



TECNOLOGICO
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLOGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES Y LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS
INVOLUCRADAS EN EL SISTEMA DE DEFENSA DEL FRUTO DE AGUACATE
CV. HASS MEDIADO POR METABOLITOS BACTERIANOS**

TESIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA
MIRIAM DEL CARMEN BAÑUELOS GONZÁLEZ

DIRECTOR
DRA. MARTINA ALEJANDRA CHACÓN LÓPEZ

CO-DIRECTOR
DRA. SELENE AGUILERA AGUIRRE

Tepic, Nayarit

Diciembre 2019

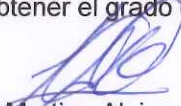


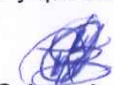
"2019. Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"


Tepic, Nayarit, **10/DICIEMBRE/2019**
CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 11-2019


M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis de la alumna **Miriam del Carmen Bañuelos González** con número de control **G10400234**, cuyo título es "**Análisis de la expresión de genes y la actividad de enzimas involucradas en el sistema de defensa del fruto de aguacate cv Hass mediado por metabolitos bacterianos**" a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.


Dra. Martina Alejandra Chacón López
(Presidente)


Dra. Selene Aguilera Aguirre
(Secretario)


Dr. Ulises Miguel López García
(Vocal)


Dra. Eugenia Montalvo González
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®


Dr. Ulises Miguel López García
Presidente del Consejo de Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente





"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Tepic, Nay., a 11 de Diciembre de 2019
DEPI-025-163-2019

**C. MIRIAM DEL CARMEN BAÑUELOS GONZÁLEZ
P R E S E N T E**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos Tecnológicos, dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de **Maestría en Ciencias en Alimentos** denominado **"Análisis de la expresión de genes y la actividad de enzimas involucradas en el sistema de defensa del fruto de aguacate cv Hass mediado por metabolitos bacterianos"**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la **Impresión** del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

**Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®**

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DIVISION DE EST. DE POSG. E INVEST.**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

agvl**



AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto.

A mi directora la DRA. Alejandra Chacón López, por todo el apoyo, dedicación, paciencia y tiempo que me brindó para llevar a cabo este proyecto.

A mi co-directora la DRA. Selene aguilera Aguirre, por su tiempo, disposición y amable manera de atender las dudas para la mejora de este proyecto.

Al Dr. Ulises López por su disposición para atender dudas durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigas del laboratorio Lilia, Tania y Gloria por sus valiosos consejos y todo su apoyo brindado tanto personal como profesional mientras realizaba el trabajo experimental y de redacción. A liz y moni y anita, por su amistad, disposición y todo su apoyo en momentos que el trabajo lo requería. A todas ellas por estar conmigo y motivarme para mejorar mi trabajo.

A mis compañer@s del laboratorio que con su ejemplo me motivaron para esforzarme y mejorar mi trabajo experimental.

A todas mis “carnaladas” del laboratorio, gracias por todo chicas, por los momentos de alegrías, su unión en las buenas y malas y por confiar en mi.

DEDICATORIAS

A DIOS por estar conmigo siempre y especialmente en los momentos difíciles durante el desarrollo experimental de este proyecto. Por hacer posible mi paso por esta etapa, por cuidarme y enseñarme a salir adelante a pesar de las circunstancias.

A esas personas especiales que les llamo mis ángeles, que me cuidan aquí en la tierra y siempre están conmigo en todo momento, enseñándome a esforzarme para mejorar, a tener esperanzas de que las cosas van a salir mejor. También por sus consejos para tener paciencia y no desesperarme.

A mis padres por siempre estar conmigo cuando los necesité, por todo su apoyo, esfuerzo y dedicación para enseñarme a ser una mejor persona. Por preocuparse por mi y compartir mis alegrías pero principalmente por creer en mi. Por acompañarme en momentos difíciles y hacerme entender con esa sencillez, que las cosas pueden salir mejor y no rendirme.

A mis hermanos por motivarme a ser mejor persona, por brindarme su ayuda en momentos necesarios y por creer en mí. A sus hijos, mis pequeños sobrinos que tanto quiero y que con su alegría y sus ideas, me hacían ver de diferente forma el mundo, por ser mis estrellitas que siempre iluminan mi vida.

A mis padres que me cuidan desde el cielo, gracias por todo su ejemplo de vida y el amor que me dieron.

RESUMEN

Bañuelos González Miriam del Carmen. M.C. en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Diciembre 2019. Análisis de la expresión de genes y la actividad de enzimas involucradas en el sistema de defensa del fruto de aguacate cv. Hass mediado por metabolitos bacterianos. Director: Dra. Alejandra Chacón López. Co-Director: Dra. Selene Aguilera Aguirre.

El aguacate es uno de los cultivos con gran importancia económica para México. Durante el 2018, se obtuvo una producción nacional de 2,186,376 ton. Sin embargo, la producción de este cultivo, puede presentar diversos problemas fitosanitarios, como es la antracnosis, cuyo agente causal es el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Dicha enfermedad genera grandes pérdidas económicas. Los fungicidas sintéticos son el método más utilizado para su control; sin embargo, el uso desmedido de éstos provoca daños al ambiente, la salud humana y generan resistencia por parte de los fitopatógenos. Es por ello que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control, tal es el caso del empleo de rizobacterias PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), destacando el género *Bacillus* ssp. Dentro de sus estrategias de biocontrol se encuentra la capacidad de inducción del sistema de defensa en plantas. Recientemente, se reportó que la cepa *Bacillus atropheus* produce metabolitos capaces de reducir la severidad e incidencia de la antracnosis en frutos de guanábana y aguacate. Por lo cual se propuso que los metabolitos bacterianos son capaces de inducir el sistema de defensa en frutos. El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de los metabolitos bacterianos producidos por *B. atropheus* B5, sobre la inducción del sistema de defensa de frutos de aguacate cv. Hass contra *C. gloeosporioides*. Para el desarrollo de este proyecto, se realizó la evaluación *in vivo* del efecto de metabolitos producidos por *B. atropheus* sobre la severidad e incidencia de la enfermedad en frutos de aguacate monitoreando el desarrollo de la enfermedad durante los días 0, 1, 3, 6 y 9 post-inoculación con *C. gloeosporioides*. Adicionalmente, se evaluó la actividad de enzimas involucradas en el sistema de defensa del fruto, tratado con los metabolitos y retados con *C. gloeosporioides*. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significancia del 95% y se compararon las medias utilizando una prueba LSD Fisher. Por otra parte, mediante RT-PCR se analizó la expresión de genes que se ha reportado participan en el sistema de defensa vegetal, tales como *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD* a los tiempos 0, 30, 60 y 120 min post-inoculación del patógeno. De acuerdo a los resultados obtenidos, el sobrenadante bacteriano tuvo la capacidad de reducir la severidad e incidencia de la antracnosis en un 64.19% y 50% respectivamente, al día 9 después de haber sido inoculados con el patógeno. En los frutos que fueron tratados con el sobrenadante bacteriano se observó inducción de los genes bajo estudio, principalmente en los tiempos 0 y 60 min. Se propone que el mecanismo de defensa predominante es mediante la Resistencia Sistémica Inducida (ISR). Por otra parte, las actividades enzimáticas de la POD y PPO, se vieron incrementadas, siendo más significativas en los días 1 y 9 con un aumento entre 2 y 3 veces más aproximadamente, en comparación con el control. A partir de las actividades enzimáticas y la inducción de genes específicos involucrados en el mecanismo de defensa, se puede concluir que los metabolitos bacterianos están ejerciendo una inducción de la resistencia del fruto de aguacate contra *C. gloeosporioides*, lo cual sustenta el uso de *B. atropheus* B5 proyectándola como una bacteria efectiva en el control de la antracnosis en este fruto.

Palabras clave: Antracnosis, Rizobacterias, metabolitos bacterianos, Resistencia sistémica inducida.

ABSTRACT

Bañuelos González Miriam del Carmen. M.C. en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. December, 2019. Analysis of gene expression and enzyme activity involved in the defense system of Hass avocado fruit mediated by bacterial metabolites. Director: PhD. Alejandra Chacón López. Co-Director: PhD. Selene Aguilera Aguirre.

The avocado is one of the crops with great economic importance for Mexico. During 2018, a national production of 2,184,663.13 tons was obtained. However, the production of this crop has several phytosanitary risks, such as anthracnose, whose causative agent is the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. This disease generates great economic losses. Synthetic fungicides are the most used method for their control; however, an extensive use of them cause environment damage, human health and generate resistance by the phytopathogens. For this reason, studies for new control alternatives are necessary, such is the use of rhizobacteria PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), highlighting the genus *Bacillus* spp. One of their biocontrol strategies is the induction of the plant defense system. Recently, it was reported that *B. atropaeus* strains produce metabolites capable of reducing the severity and incidence of anthracnose in soursoy and avocado fruits. Therefore, it was proposed that bacterial metabolites are able of inducing the defense system on fruits. The objective of this research was to analyze the effect of bacterial metabolites produced by *B. atropaeus* B5, on the induction of defense system of Hass avocado fruit against *C. gloeosporioides*. During this study, it was evaluated the effect of metabolites produced by *B. atropaeus* on the severity and disease incidence in avocado fruits *in vivo*, evaluating the disease development during 0, 1, 3, 6 and 9 days post-inoculation with *C. gloeosporioides*. Additionally, enzymes activity involved in the defense system of the fruit, treated with metabolites and challenged with *C. gloeosporioides* was evaluated. Results were analyzed by an ANOVA with a level of significance of 95% and the means were compared using a LSD Fisher test. On the other hand, the expression of genes, such as *NPR1*, *PAL*, *EIN3* and *POD* were analyzed by RT-PCR at 0, 30, 60 and 120 min post-pathogen-inoculation. According to our results, the bacterial supernatant reduced the severity and incidence of anthracnose by 64.19% and 50% respectively, at the day 9 after pathogen-inoculation. Fruits treated with the bacterial supernatant, showed a gene induction, mainly at 0 and 60 min. According too this, we proposed that the predominant defense mechanism is the Systemic Resistance induction. On the other hand, enzymatic activities of POD and PPO were increased, being more significant on 1 and 9 days and increasing at 2 and 3 times more, compared with the control. It has been reported that some metabolites produced by *Bacillus* strains can trigger the defense mechanisms in plants making them more resistant to pathogens. From the enzymatic activities and the induction of specific genes involved in the defense mechanism, it can be concluded that bacterial metabolites are exerting an induction of the resistance of the avocado fruit against *C. gloeosporioides*, which supports the use of *B. atropaeus* B5 as an effective bacterium in the control of anthracnose disease during postharvest.

Key words: Anthracnose, Rhizobacteria, Bacterial metabolites, Induced Systemic Resistance

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades del aguacate	5
2.2 Producción nacional de aguacate	5
2.3 Problemas fitosanitarios en el cultivo de aguacate	6
2.4 Antracnosis en el fruto de aguacate por <i>C. gloeosporioides</i>	7
2.5 Control de enfermedades fúngicas en frutos	7
2.6 Control biológico antifúngico en postcosecha	8
2.7 Criterios de selección de un microorganismo antagonista.....	9
2.8 Bacterias rizosféricas	10
2.9 Características del género <i>Bacillus sp.</i>	12
2.10 Activación del sistema de defensa vegetal por agentes microbianos de biocontrol antifúngico en postcosecha	13
2.10.1 Inducción de la resistencia vegetal	13
2.10.2 Resistencia sistémica adquirida e inducida en sistemas vegetales	15
2.10.3 Mecanismo general de la ISR	17
2.11 Aplicación de las PGPR en cultivos de importancia agroalimentaria.....	19
2.12 Las PGPRs aplicadas durante la postcosecha	19

Eliminó:

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	23
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	25
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1 Material biológico	29
6.1.1 Material vegetal	29
6.1.2 Cepa bacteriana	29
6.1.3 Cepa fúngica	29
6.2 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del sobrenadante bacteriano en frutos de aguacate en el desarrollo de la enfermedad causada por <i>C. gloeosporioides</i>	30
6.2.1 Preparación del inóculo fúngico	30
6.2.2 Obtención del sobrenadante bacteriano	30
6.2.3 Desinfección de los frutos de aguacate bajo estudio	30
6.2.4 Tratamiento de los frutos de aguacate	33
6.2.5 Inoculación del patógeno en los frutos de aguacate	33
6.2.6 Análisis de la severidad e incidencia de la antracnosis en el aguacate.....	33
6.2.7 Análisis de la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa	34
6.2.7.1 Obtención de rna total para los ensayos de expresión genética.....	35
6.2.7.2 Tratamiento del RNA con DNasa I	36
6.2.7.3 Cuantificación del RNA	37
6.2.7.4 Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR	37
6.2.7.4.1 Síntesis del cDNA	37
6.2.7.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
6.2.8 Ensayos de actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa en el fruto de aguacate.....	39

6.2.8.1 Obtención del extracto crudo	39
6.2.8.2 Determinación del contenido de proteína en el extracto enzimático	39
6.2.8.3 Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)	40
6.2.8.4 Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa (POD)	40
6.2.9 Diseño estadístico	42
6.2.9.1 Análisis de la actividad enzimática	42
6.2.10 Análisis estadístico	42
CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Efecto <i>in vivo</i> del sobrenadante bacteriano de <i>B. atropaeus</i> B5 sobre la severidad e incidencia de la antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de aguacate Hass.	44
7.2 Análisis de la expresión de genes involucrados en el sistema de defensa....	48
7.2.2 Análisis de la expresión de genes <i>NPR1</i> , <i>PAL</i> , <i>EIN3</i> y <i>POD</i> , mediante transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)	50
7.3 Efecto del sobrenadante bacteriano de <i>B. atropaeus</i> B5 sobre la actividad enzimática de la PPO y POD en frutos de aguacate	58
7.3.1 Evaluación de la actividad enzimática PPO	59
7.3.2 Evaluación de la actividad enzimática POD	62
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO IX. PERSPECTIVAS	72
CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA	76

Eliminó:

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. 1. Antagonistas microbianos usados para el control de enfermedades postcosecha.	9
Cuadro 6. 1. Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión genética.	35
Cuadro 7. 1. Actividad específica de la Polifenol oxidasa (PPO).	62
Cuadro 7. 2. Actividad específica de la enzima Peroxidasa (POD).	<u>65</u>

Eliminó:

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1. SAR inducida por patógenos y vías de transducción de señal ISR mediada por rizobacterias.....	16
Figura 6. 1. Frutos empleados para los ensayos de severidad e incidencia y actividad enzimática.....	32
Figura 7. 1. Efecto in vivo de los metabolitos bacterianos de <i>B. atropaeus</i> B5 sobre la antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de aguacate cv. Hass.....	45
Figura 7. 2. Electroforesis del RNA total de muestras.....	49
Figura 7. 3. Tratamiento de las muestras obtenidas de RNA's con DNasa I.....	50
Figura 7. 4. Verificación de la amplificación genética a partir de cDNA obtenido.....	51
Figura 7. 5. Expresión de los genes <i>NPR1</i> , <i>PAL</i> , <i>EIN3</i> , <i>POD</i> y <i>ACT</i>	52
Figura 7. 6. Curva estándar BSA para la determinación del contenido de proteína.....	59
Figura 7. 7. Efecto de los metabolitos bacterianos contenidos en el SOB de la cepa <i>B. atropaeus</i> B5 sobre la actividad específica de la PPO.....	61
Figura 7. 8. Efecto de los metabolitos bacterianos contenidos en el SOB de la cepa <i>B. atropaeus</i> B5 sobre la actividad específica de la POD.....	64

Eliminó:

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana*) es un cultivo de gran importancia económica para nuestro país; tan sólo para el 2018, se registró una producción 2, 184,663.13 ton. Los estados que más han contribuido en la producción de aguacate son Michoacán, Jalisco, Ciudad de México, Nayarit y Morelos (SIAP, 2018).

