- Braun-Kiewnick, A. y Sands, D.C. Gram-negative bacteria: *Pseudomonas*. In: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3. ed. St. Paul. The American Phytopathological Society, 2001. p. 84-120.
- Brisbane P.G., Janik L.J., Tate M.E. y Warren F.O. 1997. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (nrri b-15132). *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 31(12):1967-1971.
- Brucker R.M., Baylor C.M., Walters R.L., Lauer A., Harris R.N. y Minbioli K.P. 2008. The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology*. 34:39–43.

- Carrillo Leonor. 2003. Los Hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.html> (Fecha de consulta: 24/10/12)
- Chin-A-Woeng T., Bloemberg G. V., Van der Bijk., Van der Drift., Schripsema J., Kroon B., Scheffer R. J., Keel C., Bakker P., Tichy H., de Bruijn F., Thomas-Oates J. y Lugtenberg B. J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.11:1069–1077.
- Chin-A-Woeng T., Bloemberg G. V. y Lugtenberg B. 2002. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New phytologist*. 157:503–523.
- Chin-A-Woeng T., van den Broek D., de Voer G., van der Drift K.M.G., Tuinman S., Thomas-Oates J. E., Lugtenberg B. J. y Bloemberg G. V. 2001. Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 14:969-979.
- Clark B. L. 2004. Characterization of a catechol-type siderophore and the detection of a possible outer membrane receptor protein from *Rhizobium leguminosarum* strain IARI 312. *East Tenn. St. Univ*. 43:154-244.
- Compant S., Brion D., Jerzy N., Christophe C., y Essaïd A.B. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*. 71(9):4951–4959.
- Cook R. J., Thomashow L. S., Weller D. M., Fujimoto Debbie., Mazzola M., Bangera G. y Dal-soo Kim. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92:4197-4201.
- Courvalin, P., 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram positive and gram negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 38(7):1447–1451.

- Czernic Pierre, Chen Huang Hsiou y Marco Yves. 1996. Characterization of hsr201 and hsr515, two tobacco genes preferentially expressed during the hypersensitive reaction provoked by phytopathogenic bacteria. *Plant Molecular Biology* 31: 255-265.
- De la Rosa-García S.C., Muñoz-García A.A., Barahona-Pérez L.F. y Gamboa-Angulo M.M. 2007. Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatán peninsula. *Letters in Applied Microbiology*. 45:289-294.
- de Souza J.T., Arnould C., Deulvot C., Lemanceau P., Gianinazzi-Pearson V. y Raaijmakers J.M. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Biological control*. 93(8):966-975.
- Díaz de Villegas M. E., Villa P. y Frías A. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Revista latinoamericana de microbiología*. 44(3-4):112-117.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*, vol. 1. Academic Press, London.
- Escalante R. y Catalán H. 2008. Situación actual del sector agropecuario en México: perspectivas y retos. *Economía Informa* 350:7-25.
- Elad Y. and Shtienberg D. 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews* 1:15-29.
- FAO. 2000. Manejo Post-Cosecha. Disponible en: http://www.fao.org/sd/ruralradio/common/ecg/24516_es_post_harvest_management_sp_1_.pdf. (Fecha de modificación: 13/03/2014)
- FAO. 2009. Las pérdidas post-cosecha agravan el hambre. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/36864/icode/> (Fecha de consulta: 13/03/2014).
- FAO. 2012. Statistics. Food and Agricultural commodities production. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (fecha de consulta: 12/02/2014).

- Figuerola M., Zulema B., Guerrero A., Martín M., y Pons J. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:124-134.
- Filtenborg O., Frisvad J.C., y Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33: 5-102.
- García L.S., Velázquez E.L. y Bergvinson D.J. 2010. Diseñado por la naturaleza. Maíz resistente a plagas de almacén. Disponible en línea: <http://www.conacyt.gob.mx/Comunicacion/Revista/239/Articulos/MaizResistente/MaizResistente3.html> (Fecha de consulta: 12/03/2014)
- Georgakopoulos D., Henderson M., Panopoulos N.J. y Schroth M.N. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:2931–2938.
- Greenshields L.D, Guosheng L., Feng J., Selvaraj G. y Wei Y. 2007. The siderophore biosynthetic gene *sid1*, but not the ferroxidase gene *fet3*, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular Plant Pathology*. 8:411-421.
- Guerra G., Betancourth C. y Salazar C. 2011. Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens Migula* frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Schtdl en arveja *Pisum sativum* L. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2):33 – 42.
- Gunnell P.S. y Gubler W.D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*. 84:157-165.
- Hammerschmidt R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55:77-84.
- Harman G., Hayes K., Lorito M., Broadway M., Di Pietro A., Peterbauer C. y Tronsmo A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Molecular Plant Pathology*. 83(3):313-318.