La producción de este cultivo es amenazada por diversos factores, entre ellos se encuentra el ataque de organismos fitopatógenos los cuales son responsables de grandes pérdidas económicas. Dentro de los fitopatógenos que afectan al aguacate se encuentra el hongo, *Colletotrichum spp.*, que es el agente causal de la antracnosis (Paull y cols, 1997; Awang *et al.*, 2011). Este hongo es un patógeno importante ya que causa pérdidas de los cultivos en todo el mundo, tal es el caso del cultivo de aguacate (Benito y Prusky., 2000; Agrios, 2004; Cannon *et al.*, 2012; Hyde *et al.*, 2009, 2014).

La manera de controlar los daños ocasionados por los hongos fitopatógenos es mediante el empleo de fungicidas sintéticos, los cuales son aplicados en los huertos o bien, durante la postcosecha. Estos compuestos provocan contaminación ambiental, presentando en ocasiones un largo periodo de degradación, daños en la salud y la generación de la resistencia en los patógenos (Panebianco *et al.*, 2015; Vitale *et al.*, 2016).

Debido a la creciente necesidad de consumir productos más saludables, seguros y reducir la contaminación ambiental que implica su producción, se han desarrollado políticas regulatorias más estrictas y la búsqueda de nuevas estrategias ecológicas como alternativas para el control fúngico (Liu *et al.*, 2013). Tal es el caso del empleo de agentes de biocontrol o control biológico que implica el uso de un proceso biológico o el producto del mismo (Pedapati *et al.*, 2015).

Las bacterias rizosféricas o rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, han sido usadas como agentes de biocontrol. Se incluyen en éstas, géneros bacterianos diversos como *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aconetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Arora, 2015; Goswami *et al.*, 2016). Se han descrito diferentes mecanismos en el control biológico como la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, el parasitismo, así como la inducción de la resistencia en los frutos (Barkai, 2001; Droby *et al.*, 2002; El-Ghaouth *et al.*, 2004).

Se ha reportado que la resistencia sistémica inducida (ISR) es un proceso en el cual las plantas, mediante estímulos bióticos, se acondicionan para resistir al ataque de los fitopatógenos (Choudhary *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2013). Después de que la planta percibe a la molécula de señalización denominada “elicitor”, se activan las vías de transducción de señales que generalmente conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), fitoalexinas, el refuerzo de la pared celular de la planta con compuestos como fenilpropanoides, la deposición de calosa, la síntesis de enzimas de defensa y la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), algunas de las cuales presentan actividad antimicrobiana (Van Loon y Van Strien, 1999; Madhusudhan *et al.*, 2008; Aryal *et al.*, 2011; Thakur y Sohal, 2013).

Se ha reportado que los metabolitos bacterianos son capaces de inducir el sistema de defensa en plantas (De Veesschauwer y Hofte, 2009; Cawoy *et al.*, 2014; Pieterse *et al.*, 2016; Kulimushi *et al.*, 2017). De acuerdo con esto, en el presente estudio se evaluó el efecto que provocan los metabolitos producidos por bacterias rizosféricas, sobre la inducción de la resistencia sistémica en frutos de aguacate cv. Hass frente al patógeno *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del aguacate

El aguacate (*Persea americana*) es originario de América y pertenece a la familia de las Lauráceas. El fruto puede presentar variaciones en su forma dependiendo la raza (Bernal y Díaz, 2005). Se han determinado 3 razas de aguacate; Mexicana, Guatemalteca y Antillana.

Los frutos de aguacate Hass se encuentran dentro de la raza Guatemalteca y es una de las especies más importantes que se produce en el campo mexicano junto con la variedad Criollo y Fuerte (SIAP, 2016).

El aguacate es rico en proteínas y grasas con un contenido de aceite que va de 10-20% el cual, una vez procesado puede emplearse en la industria cosmética y farmacéutica (SIAP, 2016). La pulpa y el aceite son ricos en ácidos grasos monoinsaturados, principalmente ácido oleico. Contiene vitaminas A, C, D, E, K, B1, B2, B6, niacina, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico, además de minerales como calcio, hierro, fósforo, sodio, potasio, magnesio, manganeso, cobre, azufre y cloro (Bergh, 1992; Frias, 1994; Maldonado *et al.*, 2007).

2.2 Producción nacional de aguacate

El cultivo de aguacate tiene gran importancia económica para el país, el cual se encuentra dentro de los principales productores y exportadores a nivel mundial. Durante el 2018, se registró una superficie sembrada de 231,524.02 ha y una producción obtenida de 2,184,663.13 ton, con una estimación en el aporte monetario de aproximadamente 41,908,121.26 de pesos (SIAP, 2018). Entre los estados que más contribuyen en la producción de aguacate mexicano son

Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit y Morelos (SIAP, 2018). El aguacate es comercializado internacionalmente a mercados como Estados Unidos, Japón, Canadá, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Francia, Guatemala, España, China, Países Bajos, Hong Kong, Reino Unido, Alemania, Singapur y Bélgica (SENASICA, 2017).

2.3 Problemas fitosanitarios en el cultivo de aguacate

Existen más de 800 especies de hongos fitopatógenos que infectan a uno o más tipos de plantas, incluso de diferentes familias. Existen 10 principales hongos fitopatógenos en términos de importancia científico/económica que son: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia spp.*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum spp.*, *Ustilago maydis*, *Melampsora lini*, entre otros (Dean *et al.*, 2012). Su clasificación puede ser en base a los órganos de la planta que infectan, fruto, vasos conductores del tallo y el sistema radical (Sandoval, 2004). En el fruto de aguacate uno de los hongos de mayor importancia es *C. gloeosporioides* el cual causa la enfermedad denominada antracnosis; los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por el hundimiento necrosado del tejido donde se producen masas de conidios dentro de un acérvulo (Freeman *et al.*, 2000). En frutos infectados aparecen manchas circulares de color café oscuro durante la maduración, así como también durante su almacenamiento (Pruski *et al.*, 2000; Pruski *et al.*, 2001).

2.4 Antracnosis en el fruto de aguacate por *C. gloeosporioides*

La enfermedad antracnosis afecta el 20% de la producción de aguacate y en algunas huertas, la calidad se ve reducida hasta en 60%. Esta enfermedad afecta al fruto cuando se encuentra en el árbol, durante su traslado, maduración, almacenamiento y comercialización. Adicionalmente la enfermedad afecta hojas, flores y ramas, disminuyendo la capacidad fotosintética del árbol (INIFAP, 2017). Cuando la enfermedad tiene lugar en las flores, éstas se tornan oscuras, se marchitan y se caen, en las hojas se presenta como manchas de color café (SAGARPA, 2015).

C. gloeosporioides es un patógeno que puede permanecer latente, produce un apresorio que penetra en el fruto de aguacate, provocando la degradación de la cutícula y produciendo una hifa subcuticular que se desarrolla hasta que las condiciones del entorno son adecuadas (Benó y Prusky., 2000). La enfermedad en el fruto de aguacate se hace evidente con la presencia de manchas circulares color café oscuras en el epicarpio, daños por el ablandamiento y la pudrición de la pulpa o mesocarpio (Yakoby *et al.*, 2000; Prusky *et al.*, 2001).

Este problema fitosanitario es crítico pues el fruto de aguacate es exportado a diferentes países y debe cumplir con normas internacionales.

2.5 Control de enfermedades fúngicas en frutos

Los fungicidas sintéticos representan el método más utilizado para el control de enfermedades fúngicas. Estos productos son aplicados durante la precosecha y postcosecha; sin embargo, provocan contaminación ambiental y tienen un largo período de degradación (Tripathi y Dubey, 2004). Además, el continuo uso de fungicidas químicos han provocado la resistencia de los patógenos (Tripathi y

Dubey, 2004; Panebianco *et al.*, 2015; Vitale *et al.*, 2016). El uso de estos productos representa un peligro toxicológico para la salud humana por su posible residualidad en los productos agroalimentarios.

Existe una creciente necesidad de consumir productos más saludables y seguros, esto ha propiciado una disminución del uso de productos químicos potencialmente dañinos, razón por la cual se han desarrollado políticas regulatorias más estrictas y la búsqueda de nuevas estrategias ecológicas como alternativas para el control fúngico (Liu *et al.*, 2013). De esta manera se ha implementado el uso de agentes de biocontrol como un sistema integral para el control de enfermedades (Spadaro y Guillino., 2004).

2.6 Control biológico antifúngico en postcosecha

El control biológico mediante el empleo organismos antagónicos implica el uso de un proceso biológico o el producto del mismo (Pedapati *et al.*, 2015), como el empleo de levaduras y bacterias, lo cual ha sido una alternativa al uso de fungicidas sintéticos (Janisiewicz y Korsten, 2002; Korsten, 2006). Los agentes bacterianos de biocontrol más empleados y estudiados pertenecen a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y al grupo de las *Actinomicetos*, los cuales desempeñan un papel importante contra los fitopatógenos (Shanu *et al.*, 2016).

La aplicación de antagonistas para el control biológico en frutas y hortalizas es un método útil y práctico en etapa postcosecha. El tratamiento puede ser en forma de aerosol o por inmersión (Barkai, 2001; Irtwange, 2006).

Se han publicado varias investigaciones con aplicaciones de antagonistas microbianos para el control de enfermedades en etapa postcosecha para diversos frutos; algunos de estos trabajos se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2. 1. Antagonistas microbianos usados para el control de enfermedades postcosecha.

Antagonista	Enfermedad (Patógeno)	Frutas/Vegetales	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	Pudrición marrón (<i>Botrytis cinerea</i>)	Cereza	Utkhede y Sholberg (1986)
	Pudrición del tallo (<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.)	Aguacate	Demoz y Korsten (2006)
	Moho verde (<i>Penicillium digitatum</i>)	Cítricos	Singh y Deverall (1984)
	Pudrición (<i>Alternaria alternata</i>)	Melón	Yang cols. (2006)
<i>B. pumilus</i>	Moho verde (<i>B. cinerea</i>)	Pera	Mari y cols. (1996)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Antracnosis (<i>C. musae</i>)	Banana	Costa y Erabadupitiya (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Moho gris (<i>B. mali</i> Ruehle)	Manzana	Mikani y cols. (2008)
<i>P. syringae</i>	Moho Azul (<i>P. expansum</i>)	Manzana	Janisiewicz (1988), Zhou <i>et al.</i> , (2002)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Pudrición de la corona (<i>C. musae</i>)	Banana	Costa y Subasinghe (1998)

2.7 Criterios de selección de un microorganismo antagonista

Para la selección de un antagonista microbiano, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones; a) debe ser genéticamente estable, b) eficaz a bajas concentraciones, c) sus requerimientos nutricionales no deben ser exigentes, d) capaz de sobrevivir bajo condiciones adversas, e) eficaz contra un rango amplio

de patógenos, f) resistente a pesticidas, g) no debe producir metabolitos nocivos para el ser humano, h) no debe ser patógeno en el hospedador, i) puede ser almacenado y dispensado, j) compatible con tratamientos físicos y químicos, debe tener una ventaja adaptativa sobre patógenos específicos (Wilson y Wisniewski, 1989). Por ejemplo, en el caso del patógeno *Rhizopus stolonifer* que es más sensible a baja temperatura en comparación con otros patógenos, su antagonista microbiano debe ser capaz de crecer, multiplicarse y suprimir al patógeno a baja temperatura. (Wilson y Wisniewski, 1989). De acuerdo con esto, es necesario llevar a cabo la búsqueda y estudio de los microorganismos con potencial biocontrolador. Hay reportes de que las bacterias rizosféricas tienen potencial de ser aplicadas como agentes biocontroladores (Goswami *et al.*, 2016).

2.8 Bacterias rizosféricas

A la porción de suelo influenciada por raíces de las plantas, se denomina rizosfera (Hartmann *et al.*, 2008), en la cual se produce el intercambio de compuestos, nutrientes y la comunicación química entre la planta y los microorganismos presentes del suelo (Peiffer *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2016).

En la rizósfera habitan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Kloepper y schroth., 1978). Las PGPR incluyen géneros bacterianos diversos como *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aconetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *serratia* (Arora, 2015; Goswami *et al.*, 2016).

Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas directamente, facilitando la adquisición de nutrientes, incluyendo elementos como nitrógeno, fósforo y hierro, (Calvo *et al.*, 2017). Adicionalmente modulan los niveles de fitohormonas, como la

síntesis auxinas, citoquininas y giberelinas (Bhattacharyya *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2017). Además, inciden en la disminución de los niveles del etileno al sintetizar la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa que escinde el compuesto ACC precursor inmediato del etileno en plantas superiores (Glick, 1995; Glick, 2012).

Algunas PGPR han sido usadas como agentes de biocontrol ya que indirectamente, disminuyen los daños en las plantas después de la infección con un patógeno (Compant *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2008; Santoyo *et al.*, 2012; Santoyo *et al.*, 2016). Esto lo llevan a cabo a través de la síntesis y excreción de antibióticos, proteasas, quitinasas, bacteriocinas, sideróforos, lipopéptidos (Iturina A, Bacilomicina D y Micosubtilina) (Leclère *et al.*, 2005; Santoyo *et al.*, 2012; Glick, 2012; Hernández *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2014). Además, al competir por nutrientes y espacio, limitan el crecimiento del patógeno. Por otro lado se ha reportado que propician en el hospedero, el mecanismo de resistencia sistémica inducida (ISR) contra algunas bacterias, hongos y virus, lo cual implica las rutas de señalización de a través de jasmonato y etileno dentro de la planta, donde estas hormonas estimulan las respuestas de defensa de la planta (Glick, 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009). La síntesis de metabolitos antifúngicos como HCN, fenazinas, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, pyoluteorin y lipopéptidos entre otros, son uno de los principales modos de acción de control biológico (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Bhattacharyya y Jha., 2012). Así mismo las bacterias rizosféricas producen metabolitos secundarios capaces de inducir el sistema de defensa vegetal, sin embargo, los mecanismo por el cual esto se lleva a cabo no están completamente dilucidados, particularmente en lo que se refiere a los frutos durante la postcosecha. En este sentido, se ha sugerido la inducción del sistema de defensa en el fruto de aguacate mediada por metabolitos bacterianos producidos por el género *Bacillus* (Guardado *et al.*, 2017).

2.9 Características del género *Bacillus* sp.

En la rizósfera se pueden encontrar distribuidas especies de bacterias del género *Bacillus*. Estas bacterias presentan una alta tolerancia térmica, crecen rápido en cultivos líquidos, forman esporas que son resistentes a tratamientos térmicos y químicos como desecación, calor, radiación UV, a los disolventes orgánicos y algunas son capaces de producir biofilm (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Cepas de *Bacillus* expresan actividades que suprimen a los patógenos o promueven el crecimiento de las plantas, mediante tres mecanismos principales; I) Antagonismo de plagas y patógenos, II) Promoción de la nutrición y crecimiento del hospedador, III) Estimulación de la defensa del hospedador (Devendra y Bhavdish, 2009).

Se ha reportado que cepas de *Bacillus* producen lipopéptidos (LP) biosurfactantes de surfactina, iturina y familias de fengicina (Gudiña *et al.*, 2015; Paraszkiwicz, 2016). La surfactina muestra propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y desencadena la formación de biopelículas que es esencial para la colonización en las raíces (Fan *et al.*, 2011). La Iturina y fengicina muestra una actividad antifúngica contra una amplia gama de levaduras y hongos filamentosos; además, se han identificado como compuestos de inducción del ISR en plantas hospederas (Cawoy *et al.*, 2014; Kulimushi *et al.*, 2017).

Recientemente se realizó un estudio donde se aisló *B. licheniformis* (MH48) de la rizósfera y se observó que el 50% de la concentración del filtrado del cultivo bacteriano libre de células de esta cepa, mostró actividad antifúngica significativa contra *Rhizoctonia solani*, *C. gloeosporioides* y *Phytophthora capsici*. En el filtrado se identificó el ácido benzoico, el cual transformó la morfología del *C. gloeosporioides*, inhibió la germinación de los conidios y degradó el micelio de *R. solani* (Jeong *et al.*, 2017).

En otro estudio, se evaluó la actividad antifúngica de los metabolitos contenidos en el sobrenadante, producto del cultivo de la cepa de *B. atrophaeus* B5. El sobrenadante redujo la severidad e incidencia de la antracnosis, enfermedad causada por *C. gloeosporioides* en frutos de guanábana y aguacate. Esta bacteria alberga genes implicados en la producción de antibióticos como surfactina, bacilomicina e iturina, sugiriendo que estos compuestos participaron en el biocontrol del hongo en los frutos (Guardado *et al.*, 2017).

Se han descrito posibles mecanismos de control biológico en frutos durante la postcosecha como pueden ser; competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, parasitismo, la interacción directa con el patógeno y la inducción de la resistencia (Droby *et al.*, 2002; Barkai, 2001; El-Ghaouth *et al.*, 2004). La presente investigación se centra en el biocontrol basado en la inducción de la resistencia del sistema vegetal.

2.10 Activación del sistema de defensa vegetal por agentes microbianos de biocontrol antifúngico en postcosecha

2.10.1 Inducción de la resistencia vegetal

La pared celular o la cutícula de las plantas, dificultan la entrada de diferentes fitopatógenos e impiden su ingreso al citoplasma celular, siendo este mecanismo de importancia para el control de los patógenos biotróficos (Mauch y Slusarenko., 1993). Las barreras químicas presentan un mecanismo de defensa que involucra cambios bioquímicos inducidos después de la interacción de un microorganismo patogénico por una vía de reconocimiento realizada por una molécula, denominada elicitor, en la interacción planta-patógeno (Ebel y Cosio, 1994). Durante esta interacción se pueden sintetizar fitoalexinas, se fortalece la pared celular y existe la producción de proteínas antifúngicas (Jackson y Taylor, 1996). La acumulación

de fitoalexinas sintetizadas por la planta permite la deposición de componentes fenólicos, lignina o calosa, incrementa la actividad de las proteínas relacionadas con la patogénesis, como las que presentan actividad hidrolítica (quitinasas y glucanasas) y respuesta de hipersensibilidad (HR), con lo cual se reduce el crecimiento del patógeno (Trouvelot, 2008).

La acumulación de fitoalexinas incluye la síntesis de proteínas y compuestos fenólicos que refuerzan la pared celular y la producción de un conjunto de proteínas denominadas PRs, que son proteínas de defensa relacionadas con la patogénesis, ya que actúan en la percepción del patógeno y generación de la señal que es convertida y transmitida en el orden de activación de respuesta (Conejero, 1996). Las proteínas PR se clasifican en 17 familias de acuerdo a sus propiedades y funciones que incluyen β -1,3 glucanasas, quitinasas, proteínas similares a la traumatina, peroxidasas, proteínas de defensa inactivadoras de ribosomas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos no específicas, oxalato oxidasa y proteínas de tipo oxalato-oxidasa (Van Loon y Van Strien, 1990).

Al estar en contacto el patógeno con la planta, se desencadena un sistema de comunicación molecular con la inducción de mecanismo de defensa en la planta (Desender *et al.*, 2007). Los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), son moléculas presentes en el patógeno que inducen la respuesta defensiva en la planta (Mackey y McFall., 2006; Jones y Dang, 2006). Algunos ejemplos de PAMPs pueden ser flagelina, lipopolisacáridos o peptidoglicanos de bacterias Gram-negativas o componentes de paredes de células fúngicas como glucano o quitosano (Jones y Dangl, 2006). Los PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones de superficie celular distintos que activan las respuestas inmunitarias basales o innatas, lo que se denomina como inmunidad desencadenada por PAMPs (Jones y Dangl, 2006). En las células vegetales se desencadenan cambios como variaciones en el potencial de

membrana, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación de lípidos y fosforilación de proteínas, que alteran la fisiología celular y generan la resistencia local o sistémica (Desender *et al.*, 2007).

2.10.2 Resistencia sistémica adquirida e inducida en sistemas vegetales

Las plantas son capaces de desarrollar una mejor capacidad de resistencia frente al ataque de patógenos cuando se encuentran bajo estímulos ambientales específicos. Las dos formas de resistencia son llamadas resistencia sistémica adquirida (SAR) e ISR en la cual las plantas mediante estímulos bióticos a través de una infección y/o tratamiento previo, se acondicionan para resistir cuando son atacadas por fitopatógenos. Tanto la ISR como SAR en su modo de acción, activan rutas bioquímicas diferentes que se les asocia con los mecanismos de defensa (Riveros, 2010).

Estas dos formas de resistencia ISR y SAR, son inducidas por “elicitors”. Estas activan diferentes moléculas intermediarias en forma de cascada para la formación de una red de vías de señalización interconectadas, que regularán la defensa inducida en la planta contra patógenos (Choudhary *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2013) (Figura 2.1).

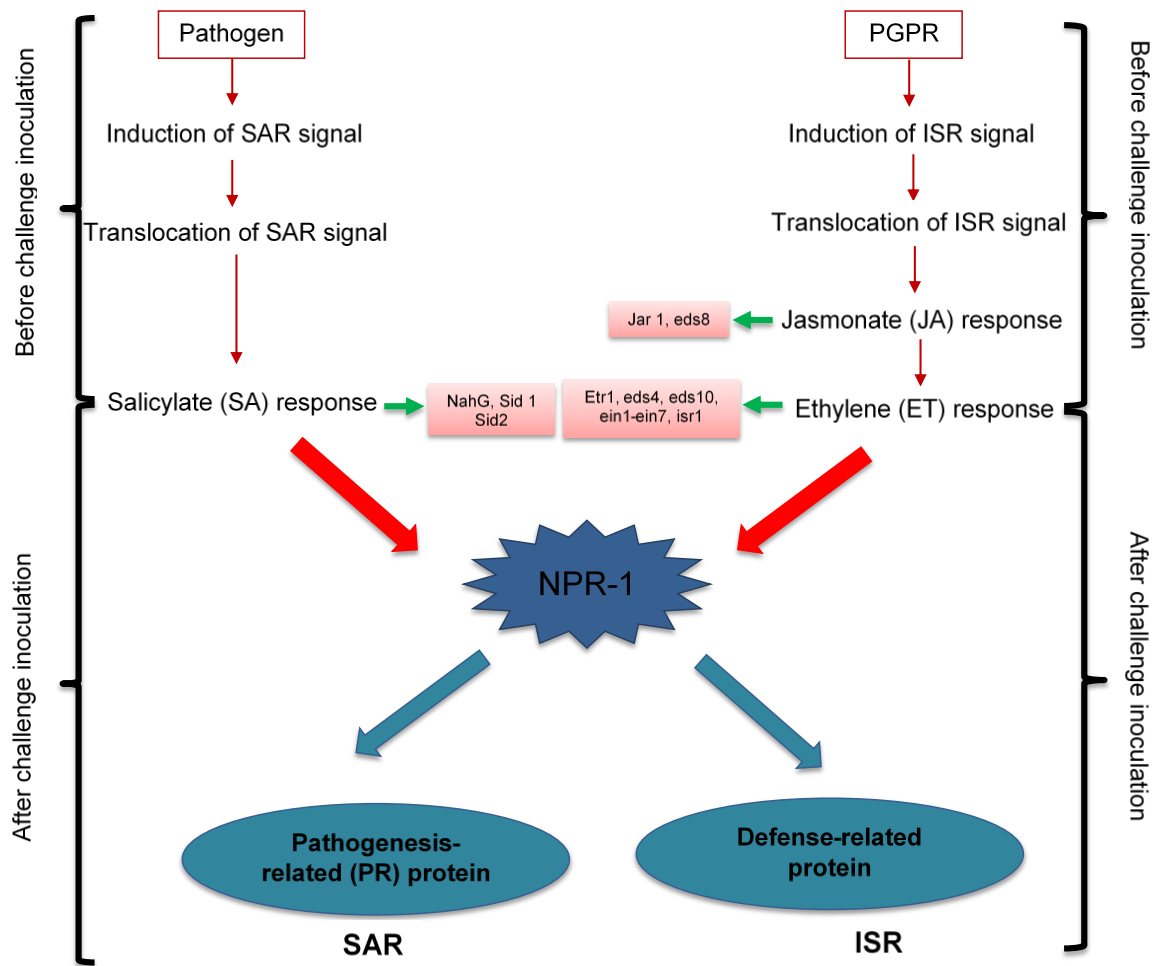


Figura 2. 1. SAR inducida por patógenos y vías de transducción de señal ISR mediada por rizobacterias. Tomada de Jain *et al.*, 2014.

La inducción de la SAR implica la exposición de la planta a microbios virulentos, avirulentos y no patógenos, requiere un periodo de tiempo específico para su establecimiento dependiendo del tipo de planta y elicitor. Esta vía es dependiente de ácido salicílico (SA) y se acumulan proteínas PRs (Choudhary *et al.*, 2007)

La inducción de la ISR es desencadenada por las PGPR, no implica la acumulación de proteínas PR y se basa en las vías reguladas por el Jasmonato (JA) y el etileno (ET) (Pieterse *et al.*, 2001; Yan Z *et al.*, 2002; Choudhary *et al.*, 2007).

Estudios realizados de PGPR implican una variedad de señales implicadas que incluyen proteínas, lípidos, lipopéptidos cíclicos (CLPs), carbohidratos y metabolitos secundarios que se asocian con la activación de la ISR (De Vleesschauwer y Hofte, 2009).

Aunque las surfactinas y fengicinas se han estudiado por su actividad de antibiosis, se ha sugerido que puedan inducir la ISR en diferentes sistemas vegetales como son melon, frijol, tabaco y tomate (Cawoy *et al.*, 2014; García *et al.*, 2013; Henry *et al.*, 2011; KyungSeok *et al.*, 2013; Ongena *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2014). Se ha reportado que la capacidad de inducción de la ISR está correlacionada con la producción de fengicina en cepas de *Bacillus* (Cawoy *et al.*, 2014).

La resistencia inducida puede ser activada por varias sustancias, previniendo o retrasando la entrada o la actividad del patógeno en los tejidos de la planta (Abdel *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014). Varios agentes pueden inducir la producción de “signos” en tejidos de la planta, desencadenando reacciones que terminan en una protección duradera contra una amplia gama de patógenos (Graham y Myers, 2011).

2.10.3 Mecanismo general de la ISR

En la ISR, el inductor activa la resistencia en la planta a partir de células ubicadas a distancia, enviando señales bioquímicas que alertan en forma sistémica a todos los tejidos de la planta, conocido como “*priming*” (Goellner y Conrath, 2008; Conrath *et al.*, 2002). El tejido donde se desarrolla la ISR debe contar con algún grado de predisposición a la defensa para que la inducción se generalice rápidamente, lo cual es evidenciado mediante la expresión sistémica de las proteínas PRs para ciertas formas de ISR (Van Loon, 1997).

Después de que la planta percibe al “elicitador”, se activan las vías de transducción de señales que generalmente conducen a la producción de ROS, fitoalexinas, el refuerzo de la pared celular con compuestos fenilpropanoides, deposición de calosa, síntesis de enzimas de defensa y la acumulación de PRs, algunas de las cuales presentan actividad antimicrobiana (Madhusudhan *et al.*, 2008; Aryal *et al.*, 2011; Thakur y Sohal., 2013). Las ROS conducen a la respuesta de hipersensibilidad (HR) en las plantas lo cual provoca la muerte rápida de una o pocas células en el sitio de infección para delimitar el crecimiento del patógeno (Agrios, 2005). La fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima clave que da como resultado la regulación de la biosíntesis de fenoles que conduce a la acumulación de lignina y fitoalexinas induciendo así la resistencia a la enfermedad (Abhayashree *et al.*, 2016). Las enzimas oxidorreductasas como las peroxidasas (POD), relacionadas con la defensa y la Polifenol oxidasa (PPO), están involucradas en la formación de barreras físicas como lignina y la producción de especies reactivas de oxígeno, que tras el ataque por patógenos actúan como antimicrobianos (Li y Steffens, 2002; Ramamoorthy *et al.*, 2002).

Se ha sugerido que las PRs como la β -1,3 glucanasa y la quitinasa, están implicadas en la resistencia de las plantas frente al ataque por diversos hongos fitopatógenos mediante la degradación de la pared celular del hongo lo que conduce a la lisis celular (Lebeda *et al.*, 2001; Mahesh *et al.*, 2017). Estas dos enzimas hidrolíticas son abundantes en muchas especies de plantas después de la infección por diferentes patógenos al degradar la pared celular en las cuales la quitina y el β -1,3 glucano son los componentes estructurales principales. Las β -1,3 glucanasas parecen expresarse coordinadamente junto con las quitinasas después de la infección por hongos. Así como también proteínas activas de la lisozima o proteínas de refuerzo de la pared celular tales como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Ebrahim *et al.*, 2011).

A partir de los avances en la investigación de la ISR en plantas, han surgido algunos productos comerciales con buena eficiencia, estabilidad y menor impacto en el medio ambiente, los cuales pueden aumentar la productividad de los cultivos y reducir pérdidas causadas por fitopatógenos además de aumentar el crecimiento vegetal (Farouk y Osman, 2011).

2.11 Aplicación de las PGPR en cultivos de importancia agroalimentaria

Existen diversos trabajos donde se han aplicado bacterias PGPR en diferentes sistemas vegetales. Se ha reportado la reducción del daño en el tejido causado por *B. cinérea* en células de *Vitis vinífera* con la aplicación de rizobacterias no patogénicas de *P. fluorescens* CHA0, *P. fluorescens* WCS417 y *P. aeruginosa* 7NSK2, por la acumulación de fitoalexinas (resveratrol y viniferina) mediante la inducción de ISR (Verhagen *et al.*, 2009). Por otra parte, la cepa bacteriana *B. amyloliquefaciens* SQRT3 aislada de la rizósfera de plantas de jitomate, mostró una inhibición del crecimiento *in vitro* de *R. solanacearum* causante de la marchitez bacteriana en tomate, mismo que se demostró en condiciones de invernadero. Se propuso como uno de los posibles mecanismos de supresión del patógeno a la inducción de la ISR (Li *et al.*, 2017).