- Hassett D.J., Charniga J.L., Bean K., Ohman D.E. y Cohen M.S. 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to Pyocyanin: Mechanisms of Resistance, Antioxidant Defenses, and Demonstration of a Manganese-Cofactored Superoxide Dismutase. *Infection and Immunity*. 60(2):328-336.
- Hernández A., Bautista S., Velázquez M. y Hernández A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades pos cosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(1):66-74.
- Jadhav R.S. y Desai A.J. 1992. Isolation and characterization of siderophore from *cowpea rhizobium* (Peanut Isolate). *Current Microbiology*. 24:137-141.
- James P.G., Bielinski M.S. y Timothy N.M. 2008. Performance of Methyl Bromide Alternatives in Strawberry. *Hortotechnology*. 18(1):80-83.
- Jelinek C.F., Pohland A.E. y Wood G.E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds Food and Drug Administration, Division of Contaminants Chemistry, Washington, DC 72(2):223-230.
- Kavitha, K., Mathiyazhagan, S., Sendhilvel, V., Nakkeeran, S., Chandrasekar, G., and Fernando, W.G.D. 2005. Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. *Arch. Phytopathol. Plant Protection*, 38: 69–76.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M. y Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophore produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886
- Keel C., Wirthner P., Oberhansli T., Voisard C., Haas D.B. y Defago G. 1990. Pseudomonads as antagonists of plant-pathogens in the rhizosphere role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root-rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327–341.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger P., Wirthner P., Haas D and Défago G. 1992. Suppression of root diseases of by *Pseudomonas fluorescens*

- CHA0: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interaction*. 5:4–13.
- Kitinoja L. y Kader A.A. 1996. Manual de prácticas de manejo poscosecha de los productos hortofrutícolas a pequeña escala. Departamento de pomología, universidad de california Davis, California. Disponible en línea: <http://www.fao.org/wairdocs/x5403s/x5403s00.htm>.
- Kojima Yuzo y Shimizu Sakayu. 2003. Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU3 80. *Journal of bioscience and bioengineering*. 96, (3):219-226.
- Latorre B., Rioja M. y Lillo C. 2002. Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e Investigación Agraria* 29(3):145-151.
- Lelliott R.A. y Stead D.E., 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. 1st Edn., Blackwell Scientific Publications, London, 10:216.
- Lemanceau P., Bakker P., Kogel W.J., Alabouvette C. y Schippers B. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied Environmental Microbiology* 58:2978–2982.
- Li Q., Jiang A.Y., Ning B.P., Zheng A.L., Huang A.J., Li A.G., Jiang A.D. y Tom Hsiang. 2011. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control*. 58:139–148.
- Llácer G., López M.M., Trapero A. y Bello A. 2000. Pp.139–148.
- Lubbe C., Denman S., Cannon P., Groenewald J.Z., Lamprecht S. y Crous P. 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. *Mycologia* 96(6):1268–1279.
- Lugtenberg B. y Kamilova F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *The Annual Review of Microbiology*, 63:541-556.

- Macagnan D., da Silva R.R., Mesquita de Macedo D.M.; Schurt D.A. 2006. Podridão-mole em pós-colheita de batata (*Solanum tuberosum*) incitada por *Pseudomonas viridiflava*. *Summa Phytopathologica*. 33(3):307-308.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. 2003. Brock Biología de los microorganismos, 10° ed. Southern Illinois University Carbondale, Pearson. pp: 368-371.
- Mavrodi O. V., Mavrodi D. V., Parejko J. A., Thomashow L. S. y Weller D. M. 2012. Irrigation Differentially Impacts Populations of Indigenous Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in the Rhizosphere of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(9):3214-3220.
- Manikandan R., Saravanakumar D., Rajendran L., Raguchander T. and Samiyappan M. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. 54:83–89.
- Mendoza C.B., Moreno M.N., Weil M. y Elango F. 2007. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el Crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Penz. & sacc. *Tierra tropical*. 3(1):81-89.
- Mestiza M.J. y Escalante R. 2003. Exportaciones hortofrutícolas mexicanas en el TLCAN: ¿Ventaja comparativa?, *Cuaderno de Desarrollo Rural*, 50:35-62.
- Moretti M., Gilardi. G., Gullino M. L. y Garibaldi A. 2008. Biological control potential of *Achromobacter xylosoxydans* for suppressing *Fusarium* wilt of Tomato. *International Journal of Botany*. 4(4):369-375.
- Nelson P.E., Toussoun T.A. y Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park.193pp
- OCDE. 2011. Análisis del extensionismo agrícola en México. París, Francia
- Oyoque G., Mena H., Olalde V. y Angoa M. 2011. Uso de Extractos de *Pseudomonas* sp (PB11) para el Control de la Mancha Bacteriana en tomate (*Solanum lycopersicum*). *Información tecnológica* 22(6):3-10.