2.12 Las PGPRS aplicadas durante la postcosecha

En lo que respecta a la postcosecha, poco se ha estudiado sobre la ISR mediada por bacterias antagonistas.

Rajaofera *et al.*, evaluaron el extracto crudo antimicrobiano obtenido de la cepa *B. atropheus* HAB-5, sobre frutos de mango fue efectivo para reducir la incidencia de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* al no mostrar síntomas de la

enfermedad 5 días pos inoculación. En otro estudio se reportó que los metabolitos contenidos en el sobrenadante libre de células de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015, específicamente Iturina A y Fengicina C sobre frutos de tamarillo en etapa poscosecha, redujeron el 76% de los síntomas de la antracnosis causada por *C. acutatum* (Arroyave *et al.*, 2017).

En un estudio realizado, se probó el efecto de supresión del moho verde causado por *Penicillium digitatum* después de la aplicación de *B. subtilis* ABS-S14 en frutos de mandarina en etapa postcosecha. Se evaluó la capacidad para elicitar la acumulación de enzimas relacionadas con la defensa, tales como Peroxidasa (POD) y L-fenilalanina amonio liasa (PAL), tras la aplicación de endosporas de la cepa ABS-S14, el extracto crudo del medio de cultivo y lipopéptidos cíclicos (CLPs) obtenidos de esta cepa y otro tratamiento evaluado fue con quitosano. El extracto crudo mostró efecto antifúngico tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que se le atribuyó a la presencia de iturinas y fengicinas. Además, el extracto crudo y el quitosano mostraron un aumento significativo en la vida de anaquel la fruta, así mismo se demostró que el extracto crudo de *B. subtilis* ABS-S14 en combinación con el quitosano, indujo las actividades de la POD y PAL en tejidos infectados (Waewthongrak *et al.*, 2014).

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado un cepa de *B. atrophaeus* B5, la cual produce metabolitos antifúngicos contenidos en el sobrenadante del cultivo bacteriano. Estos metabolitos son capaces de reducir la severidad y la incidencia de la enfermedad causada por *Colletotrichum sp.*, sobre frutos de aguacate y guanábana, con lo cual se ha sugerido que los metabolitos bacterianos producidos por esta cepa, son capaces de inducir el sistema de defensa en frutos, tema central en el desarrollo de esta investigación (Guardado *et al.*, 2017).

A pesar de contar con estos estudios, hasta el momento poco se sabe sobre los mecanismos de resistencia que pudieran desencadenarse al tratar los frutos con

los metabolitos bacterianos, lo cual abre nuevas oportunidades de estudio en estos sistemas biológicos.

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de aguacate tiene gran importancia económica para el país, pero al igual que otros cultivos, se encuentra amenazado por el ataque de diversos microorganismos como son los hongos fitopatógenos, los cuales provocan grandes pérdidas económicas durante la etapa de postcosecha. Una manera de controlar estos fitopatógenos, es mediante el empleo de compuestos fúngicos sintéticos, los cuales provocan daños al ambiente, a la salud humana y su aplicación indiscriminada ha propiciado la generación de resistencia por parte de estos patógenos.

Debido a la necesidad de disminuir el empleo de estos compuestos químicos, se ha buscado el desarrollo de nuevas alternativas de control fúngico y una de ellas es mediante el empleo de metabolitos secundarios de microorganismos antagonistas, como es el caso de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*. Estas bacterias provienen de la rizósfera de las plantas y sus metabolitos pueden actuar como inductores del sistema de defensa vegetal por mecanismos poco conocidos. Por lo tanto, el presente estudio se enfoca en el estudio de la actividad inductora de los metabolitos producidos por la cepa de *B. atropheus* B5, analizando la actividad de enzimas y la expresión de genes involucrados en el sistema de defensa inducido en el fruto de aguacate cv. Hass frente al ataque de *C. gloeosporioides*. Con esto se pretende generar conocimiento que sustente el empleo de los metabolitos de *B. atropheus* B5 como una alternativa viable en la reducción de la antracnosis en aguacate.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Los metabolitos bacterianos producidos por de *B. atropaeus* B5 activarán la expresión de genes y modificarán la actividad de enzimas involucradas en la resistencia sistémica inducida en frutos de aguacate cv. Hass durante la postcosecha, haciendo al fruto más resistente a la infección por el hongo *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto de los metabolitos bacterianos producidos por *Bacillus atrophaeus* sobre la inducción del sistema de defensa de frutos de aguacate cv. Hass contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

5.2 Objetivos específicos

Obtener y aplicar los metabolitos bacterianos producidos por la cepa *Bacillus atrophaeus* en frutos de aguacate cv. Hass en etapa postcosecha.

Evaluar la expresión de los genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD* involucrados en el sistema de defensa de frutos de aguacate tratados con metabolitos bacterianos de *B. atrophaeus* y retados con *C. gloeosporioides*.

Evaluar la actividad de enzimas Polifenol oxidasa (PPO) y Peroxidasa (POD) involucradas en el sistema de defensa de frutos tratados con metabolitos bacterianos y retados con *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Material vegetal

Para el desarrollo de la presente investigación, se utilizaron frutos de aguacate (*Persea americana*) cv. Hass en estado de madurez fisiológica, provenientes del estado de Michoacán, México. Los frutos se transportaron al LIIA en el Instituto Tecnológico de Tepic.

6.1.2 Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa de *B. atropaeus* B5 para la producción de los metabolitos bacterianos. Esta cepa fue reactivada en medio King B (KB) sólido y posteriormente se incubó a 25 °C durante 24 h.

6.1.3 Cepa fúngica

Para evaluar el efecto inductor de los metabolitos bacterianos, se utilizó la cepa fúngica reactivada *C. gloeosporioides* aislado de frutos de aguacate.

6.2 Evaluación *in vivo* del efecto del sobrenadante bacteriano en frutos de aguacate en el desarrollo de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides*.

6.2.1 Preparación del inóculo fúngico

A una caja de petri con el hongo crecido durante 7 días, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril y se recuperó el micelio del hongo con ayuda de una varilla de vidrio. La suspensión de micelio se filtró a través de una gasa estéril para la obtención de las esporas. Se contó el número de esporas presentes con ayuda de una cámara de Neubauer y se visualizó en microscopio óptico. Se preparó una suspensión de esporas conteniendo 1×10^6 esporas/mL para la infección de los frutos.

6.2.2 Obtención del sobrenadante bacteriano

A partir de un preinóculo bacteriano crecido durante 24h, alcanzando una densidad óptica de 0.01 a una longitud de onda de 600 nm, se inocularon 1.7mL del preinóculo en 1500mL de medio King (KB). El medio de cultivo se incubó a 25°C durante 24h con agitación constante. El cultivo bacteriano fue centrifugado 3 veces a 11,000 rpm durante 3 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue almacenado a 4°C hasta su uso.

6.2.3 Desinfección de los frutos de aguacate bajo estudio

Para ser tratados con el sobrenadante bacteriano los frutos de aguacate fueron lavados con agua corriente y posterior a esto, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante 1 min. Transcurrido el tiempo de la

desinfección, se lavaron con agua de consumo para eliminar cualquier residuo de la solución. Se dejaron secar los frutos para su posterior tratamiento.

Se trabajaron dos lotes distintos de frutos, tal como se muestra en la Figura 6.1. El primer lote compuesto por 45 frutos, se usó para los análisis de severidad, incidencia y actividad enzimática, a partir de los cuales se tomaron muestras y se llevaron a cabo mediciones a los 0, 1, 3, 6 y 9 días. El segundo lote integrado por 36 frutos, se usó para el análisis genético, tomando muestra a los tiempos 0, 30, 60 y 120 min. A su vez, ambos lotes de frutos se dividieron en tres grupos:

Grupo 1: frutos tratados con el sobrenadante e inoculados con el patógeno.

Grupo 2: frutos control. Tratados con medio KB líquido e inoculados con el patógeno.

Grupo 3: frutos control. Únicamente inoculados con el patógeno.

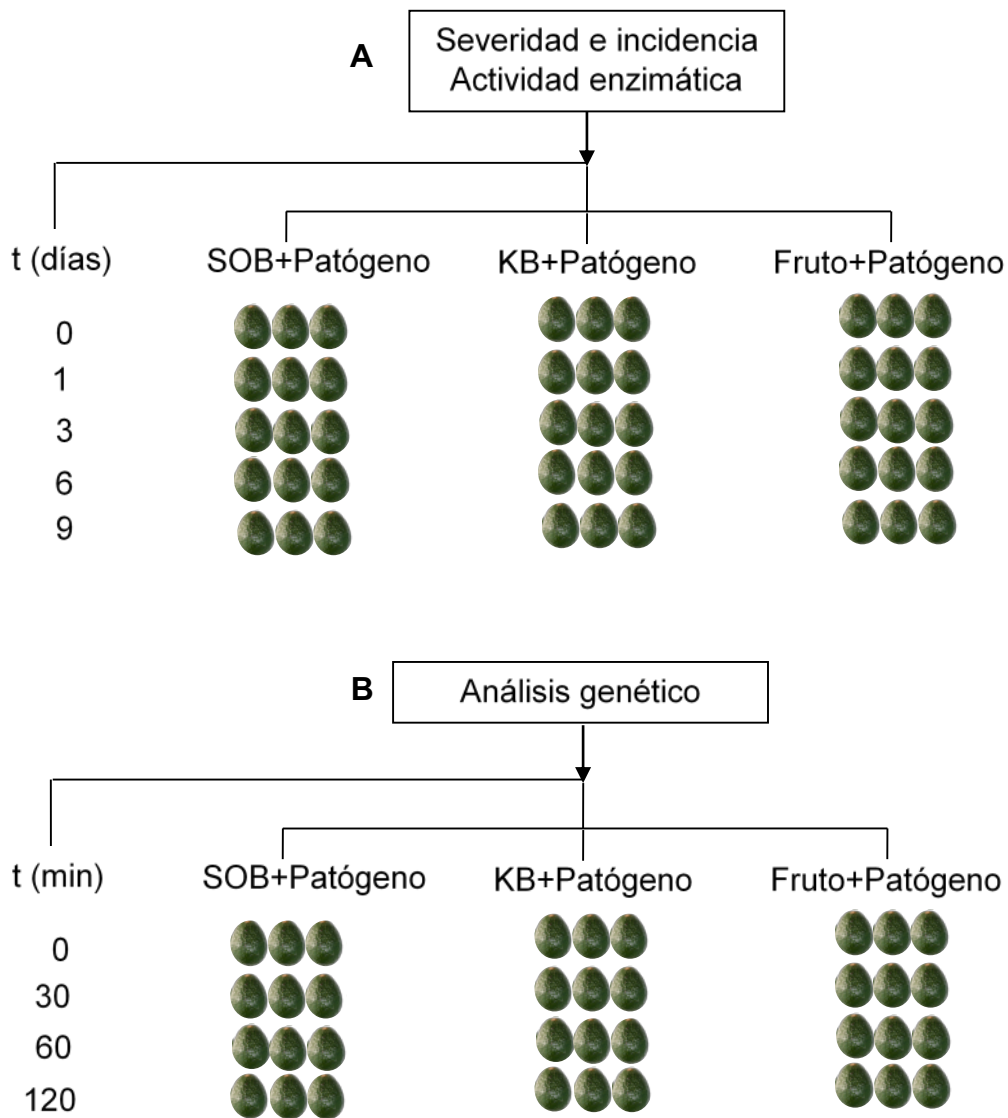


Figura 6. 1. Frutos empleados para los ensayos de severidad e incidencia y actividad enzimática. (A) frutos empleados para obtener las muestras para el análisis enzimático; (B) frutos empleados para obtener las muestras para el análisis genético.

6.2.4 Tratamiento de los frutos de aguacate

Una vez desinfectados, los frutos fueron sumergidos durante 1 min en las soluciones correspondientes a los tratamientos, los cuales consistieron en: a) Medio KB líquido como tratamiento control y b) sobrenadante bacteriano. Se dejaron secar los frutos durante 2h.

6.2.5 Inoculación del patógeno en los frutos de aguacate

Transcurrido el tiempo de inducción (2h) con el sobrenadante bacteriano, los frutos se inocularon con el patógeno, para lo cual se les realizaron heridas con ayuda de un punzón estéril. En cada herida se colocaron 20 μL de la suspensión de esporas del patógeno a una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Los frutos se almacenaron a 25°C por 9 días durante los cuales se obtuvieron muestras para el análisis enzimático. Se determinó la efectividad de los metabolitos bacterianos a través de la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad.

Para el análisis de la expresión de genes, se tomaron muestras de los frutos tratados con el sobrenadante bacteriano (SOB) y los respectivos controles a los tiempos de 0, 30, 60 y 120 min post-tratamiento, después de la infección con el patógeno.

6.2.6 Análisis de la severidad e incidencia de la antracnosis en el aguacate

Una vez que los frutos fueron inoculados se almacenaron a 25°C. Se monitoreó el desarrollo de la enfermedad por 9 días, haciendo las mediciones a los días 0, 1, 3, 6 y 9. Se midió el diámetro de la lesión desarrollada y se calculó el % de severidad utilizando la ecuación propuesta por Hernández *et al.*, (2007) (Ecuación 1).

$$\% \textit{ Severidad} = \frac{DLC}{DLA} * 100$$

Ecuación 1

En donde:

DLA: Diámetro promedio de las lesiones de las heridas en el fruto control.

DLC: Diámetro promedio de las lesiones en las heridas en el fruto tratado.

en donde el Diámetro de la lesión= Diámetro de la zona afectada-Diámetro de la herida.

Para el análisis de la incidencia de la enfermedad, se registró el número de heridas inoculadas con el patógeno que desarrollaron la enfermedad y se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 2).

$$\% \textit{ de incidencia} = \frac{\textit{no.de heridas infectadas}}{\textit{no.de heridas totales}} * 100$$

Ecuación 2

6.2.7 Análisis de la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa

Para determinar la inducción del sistema de defensa en frutos tratados con el SOB, se llevó a cabo un análisis de la expresión de genes que se ha reportado que participan en el sistema de defensa vegetal. Se evaluó la expresión mediante análisis semicuantitativo (RT-PCR) de los genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD*, los cuales sirven como marcadores para predecir la inducción global del sistema de defensa del fruto. Como control de expresión constitutiva se evaluó el gen de actina. Los oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión se muestran en la Cuadro 6.1.

Cuadro 6. 1. Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión genética.

Oligo	Nombre	Secuencia	pb	%GC	tm	pb
NPR1	F S34	GTGGAAAGGTGAGACA GCCGCCTG	24	62.5	64.7	450
	R S35	CGACATCATCAGAATCA AGAGCCCTG	26	50	61.8	
PAL	F S38	CCTTGCACTTGTCAACG GCACTG	23	56.5	61.3	600
	R S39	GCTCCCTTGAACCCATA ATCCAAGC	25	52	61.8	
EIN3	F S40	GCAATCTCAAGAACAGG CTCGACG	24	54.2	61	520
	R S41	CGCAGTGAGGACGCTC ACCTTC	22	63.6	60.7	
POD	F S46	GACTGTGCTGTCCAGTC ATGTGATGC	26	53.8	61.6	390
	R S47	CCAACACTGTGAGCTCC TAGAAGGG	25	56	59.3	
Actina	F S58	CCAAAAGCCAACAGGGA GAAGATGAC	26	50	62	597
	R S59	ATCAGCAATGCCTGGGA ACATGG	23	52.2	61.6	

6.2.7.1 Obtención de rna total para los ensayos de expresión genética

La extracción de RNA total se realizó mediante el reactivo TRIzol[®] Reagent, de acuerdo a la siguiente metodología.

En un mortero estéril se trituraron de 200-350 mg de pulpa, la cual fue tomada en uno de los extremos contrarios al área peduncular y distante del sitio de infección, se colocó en tubo estéril y se le adicionó 1mL del reactivo TRIzol[®], se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente durante 5min. Se añadieron 0.2mL de

cloroformo y se homogenizó hasta formar una sola fase. Se incubó a temperatura ambiente durante 3min y se centrifugó a 11000 rpm/4°C/15 min. La parte acuosa fue recuperada en un nuevo tubo, adicionaron 0.5 mL de isopropanol frío. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 11000 rpm/4°C/10 min. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75%, se agitó suavemente en vortex. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm/4°C/5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 4min. La muestra de RNA se disolvió en 30 μ L de agua libre de RNasas, se incubó durante 15 min entre 55-60°C y finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

Análisis de integridad y pureza de las muestras de RNA

Para verificar la integridad del RNA total obtenido, éste se visualizó en geles de agarosa al 1% mediante electroforesis a 75V. El RNA fue teñido utilizando el colorante Gel Red, y se visualizó mediante un transiluminador adaptado a un equipo fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

6.2.7.2 Tratamiento del RNA con DNasa I

Para llevar a cabo el análisis de expresión de genes es necesario que el RNA obtenido se encuentre libre de DNA. Para esto se utilizó la enzima DNase I, Amplification Grade (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y de acuerdo al siguiente protocolo:

Para la mezcla de reacción se tomó 1 μ L del RNA total, 1 μ L 10X DNase 1 Reaction Buffer, 1 μ L DNase I Amplification Grade 1U/ μ L y agua DEPC hasta completar un volumen total de 10 μ L. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente

durante 15min. Para la inactivación de la enzima, se adicionó 1 μ L de EDTA 25mM y se incubó 10min a 65°C.

Para verificar la integridad de las muestras de RNA total tratado con DNasa, las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% a 75V. El RNA se tiñó utilizando el colorante Gel Red, y se visualizó mediante un transiluminador con luz ultravioleta adaptado a un equipo fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

6.2.7.3 Cuantificación del RNA

La Cuantificación se llevó a cabo en un equipo Genoma-nano usando una longitud de onda de 260 nm. Para verificar la pureza del RNA obtenido se tomó en cuenta la relación de absorbancias 260/230 nm y 260/280 nm. Una vez verificada la integridad y la concentración del RNA se procedió a llevar a cabo los análisis de expresión genética mediante la técnica de RT-PCR.

6.2.7.4 Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR

6.2.7.4.1 Síntesis del cDNA

Para realizar la Transcripción Reversa (RT), se utilizó RNA purificado libre de DNA, usando la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen®), de acuerdo a las especificaciones del proveedor y usando los oligonucleótidos previamente diseñados. El procedimiento fue el siguiente:

Se realizó una mezcla con los siguientes componentes; 0.5 μ L oligonucleótido dT₂₀, 100ng RNA tratado con DNasa I, 0.5 μ L dNTP's 10 mM y agua libre de nucleasas. La mezcla fue incubada a 65°C durante 5 min. Transcurrido el tiempo,

se colocó en hielo de 2-3 min y después la mezcla se centrifugó brevemente. Se preparó una segunda mezcla conteniendo 2 μL 5X First-Strand Buffer, 0.5 μL DTT 0.1M, 0.5 μL RNase OUT (40U/ μL) y 0.5 μL SSIII-RT (200 U/ μL). Esta mezcla se adicionó a la anterior y se incubó a 55°C durante 50min. Finalmente, para inactivar la enzima se incubó a 70°C durante 15min. El cDNA obtenido fue usado como molde para la amplificación de los genes específicos *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD* mediante PCR.

6.2.7.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los PCR's se llevaron a cabo usando la enzima DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific®), conforme a las especificaciones del proveedor.

Brevemente en un tubo se realizó la mezcla de reacción con los siguientes componentes: 7.0 μL Agua desionizada, 1 μL 10X DreamTaq Buffer, 0.2 μL dNTPs' 10 mM, 0.25 μL oligo Forward 10 μM y Reverse 10 μM , 100ng cDNA y 0.25 μL DreamTaq DNA Polymerase. La reacción de PCR se llevó a cabo a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de [94°C durante 30s, 60°C durante 30s, 72°C durante 30s] y finalmente 72°C durante 10 min.

En las reacciones de PCR realizadas para cada gen, incluyeron controles negativos, los cuales fueron; componentes de la mezcla de reacción de PCR sin cDNA y componentes de la mezcla de reacción de PCR más RNA tratado con DNasa I para descartar posible contaminación con DNA y así asegurar la amplificación a partir de cDNA obtenido.

Para verificar el nivel de amplificación de cada gen bajo estudio, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% de acuerdo a las condiciones antes mencionadas.

6.2.8 Ensayos de actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa en el fruto de aguacate

Se determinó la actividad de la POD y PPO. Para ello se obtuvieron los extractos crudos a partir de los frutos bajo los diferentes tratamientos.

6.2.8.1 Obtención del extracto crudo

La obtención del extracto crudo, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Wang y cols. (2011) con algunas modificaciones.

En un mortero se trituraron 2 g de pulpa de aguacate con 0.2 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), utilizando nitrógeno líquido. Las muestras se homogenizaron con 10mL de buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 6.4 a 4°C. La mezcla se centrifugó a 11,000 rpm durante 15min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se recuperó el sobrenadante y se utilizó para la determinación de la actividad enzimática, manteniéndose en todo momento a 4°C.

6.2.8.2 Determinación del contenido de proteína en el extracto enzimático

La concentración de proteína en el extracto crudo se determinó de acuerdo al método de Bradford 1976 (Bradford, 1976). Para esto se mezclaron 50 µL del extracto crudo con 1.5 mL del reactivo de Bradford de acuerdo a las especificaciones del proveedor (SIGMA®) y se agitó en vórtex durante 30 s. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Visible JENWAY 6305.

La concentración de proteína se determinó mediante una curva estándar construida con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA): 0.0; 0.15; 0.25; 0.50; 0.75 y 1.0 mg/mL. Mediante regresión lineal se obtuvo el valor de la concentración de proteína que fue empleado para determinar la actividad específica de las enzimas bajo estudio.

6.2.8.3 Actividad enzimática de la polifenol oxidasa (PPO)

La actividad de la PPO se determinó de acuerdo al método propuesto por Tian y cols. (2006) con algunas modificaciones.

La mezcla de la reacción consistió en 0.5 mL del extracto crudo y 3 mL de una solución de sustrato de catecol (100 mM de fosfato de sodio, pH 6.4, y 500 mM de catecol). Se midió el incremento de la absorbancia a 420 nm cada minuto durante 3 min.

6.2.8.4 Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa (POD)

La actividad enzimática de la POD se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Tian y cols. (2006) con modificaciones.

La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL del extracto crudo y 2 mL de una solución de sustrato de guayacol (100 mM de fosfato de sodio, pH 6.4 y 8 mM de guayacol) la cual se incubó durante 5 min a 30 °C.

La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de H₂O₂ (24 mM) y la actividad enzimática se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/visible marca JENWAY 6305, midiendo el incremento de la absorbancia a 470 nm cada min durante 3 min.

Para el cálculo de la actividad enzimática de ambas enzimas, se utilizó la ecuación propuesta por Ambatkar y Mukundan., 2014 de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación 3):

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta OD}{min} \right) * (RmV) * (df)}{(\varepsilon) * (EV)}$$

Dónde:

$\frac{\Delta OD}{min}$ = Cambio en la absorbancia de la muestra por min

Ecuación 3

RmV = Volumen de la mezcla de reacción

df = Factor de dilución

ε = Coeficiente de extinción molar:

1,2 Benzoquinona ($1300 M^{-1}cm^{-1}$) (Albarran et al., 2010; Sharma et al., 2018).

Tetraguayacol ($26, 600 M^{-1}cm^{-1}$) (Abed et al., 2017).

EV = Volumen del extracto enzimático

Para la determinación de la actividad específica (U/mg de proteína) de ambas enzimas, se utilizó la ecuación siguiente (Ecuación 4).

$$\text{Actividad específica} \left(\frac{U}{mg \text{ de proteína}} \right) = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{concentración de proteína}}$$

Ecuación 4

6.2.9 Diseño estadístico

6.2.9.1 Análisis de la actividad enzimática

Para el análisis de la actividad enzimática de la PPO y POD se utilizó un diseño unifactorial, donde se tomó como factor el tratamiento aplicado a los frutos como variable de respuesta, las actividades específicas para cada enzima.

6.2.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), $p < 0.05$ y se compararon las medias utilizando una prueba LSD Fisher con el programa Statistica Versión 10.

CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto *in vivo* del sobrenadante bacteriano de *B. atrophaeus* B5 sobre la severidad e incidencia de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate Hass.

Se evaluó el efecto de los metabolitos contenidos en el sobrenadante de la cepa *B. atrophaeus* B5 sobre la severidad e incidencia de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* sobre frutos de aguacate. Como control negativo se utilizó medio KB líquido libre de metabolitos, para descartar el efecto que el propio medio estuviera ejerciendo. Como control adicional, se incluyeron frutos no tratados. En todos los casos los frutos se infectaron con el patógeno.

Se observó que los frutos tratados con el sobrenadante bacteriano e infectados con el patógeno mostraron una reducción de la antracnosis (Figura 7.1A) en comparación con los controles empleados que fueron los frutos tratados con medio KB e inoculados con el patógeno (Figura 7.1B) y frutos únicamente inoculados (Figura 7.1C). La enfermedad se hizo evidente por la aparición del tejido necrosado o una mancha color marrón alrededor del sitio de inoculación, indicando así que el medio KB no tiene efecto inhibitorio del crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides*.

A partir de los análisis realizados, se mostró que el SOB tuvo la capacidad de reducir la severidad e incidencia de la enfermedad en un 64.19 % y 50% respectivamente, en comparación con los frutos tratados con medio KB, este efecto observado al aplicar el sobrenadante podría atribuirse principalmente a la presencia de los metabolitos sintetizados por la bacteria *B. atrophaeus*.

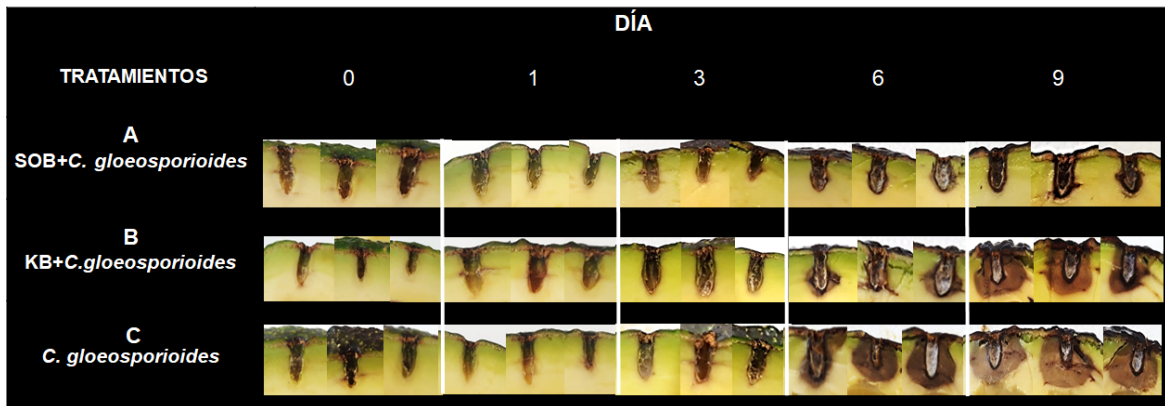


Figura 7.1. Efecto *in vivo* de los metabolitos bacterianos de *B. atrophaeus* B5 sobre la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate cv. Hass. Las mediciones se realizaron durante los días 0, 1, 3, 6 y 9 post-tratamiento e infección con el patógeno. A: frutos tratados con sobrenadante e inoculados con el patógeno B: frutos tratados con KB e inoculados con el patógeno C: frutos inoculados con el patógeno.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Guardado *et al.*, 2018 en cuanto a la reducción de la severidad e incidencia de la antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides* sobre frutos de aguacate, los cuales de igual manera fueron tratados con el sobrenadante libre de células de la cepa B5 y mostraron una reducción del 47 y 40% respectivamente. Sin embargo, la diferencia numérica entre este estudio y el nuestro, pudo deberse principalmente a las condiciones de crecimiento de la cepa bacteriana, donde la incubación fue realizada con temperatura y agitación controlada. Se ha reportado que en la producción de metabolitos a partir de cepas de *Bacillus* con efecto biocontrolador influyen diferentes condiciones, como el medio de cultivo, la disponibilidad de oxígeno, temperatura, etc. (Cosby *et al.*, 1998; Peypoux *et al.*, 1999; Jacques *et al.*, 1999). Por otra parte en nuestro estudio, la cantidad de inóculo que se colocó en el fruto para su infección fue mayor a la reportada por Guardado *et al.*, 2018.

Así mismo, Wang *et al.*, 2014, reportaron el efecto de una suspensión celular de *B. cereus* AR156 aplicada a frutos de níspero y retados con *C. acutatum*. Observaron una reducción de la severidad e incidencia de 63% y 73%, respectivamente. La posible acción biocontroladora se atribuyó principalmente al efecto inductor del sistema de defensa en el fruto de níspero por parte de la suspensión celular. De manera similar para nuestro estudio, los resultados obtenidos indican la posible inducción del sistema de defensa en el fruto a través de la aplicación de los metabolitos de la cepa B5, mediante la ISR en donde el huésped se vuelve más resistente cuando es atacado por un patógeno (Ongena y Thonart, 2006; Van Loon, *et al.*, 2006). Dicho mecanismo puede ser comprobado analizando el modo de acción del agente inductor y el patógeno para poder descartar el efecto antagonista entre ambos (Ongena y Jaques, 2008).

La eficacia de *B. subtilis* SM21 para controlar la podredumbre ocasionada por *R. stolonifer* sobre frutos de durazno durante un periodo de inducción de 12 h ha sido reportada. El tratamiento con la cepa bacteriana redujo el área lesionada y la incidencia de la enfermedad en un 37.2% y 26.7%, respectivamente. De acuerdo con esto se sugirió que el mecanismo involucrado en la resistencia fué a través de la inducción del sistema de defensa (Wang *et al.*, 2013). En nuestro caso, el periodo de inducción con el sobrenadante bacteriano de fue de solamente 2 h y se obtuvieron resultados similares de resistencia. Se ha reportado que la inducción del sistema de defensa ocurre a tiempos cortos dada la premura de la respuesta que debe ostentar el sistema vegetal frente al ataque de un patógeno. No obstante en ambas investigaciones dentro de los posibles mecanismos biocontroladores se considera que hay una inducción del sistema de defensa en el fruto.