- O'Sullivan D. y O'Gara F. 1992. Traits of Fluorescent *Pseudomonas spp.* Involved in Suppression of Plant Root Pathogens. *Microbiological Reviews*. 56(4):662-676.
- Pal K.K. y McSpadden B.G. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. Pp.1-25.
- Phillips D.J., Margosan D.A. y Mackey B.E. 1987. Size, nuclear number and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. *Ecology and epidemiology*. 77(11):1606-1608.
- Pierson L.S. III., Pierson EA. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiological Letters*. 136:101-108.
- Pierson L.S. III. y Thomashow L.S. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Molecular plant-microbe interactions*. 5(4):330-339.
- Pearson J.P., Pesci E.C. y Iglewski B.H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *Journal of Bacteriology*. 179(18):5756-5767.
- Ramyasmruthi S., Pallavi O., Pallavi S., Tilak K. y Srividya S. 2012. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from *Solanaceae* rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2(1):16-24.
- Ratledge C. y Dover L.G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Rodríguez M. Del P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zool. Mex nueva serie, Número especial* 1:53-78.
- Rubio S. V. y Fereres C. A. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC). Dpto. Protección Vegetal. 1-16.

- Sabaratnam S. y Traquair J. A. 2002. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control*. 23(3):245–253.
- Sarabia M., Madrigal R., Martínez M. y Carreón Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*. 12(1): 65-71.
- Schaad N.W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* 2nd Edition. Aps Press: St. Paul, Minnesota, USA. 164p.
- Serrano, L. y Galindo, E. 2007 Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. 58(1): 77-88.
- Slininger P.J. y Shea-Wilbur M.A. 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43:794-800.
- Sridevi M. y Mallaiah K.V. 2008. Production Of Hydroximate-Type Of Siderophores By *Rhizobium* Strains From *Sesbania Sesban* (L.) Merr. *International Journal Of Soil Science*. 3(1):28-34.
- Smith B.J. y Black L.L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant disease*. 74:69-76.
- Sommer N., Fortlage R. y Edwards D. 2002. Enfermedades Poscosecha de Productos Seleccionados. (Clara Pelayo-Zaldivar, Trans.) En Adel A. Kader., *Tecnología Poscosecha de Cultivos Hortofrutícolas*, pp. 227-286. California: Universidad de California Davis.
- Starr, M. S. 1983. *Phytopathogenic Bacteria*. En Starr, M S. H Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel [Ed.] *Selection from the prokaryotes: an handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Universidad de California, Davis. California, USA. Ed. Springer-Verlag: 742-763.

- Tjeerd van Rij. E., Wesselink M., Thomas F.C., Chin-A-Woeng., Bloemberg G.V. y Lugtenberg B. 2004 Influence of Environmental Conditions on the Production of Phenazine-1-Carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. The American Phytopathological Society. 17(5):557-566.
- Trigos A., Ramírez K. y Salinas A. 2008. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Revista Mexicana De Micología 28:125-129.
- Villa P., Frías A., y González G. 2009. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. Revista ICIDCA. 39(3):40-44.
- Villanueva Arce R., Yáñez-Morales María de J. y Hernández-Anguiano A. 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Agrociencia 42(6):89-701
- Wandersman C. y Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu. Rev. Microbiol. 58:611-647.
- Weller D. M. 2007. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. The American Phytopathological Society, 250-256.
- Whitehead N. A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J. y Salmond G.P. 2001. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev. 25:365-404.
- Wisniewski M. y Wilson C. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Recent Advances. Hortscience 27(2):94-98.
- Zhan Yuan., Song Cang., Motoko Matsupuji., Kuniho Nakata., Yasunori N. y Akihiro Yoshimoto. 1998. High Production of Pyoluteorin and 2,4-Diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 Grown on Ethanol as a Sole Carbon Source. Journal of Fermentation and Bioengineering. 86(6):559-563.