Indudablemente, el género *Bacillus* produce una gran cantidad de moléculas biológicamente activas con gran potencial inhibitorio de fitopatógenos. Dentro de estas moléculas se encuentran los componentes antimicrobianos denominados lipopéptidos cíclicos o CLPs, donde se incluyen las familias de la surfactina, iturina y fengicina, confiriendo así, ciertas ventajas biocontroladoras de patógenos como el efecto antagonista e inductor del sistema de defensa (Ongena y Jacques., 2007). Estas moléculas pueden contener de 4-16 residuos de aminoácidos, las cadenas son lineales, cíclicas o mixtas y se clasifican dependiendo la secuencia de aminoácidos y ramas de ácidos grasos (Ongena *et al.*, 2005). La familia de la surfactina presenta estructuras de heptapéptidos interconectadas con un ácido graso bihidroxilado, formando una estructura de anillo de lactona cíclica, lo que la hace un potente biosurfactante. Además, debido a su naturaleza anfifílica, pueden asociarse fácilmente en capas lipídicas e intervenir con la integridad de la membrana biológica del patógeno. La familia iturina incluye a las principales variantes de Iturina A y C; bacilomicina D, F, L y LC, y micosubtilina, son heptapéptidos unidos a una cadena de ácido graso β -amino con longitud de 14-17 carbonos. Estos han mostrado acción antifúngica *in vitro* contra levaduras y hongos, debido a las propiedades de permeabilización de la membrana, basada en la perturbación osmótica por la formación de poros conductores de iones (Bonmatin *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2005; Waewthongrak *et al.*, 2014). En la familia de la fengicina, se encuentran fengicina A y B, son lipodecapéptidos con un anillo interno de lactona unido a un residuo peptídico y con una cadena de β -hidroxi ácido graso, saturada o insaturada, presentan actividad fungitóxicas específicamente contra hongos filamentosos. Interactúan con la capa de lípidos y alteran la permeabilidad de la membrana (Vanittanakom *et al.*, 1986; Hofemeister y cols, 2004; Deleu *et al.*, 2005). El poder antibiótico de estos lipopéptidos está asociado a la capacidad que tienen de formar micelas en medios acuosos y la

propiedad anfifílica, lo cual interrumpe el funcionamiento normal de las membranas debido a su integración en la bicapa lipídica y la formación de poros.

Existe evidencia que estas moléculas también puedan activar la expresión de genes relacionados con la defensa, a concentraciones bajas (Falardeau *et al.*, 2013; Aranda *et al.*, 2005; Dixon *et al.*, 2002).

Los metabolitos presentes en el SOB bacteriano de la cepa B5 fueron capaces de disminuir del desarrollo de la antracnosis en los frutos de aguacate. Para conocer si el mecanismo por el cual los metabolitos bacterianos inhiben el desarrollo del patógeno es debido a la inducción del sistema de defensa, es necesario estudiar su efecto a nivel molecular, mediante la evaluación de la expresión de genes y la actividad de enzimas específicas que participan en la defensa del fruto.

7.2 Análisis de la expresión de genes involucrados en el sistema de defensa

Para conocer el efecto que los metabolitos bacterianos ejercen sobre la expresión de genes relacionados con la defensa como son *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD*, fue necesaria la obtención del RNA total. Las muestras de RNA obtenidas fueron sometidas a electroforesis. Los resultados se muestran en la Figura 7.2.

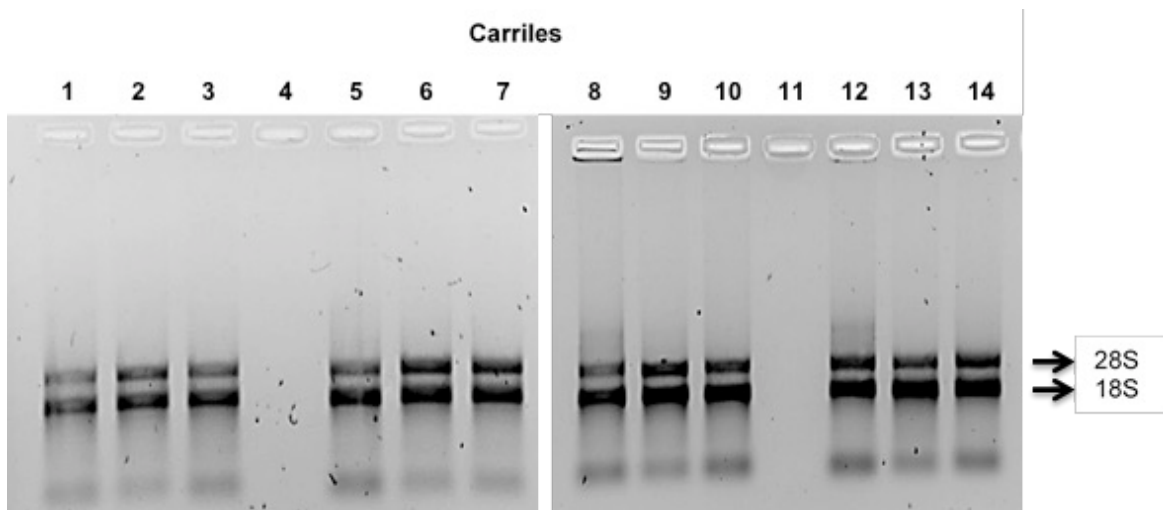


Figura 7. 2. Electroforesis del RNA total de muestras. Carril 1, 5, 8 y 12 muestras tratadas con sobrenadante + patógeno (tiempo 0, 30, 60 y 120 min), Carril 2, 6, 9 y 13 muestras tratadas con medio KB líquido + patógeno como control (tiempo 0, 30, 60 y 120 min), Carril 3, 7, 10 y 14 muestras de fruto + patógeno como control (tiempo 0, 30, 60 y 120 min).

De acuerdo a lo esperado, se observaron las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal presente en células eucariotas, las bandas se mostraron íntegras, sin degradación y sin presencia aparente de DNA genómico contaminante (Figura 7.2).

Las muestras de RNA total, fueron sometidas a un tratamiento con DNasa I, para asegurar que quedaran libres de DNA genómico. Estas muestras tratadas con DNasa I fueron sometidas a electroforesis (Figura 7.3).

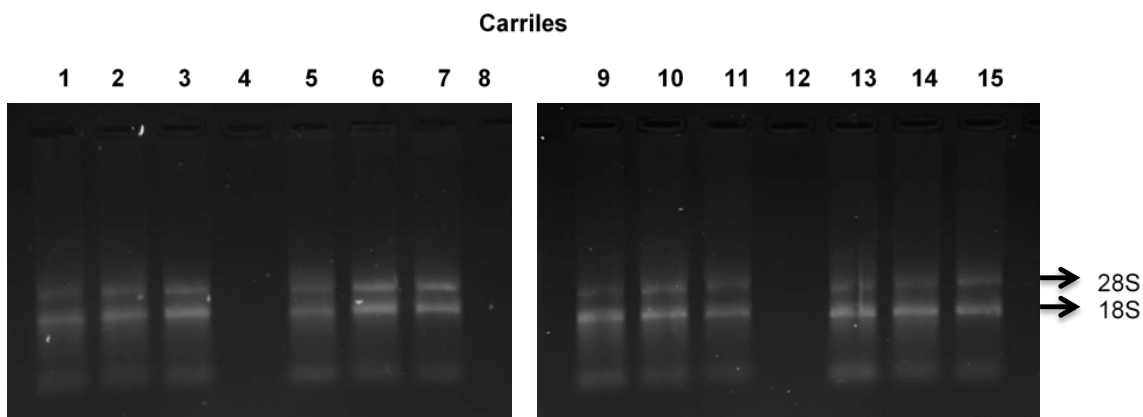


Figura 7. 3. Tratamiento de las muestras obtenidas de RNA's con DNasa I. Carril 1, 5, 9 y 13 muestras tratadas con sobrenadante + patógeno (tiempo 0, 30, 60 y 120 min), Carril 2, 6, 10 y 14 muestras tratadas con medio KB líquido + patógeno como control (tiempo 0, 30, 60 y 120 min), Carril 3, 7, 11 y 15 muestras de fruto + patógeno como control (tiempo 0, 30, 60 y 120 min).

Nuevamente, se observaron las bandas correspondientes a las 2 subunidades ribosomales 28S y 18S, aparentemente íntegras, sin DNA genómico contaminante. Estas muestras tratadas con DNasa I fueron usadas para obtener al patrón de expresión de genes específicos.

7.2.2 Análisis de la expresión de genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD*, mediante transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)

Se llevó a cabo el análisis de RT-PCR para analizar la expresión de los genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD*. Como control se analizó la expresión del gen *ACT*. Parar comprobar que el cDNA fue obtenido y que los productos amplificados fueran a partir del cDNA sintetizado de la muestra de RNA y no de DNA genómico, se utilizaron dos controles negativos; en uno, se utilizó como molde RNA total más los componentes de la mezcla de reacción y para el segundo control, se utilizó como

molde, muestra de RNA total tratado con DNasa I. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis y los resultados se muestran en la Figura 7.4.

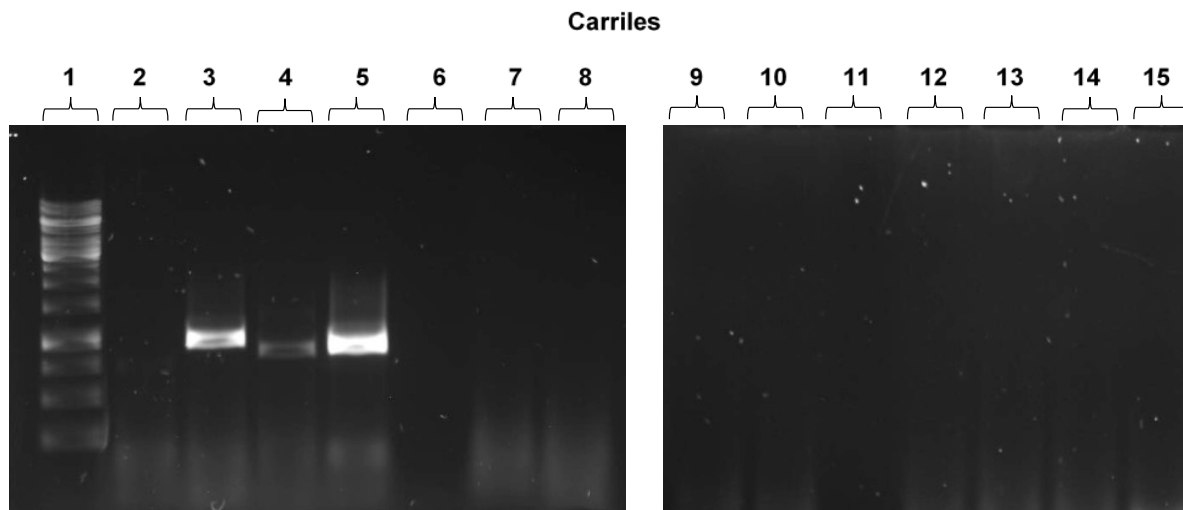


Figura 7. 4. Verificación de la amplificación genética a partir de cDNA obtenido. Muestra sobrenadante + patógeno t=0, genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y actina respectivamente. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles: 2- gen *NPR1*, 3- gen *PAL*, 4- gen *EIN3*, 5- gen actina. Carriles: 7- gen *NPR1*, 8- gen *PAL*, 9- gen *EIN3*, 10- gen actina (control negativo, amplificación a partir de RNA total). Carriles: 12- gen *NPR1*, 13- gen *PAL*, 14- gen *EIN3*, 15- gen actina (control negativo, amplificación a partir de RNA total tratado con DNasa I).

No se observó amplificación utilizando como molde al RNA no tratado y tratado con DNasa I (carriles 7-10 y 12-15), solo se observó amplificación a partir de muestra de cDNA (carriles 2-5). Esto indicó que las muestras de RNA se encontraban libres de DNA y eran aptas para continuar con el análisis de la expresión genética.

Para evaluar el efecto de los metabolitos contenidos en el SOB de la cepa B5 sobre la inducción de la expresión de los genes involucrados en el sistema de defensa en aguacate, se analizó la expresión de *NPR1*, *PAL*, *EIN3*, *POD* y como control de

expresión al gen *ACT*, el cual codifica para la actina y se expresa de manera constitutiva. Los análisis se llevaron a cabo a partir de las muestras tomadas a los tiempos 0, 30, 60 y 120 min post-tratamiento e infección con *C. gloeosporioides*. En la Figura 7.5 se muestra el patrón transcripcional de los genes analizados.

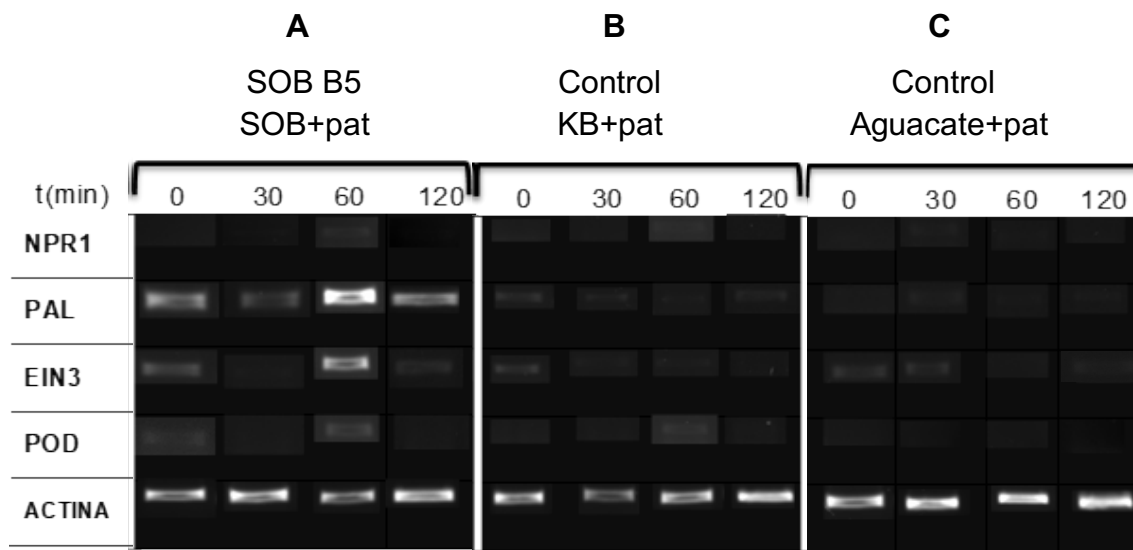


Figura 7. 5. Expresión de *NPR1*, *PAL*, *EIN3*, *POD* y *ACT*. A) Aguacate+patógeno, frutos inoculados con el hongo (control) B) KB+patógeno.- frutos tratados con medio KB líquido e inoculados con el patógeno (control). C). SOB+patógeno.-frutos tratados con sobrenadante e inoculados con el patógeno.

Al tratar los frutos con el SOB e inocularlos con el patógeno se obtuvo una mayor expresión de los genes *PAL*, *EIN3* y *POD* (Figura 7.5A), en comparación con los controles empleados. Lo anterior indica que la inducción de la expresión de estos genes es debida a los metabolitos bacterianos. Se puede observar que los tratamientos control que son medio KB/patógeno inoculado y el fruto de aguacate/patógeno inoculado, no inducen la expresión de los genes evaluados en los diferentes tiempos de medición (Figura 7.5B y 7.5C), sugiriendo que si bien la presencia del patógeno puede significar un estrés biótico, este estímulo por sí solo no es suficiente para inducir eficientemente el sistema de defensa del fruto.

En los frutos tratados con el SOB e inoculados con el patógeno se observó una mayor expresión de los genes evaluados principalmente al tiempo 0 y 60min, se observó que al tiempo 0 los genes mayormente expresados fueron *PAL* y *EIN3* (Figura 7.5A). El gen *PAL* codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual está involucrada en el primer paso para la vía de los fenilpropanoides, dando como resultado la síntesis de compuestos fenólicos, fitoalexinas y lignina, moléculas que están asociadas con los procesos de resistencia (Hahlbrock *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2014). En la Figura 7.5A se puede observar que el SOB induce en mayor medida la expresión del gen *PAL*, en comparación con el resto de los genes analizados. Este patrón de expresión podría explicarse argumentando el papel central de PAL en la producción de diversos metabolitos que se biosintetizan en el fruto para su defensa, por lo tanto dada su importancia en este proceso, su transcripción es más requerida por el fruto. Además, esto sugiere que la expresión del gen *PAL* pudiera ser uno de los principales genes activados por la vía de ISR y por la importancia de la enzima en diversos procesos.

Con lo que respecta a *EIN3*, en la Figura 7.5A se puede observar que al aplicar el SOB este gen tiene mayor expresión a los 60 min. lo que sugiere que en este tiempo los metabolitos han sido sensados y el sistema de defensa se encuentra activado. *EIN3* está involucrado en la vía de transducción de señales dependientes de etileno, y participa en la regulación de genes de respuesta a esta hormona. El gas etileno, es percibido por una familia de receptores ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 y ERS2 ubicados en la membrana celular (Ohme *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999). En presencia de etileno, cuando éste se une a los receptores, se inhibe CTR1 que es un regulador negativo de la vía de señalización, posteriormente se activa *EIN2*, el cual a su vez, activará la familia de factores de transcripción río abajo de esta vía como *EIN3/EIL3* (Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998; Chang

et al., 1993). *EIN3* es un regulador positivo que induce la expresión de factor de transcripción llamado ERF1, el cual es un regulador positivo de los genes regulados en respuesta a etileno. Los ERFs son factores de transcripción que inducen la expresión de genes relacionados a la patogénesis, como la β -1-3-glucanasa, la quitinasa básica y la defensina (Ohme *et al.*, 1995; Solano *et al.*, 1998). Lo anterior puede explicar la importancia *EIN3* en las respuestas de defensa en la planta a través de la inducción de proteínas relacionadas con la defensa (Abeles *et al.*, 1992).

Por otra parte, se obtuvo una ligera expresión del gen que codifica para POD (Figura 7.5A). La enzima peroxidasa se encuentra implicada en los procesos de lignificación para el reforzamiento de las paredes celulares vegetales ante la infección con un patógeno. La baja expresión de este gen obtenida en nuestro estudio podrían atribuirse al tiempo en el que fue evaluado, ya que se ha reportado que esta enzima se activa por percepción del patógeno en el fruto, y posiblemente para la expresión de este gen sea conveniente evaluarlo en tiempos más prolongados como en estudios reportados por Waewthongrak *et al.*, 2014.

El SOB, al menos en los tiempos evaluados, no logró inducir al gen *NPR1*, se ha reportado que este gen es un regulador central de las vías de señalización de defensa involucrado mayormente con RSA por la respuesta generada en la planta ante el ataque de un patógeno, sin embargo ha sido implicado en las vías del JA/ET dependientes de ISR. En mutantes *npr1* de *Arabidopsis*, se observó que no mostraron habilidad para expresar la ISR cuando fueron colonizadas por bacterias PGPR (Pieterse *et al.*, 1998; Kinkema *et al.*, 2000; Dong, 2004; Ahn *et al.*, 2007). La nula expresión de *NPR1* que se observa en nuestro estudio, puede ser debida a que el tiempo en que el fruto estuvo en contacto con el patógeno fue corto, así como también al área donde se tomó muestra para su análisis, ya que fue distante

del sitio de infección, probablemente la expresión del gen en el área contigua fuera mayor debido a la cercanía con el patógeno.

Estos resultados podrían indicar que el posible mecanismo de inducción genética a partir de los metabolitos aplicados en los frutos de aguacate es la resistencia sistémica inducida (ISR).

Waewthongrak *et al.*, 2014, analizaron el efecto de lipopéptidos cíclicos (CLP) obtenidos de *B. subtilis* ABS-S14 sobre la transcripción de genes relacionados con la defensa y la actividad de enzimas en naranja cv. Valencia, infectada con *P. digitatum*. En lo que respecta al efecto individual observado de cada lipopéptido, la surfactina indujo una alta expresión de los genes que codifican para la Peroxidasa y Lipoxigenasa, sin embargo, durante las 48h la combinación de surfactina e iturina indujo una mayor expresión de estos genes. En este estudio se confirmó el efecto de la surfactina sobre la activación de genes que codifican para peroxidasa y lipoxigenasa, las cuales tienen un papel importante como moléculas señal para la activación de la ISR. Tal como se ha reportado, las peroxidases protegen a células del cambio de radicales libres y especies reactivas de oxígeno a compuestos fenólicos, H₂O y O₂, los cuales se encuentran involucrados en procesos fisiológicos como la lignificación, suberización, sanación de heridas, mecanismo de defensa contra infecciones por patógenos, etc. (Horaga *et al.*, 2001). Entre el reporte de Waewthongrak *et al.*, 2014 y nuestro estudio, existe una gran diferencia en cuanto al tiempo en que se analizó la expresión del gen *POD* de más de 48h de su análisis con la aplicación de los lipopéptidos. La enzima peroxidasa es muy importante en el mecanismo de defensa, ya que participa en el proceso de lignificación. El fruto al estar en contacto con las esporas de *C. gloeosporioides* activa el gen que codifica para la *POD*, nuestro estudio sugiere que en periodos cortos de confrontación fruto-patógeno, éste no logra tener una densidad poblacional

adecuada para que el fruto lo sense y se induzca de manera significativa la expresión de este gen.

Se ha reportado que los metabolitos bacterianos capaces de inducir respuesta de defensa en plantas son los lipopéptidos cíclicos y la surfactina, molécula que se le ha atribuido un papel como inductor de la ISR. Jourdan *et al.*, 2009 sugirieron que esta molécula puede actuar causando alcalnización del pH extracelular como resultado del intercambio de K^+/H^+ a través de la membrana. Se cree que la surfactina y posiblemente otros lipopéptidos cíclicos de la cepa *B. subtilis*, interactúan con la membrana plasmática de las células vegetales, pero la evidencia de si se unen a los receptores o si se insertan directamente en la membrana, no está comprobada (Pérez *et al.*, 2011). En estudios realizados por Harry *et al.*, (2011), sobre la inserción directa de la surfactina en el dominio lipídico de la membrana, reportan que una segunda adición de surfactinas en células de plantas de tabaco, produjo una segunda activación ISR. Debido a esto, se planteó la hipótesis de si la ISR inducida por surfactina, resulta en pequeñas interrupciones causadas por la inserción de estas moléculas a la membrana lipídica que aunque no sea lo suficiente grande como para afectar la integridad de la membrana, estas alteraciones pudieran ser suficientes para inducir en las células vegetales la activación del mecanismo de defensa.

Wang *et al.*, 2014, reportaron el efecto en la inducción de la resistencia en frutos de níspero, empleando el agente de biocontrol *B.cereus* AR156 durante 12h de inducción y posterior inoculación *C. acutatum*. Se analizó la expresión de los genes *EkNPR1*, *EjPAL2*, *EjEin3* a las 3, 6 y 12h post-inoculación. Como resultados obtuvieron una mayor expresión de los genes analizados en los frutos que fueron tratados con la suspensión celular y retados con el patógeno. Estos resultados

concuerdan con los que obtuvimos en nuestro estudio, donde al tratar los frutos de aguacate con el sobrenadante de la cepa B5 e inocularlos con el patógeno, se observó mayor expresión de los genes que codifican para *PAL* y *EIN3*. Sin embargo, en relación al gen *NPR1* no se observó expresión debida probablemente a que los tiempos analizados fueron cortos (0, 30, 60 y 120min), es posible pensar que en un análisis de expresión a tiempos largos (6h), se induce la expresión de este gen.

El fenómeno llamado priming es un proceso fisiológico que prepara a la planta para una respuesta más rápida o efectiva ante una situación de estrés y está asociado con la ISR. La ISR mediada por bacterias PGPR's mejora la respuesta de defensa basal una vez que la planta se encuentra en contacto con el patógeno, debido a que la planta reconoce diferentes patrones moleculares asociados a los microbios benéficos (MAMPs), dando como resultado una efectiva respuesta inmune sistemática en los tejidos de la planta (Conrath *et al.*, 2002; García *et al.*, 2013) al potenciar la expresión genes y la síntesis de enzimas relacionadas con la defensa. En este sentido, Los resultados de nuestro estudio se atribuyeron al fenómeno denominado priming, inducido a partir del sobrenadante obtenido de la cepa B5, puesto que se obtuvieron mayores aumentos en la expresión de genes lo cual se vio reflejado en la reducción de la enfermedad antracnosis en comparación con los controles analizados.

Dada la importancia mencionada de los genes bajo estudio y de acuerdo al patrón de expresión obtenido, se puede proponer un efecto inductor por los metabolitos contenidos en el sobrenadante, sugiriendo así, la activación del mecanismo de defensa en el aguacate, contribuyendo a la resistencia del fruto ante el ataque del hongo.

Para corroborar que el sistema de defensa está siendo activado por los metabolitos bacterianos, se midió la actividad de enzimas que se ha reportado están involucradas en este proceso.

7.3 Efecto del sobrenadante bacteriano de *B. atrophaeus* B5 sobre la actividad enzimática de la PPO y POD en frutos de aguacate.

Se evaluó el efecto de los metabolitos bacterianos de la cepa *B. atrophaeus* B5 en frutos de aguacate infectados con *C. gloeosporioides*, sobre la actividad específica de las enzimas Polifenol oxidasa (PPO) y Peroxidasa (POD). Las evaluaciones se realizaron durante los días 0, 1, 3, 6 y 9. Como control se monitoreó el comportamiento de la actividad enzimática de frutos infectados con el patógeno y frutos tratados con medio KB líquido e infectados con el patógeno. Los comportamientos enzimáticos fueron analizados gráficamente.

La concentración de proteína fue determinada mediante una curva estándar construida de suero bovino (BSA) de acuerdo a las concentraciones mencionadas anteriormente. La gráfica obtenida se muestra en la Figura 7.6.

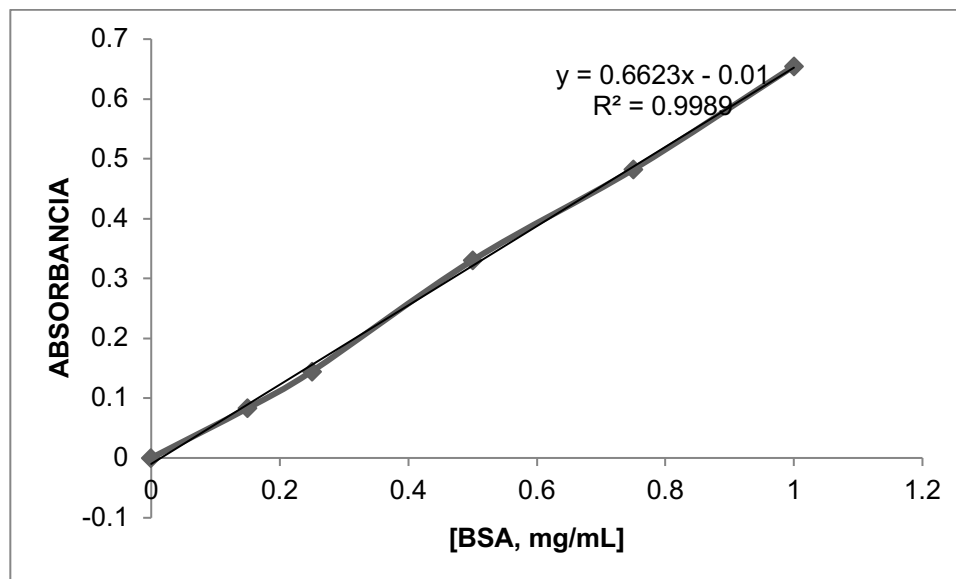


Figura 7. 6. Curva estándar BSA para la determinación del contenido de proteína. La curva fue construida con diferentes concentraciones del estándar BSA y midiendo la absorbancia a 595nm.

7.3.1 Evaluación de la actividad enzimática PPO

Para determinar la actividad enzimática de la PPO se partió del extracto crudo obtenido de cada muestra analizada como fuente enzimática y como sustrato el catecol. El método se basa principalmente en la oxidación del sustrato catecol (inoloro) en presencia de oxígeno a 1,2 benzoquinona (color pardo) y es medido mediante espectrofotometría. La reacción es catalizada por la enzima polifenol oxidasa. En nuestro estudio, en cada muestra analizada se observaron distintas intensidades del color característico que se indica para dicha reacción, se obtuvieron valores de absorbancia los cuales fueron utilizados para el cálculo de la correspondiente actividad específica.

Se observó que los frutos tratados con los metabolitos contenidos en el sobrenadante bacteriano, modificaron la actividad enzimática de la PPO durante

todos los días de evaluación hacia valores mayores respecto de los controles empleados, como se muestra en la Figura 7.7. La mayor actividad se observó en los días 1 y 9, con un aumento considerable de 2.84 (284.48%-14.35±3.24 U/mg proteína) y 2.54 (254.55%-6.48±0.29 U/mg proteína) veces más comparando con los frutos tratados con medio KB, lo cual indica que los metabolitos contenidos en el sobrenadante están ejerciendo un efecto inductor sobre el sistema de defensa del fruto al aumentar la actividad de enzimas relacionadas con la defensa vegetal y que el medio KB por sí mismo no ejerce efecto alguno sobre el mismo.

Para el caso de los controles empleados, las actividades enzimáticas obtenidas durante todos los días de medición, se mantuvieron por debajo de los valores obtenidos para el tratamiento con el sobrenadante. Estos resultados indican que las actividades enzimáticas obtenidas al tratarse los frutos con el sobrenadante bacteriano, presentaron un aumento mayor debido a los metabolitos contenidos en el mismo y no al efecto que cada control pudiera estar ejerciendo en el fruto. Estos resultados concuerdan con los trabajos que se han reportado, en los cuales se hace mención que tras la aplicación de inductores, se obtienen incrementos en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas (Ramamoorthy *et al.*, 2002; Thakur y Sohhal., 2013).

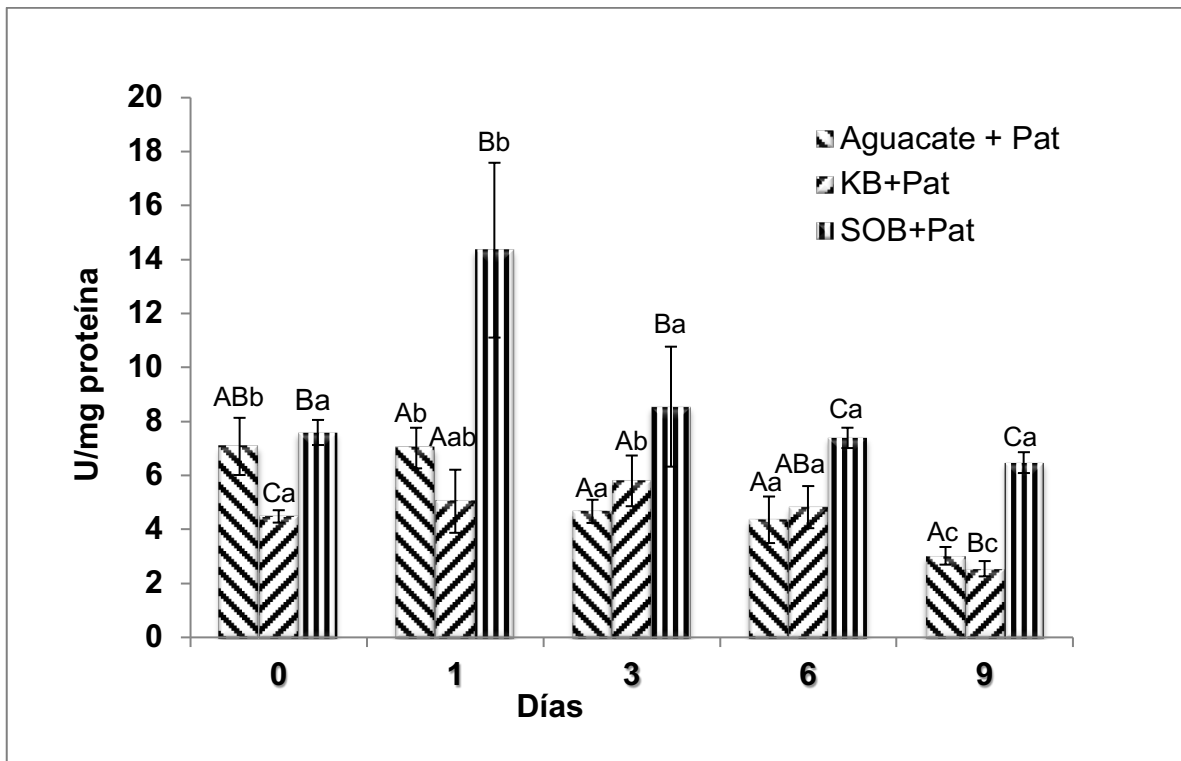


Figura 7. 7. Efecto de los metabolitos bacterianos contenidos en el SOB de la cepa *B. atrophaeus* B5 sobre la actividad específica de la PPO. Las letras en mayúscula indican comparación entre los tratamientos por día, en minúscula indican comparación al paso de los días en cada tratamiento. Letras diferentes, representan diferencia estadística significativa, $P < 0.05$.

En el cuadro 7.1 se concentran los datos de las actividades enzimáticas evaluadas para la PPO en los diferentes días de prueba. Se observó que existe diferencia estadística significativa al aplicar el tratamiento con el SOB respecto de los controles empleados. Entre los controles, no existió diferencia estadística significativa, lo cual indicó una vez más que el medio KB en el cual se encuentran los metabolitos bacterianos, no influye en los resultados obtenidos y el incremento en la actividad de la enzima se atribuye al efecto inductor de éstos.

Cuadro 7. 1. Actividad específica de la Polifenol oxidasa (PPO).

ACTIVIDAD ESPECÍFICA			
Polifenol oxidasa PPO (λ 420nm, U/mg proteína)			
DÍA	SOB+Pat	KB+Pat	Aguacate + Pat
0	7.59 \pm 0.46 ^{Ba}	4.48 \pm 0.23 ^{Ca}	7.08 \pm 1.06 ^{ABb}
1	14.35 \pm 3.24 ^{Bb}	5.04 \pm 1.17 ^{Aab}	7.02 \pm 0.75 ^{Ab}
3	8.55 \pm 2.22 ^{Ba}	5.80 \pm 0.94 ^{Ab}	4.67 \pm 0.43 ^{Aa}
6	7.39 \pm 0.38 ^{Ca}	4.83 \pm 0.78 ^{ABa}	4.36 \pm 0.86 ^{Aa}
9	6.48 \pm 0.39 ^{Ca}	2.54 \pm 0.28 ^{Bc}	3.02 \pm 0.33 ^{Ac}

Letras mayúsculas indican comparación en fila entre tratamientos, letras minúsculas indican comparación por columna entre los días por tratamiento. Letras diferentes, representan diferencia estadística significativa, $P < 0.05$.

Los tiempos donde se presentaron aumentos más significativos de la actividad enzimática para la PPO en frutos tratados con el sobrenadante bacteriano, fueron durante los días 1 y 9, la cual se comparó con frutos tratados con medio KB como su respectivo control bajo ese mismo tiempo de análisis. Las diferencias entre las actividades enzimáticas obtenidas durante cada día de medición pueden ser debidas a que el fruto es un sistema biológico en donde continuamente ocurren diversos procesos generando cambios y que en nuestro modelo de estudio se puede mencionar desde el tipo de tratamiento dado, el estado de madurez, el desarrollo del patógeno en su infección en el fruto, el área tomada para el análisis de su actividad enzimática, etc. Todos estos factores podrían estar influyendo en nuestros resultados, sin embargo el efecto observado al aplicar el SOB se está reflejando en estos.

7.3.2 Evaluación de la actividad enzimática POD

De igual manera, para el análisis enzimático de la POD se partió del extracto crudo obtenido, el cual fue usado como fuente enzimática y como sustrato el guayacol-

peróxido de hidrógeno. Este método consiste en la oxidación del guayacol (incoloro) a tetraguayacol (rojo ladrillo) y la velocidad de formación del color rojo ladrillo se utiliza como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias respecto al tiempo, y la reacción es catalizada por la enzima peroxidasa. En nuestro estudio, las muestras analizadas presentaron diferentes intensidades del color característico desarrollado en esta reacción, dependiendo del tratamiento dado en los frutos. Los valores de las absorbancias obtenidas fueron empleados para los correspondientes cálculos de la actividad específica. Se observó que en los frutos tratados con el sobrenadante conteniendo los metabolitos bacterianos, se modificó la actividad de esta enzima durante los distintos días evaluados hacia valores mayores respecto de los controles empleados, tal y como se muestra en la Figura 7.8.

La mayor actividad obtenida en los frutos que se trataron con el sobrenadante fue en los días 1 y 9. Se presentaron aumentos considerables de 2.56 (256.97%-61.2±17.68 U/mg proteína) y 2.09 (209.06%-43.73±8.15 U/mg proteína) veces más respecto al control de los frutos tratados con medio KB líquido. Las actividades enzimáticas obtenidas en los frutos tratados con el sobrenadante fueron significativamente mayores en comparación con los controles empleados lo cual indica que el sobrenadante bacteriano que contiene los metabolitos bacterianos se encuentran ejerciendo un efecto inductor sobre el sistema de defensa del fruto al aumentar la actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa vegetal y la aplicación de solo medio KB libre de metabolitos no ejerce efecto alguno sobre el mismo. Por otra parte, los frutos que fueron únicamente inoculados con el patógeno, de igual manera que el control con medio KB, se observa que su actividad se encuentra por debajo de aquellos frutos tratados con el SOB indicando que la sola infección del fruto con el patógeno no influye en el aumento de la actividad de dicha enzima. Los resultados de la actividad enzimática obtenidos en

este trabajo concuerdan con lo previamente reportado para otros estudios al aplicar inductores, en donde se muestran incrementos en las actividades de enzimas relacionadas con la defensa en plantas (Ramamoorthy *et al.*, 2002; Thakur y Sohhal., 2013).

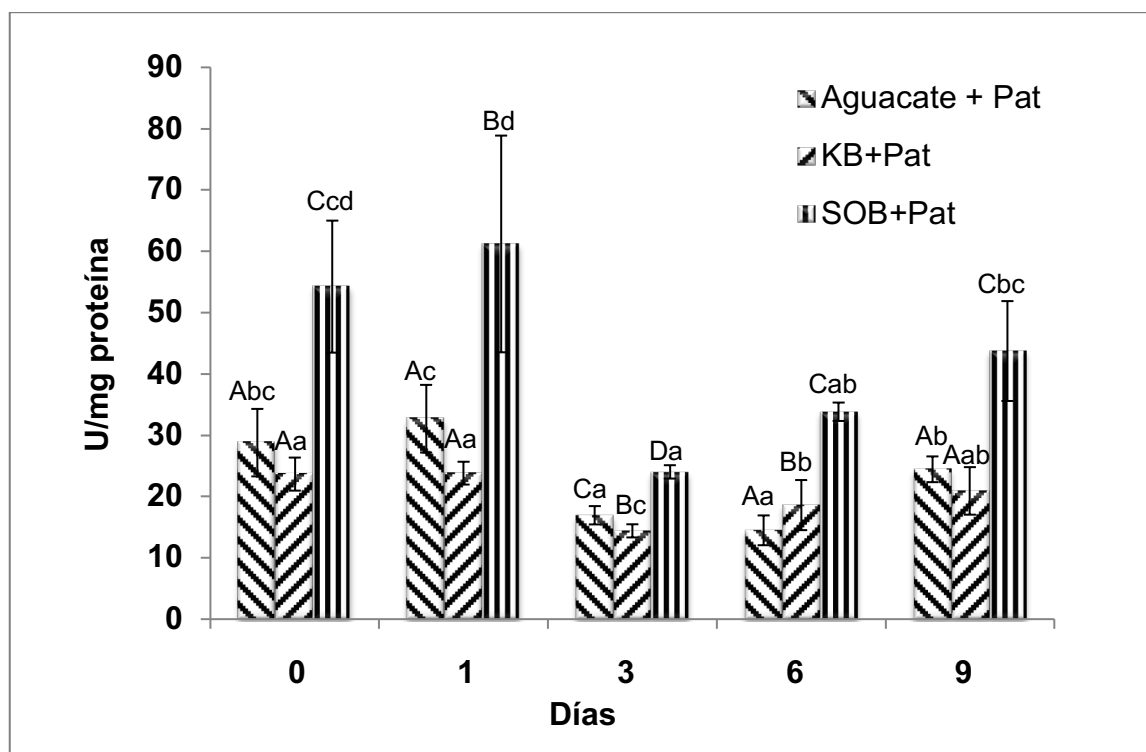


Figura 7. 8. Efecto de los metabolitos bacterianos contenidos en el SOB de la cepa *B. atrophaeus* B5 sobre la actividad específica de la Peroxidasa POD. Las letras en mayúscula indican comparación entre los tratamientos por día, en minúscula indican comparación al paso de los días en cada tratamiento. Letras diferentes, representan diferencia estadística significativa, $P < 0.05$.

En la el cuadro 7.2 se concentran los datos de las actividades enzimáticas para la POD evaluadas en los diferentes días de análisis. Como se observa en la tabla, existe diferencia estadística significativa al aplicar el tratamiento con el sobrenadante respecto de los controles empleados, el cual presentó mayor

actividad enzimática en cada uno de los días medidos. Entre los controles no se presentó diferencia estadística significativa, lo cual indica que el medio KB no influye en los resultados esperados y el efecto inductor se atribuye a los metabolitos contenidos en el sobrenadante bacteriano. En los frutos únicamente inoculados con el patógeno de igual manera que en el control con medio KB, las actividades enzimáticas se mantuvieron por debajo de las obtenidas para los frutos tratados con el SOB y no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto al control con KB puesto que se observó un comportamiento similar, esto demuestra una vez más el efecto propio que los metabolitos bacterianos ejercen debido a que se ha reportado al aplicar inductores, un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa vegetal.

Cuadro 7. 2. Actividad específica de la enzima Peroxidasa (POD).

ACTIVIDAD ESPECÍFICA			
Peroxidasa POD (λ 470nm, U/mg proteína)			
DÍA	SOB+Pat	KB+Pat	Aguacate + Pat
0	54.24 \pm 10.77 ^{Ccd}	23.66 \pm 2.70 ^{Aa}	28.79 \pm 5.50 ^{Abc}
1	61.2 \pm 17.68 ^{Bd}	23.81 \pm 1.86 ^{Aa}	32.69 \pm 5.52 ^{Ac}
3	24.02 \pm 1.09 ^{Da}	14.40 \pm 1.07 ^{Bc}	16.94 \pm 1.49 ^{Ca}
6	33.83 \pm 1.50 ^{Cab}	18.61 \pm 4.09 ^{Bb}	14.49 \pm 2.43 ^{Aa}
9	43.73 \pm 8.15 ^{Cbc}	20.92 \pm 3.88 ^{Aab}	24.44 \pm 2.10 ^{Ab}

Letras en mayúscula indican comparación en fila por día, letras minúsculas indican comparación por columna al paso de los días por tratamiento. Letras diferentes, representan diferencia estadística significativa, $P < 0.05$. Igual, las letras del análisis estadístico las veo raras.

De igual manera para la actividad enzimática obtenida de la POD, los tiempos donde se presentaron aumentos más significativos en los frutos tratados con el sobrenadante bacteriano fueron en los días 1 y 9, estas actividades fueron

comparadas con frutos tratados con medio KB como su respectivo control bajo ese mismo tiempo de análisis. En nuestro estudio tanto para la actividad enzimática obtenida para la PPO como para la POD, estas diferencias obtenidas durante cada día de medición pueden ser debidas a que el fruto es un sistema biológico en donde continuamente ocurren diversos procesos generando cambios en el fruto, de lo cual se puede mencionar desde el tipo de tratamiento dado, el estado de madurez, el desarrollo del patógeno en su infección en el fruto, el área tomada para el análisis de su actividad enzimática, etc. Sin embargo el efecto observado al aplicar el SOB se reflejó en los aumentos obtenidos.

En el estudio realizado por Wang *et al.*, 2014, evaluaron el efecto de la cepa *B. cereus* AR156, sobre la inducción de la resistencia de la antracnosis causada por *C. acutatum* en frutos de níspero. Analizaron el comportamiento de las actividades enzimáticas de la Quitinasa, β -1,3 Glucanasa, Fenilalanina amonio liasa, Peroxidasa, Polifenol oxidasa, Superoxido dismutasa, Catalasa y Ascorbato peroxidasa. Para el caso de las enzimas PPO y POD, obtuvieron incrementos durante los días de medición 0, 2, 4 y 6, siendo este último día, en donde se mostró un incremento aproximado de 250 U/mg proteína y 150 U/mg proteína respectivamente comparado con el testigo empleado. Por lo que se sugirió que este aumento podría estar asociado con el *priming* inducido por la cepa *B. cereus* AR156 para la resistencia a la enfermedad en el fruto. En nuestro estudio se obtuvo para el día 6 aumento de 7.39 U/mg proteína para PPO y 33.83 U/mg para POD comparado con el estudio previamente mencionado para este mismo día. Las diferencias de nuestro estudio en comparación con el realizado por Wang *et al.*, 2014, se pueden explicar porque el fruto analizado no es el mismo, así como también la cepa y el periodo de inducción son diferentes, pero a pesar de esto mostraron comportamientos similares en los aumentos de dichas enzimas debidas

al efecto inductor que se estaba ejerciendo. Se han reportado aumento de diferentes enzimas tales como hidrolasas, glucanasas, quitinasas, peroxidadas, entre otras, cuando las plantas son sometidas a tratamientos con cepas PGPR (Chittoor *et al.*, 1999; Mayer., 1987). Enzimas como la POD y PPO contribuyen con la defensa en plantas, debido a que pueden catalizar la formación de lignina, la formación de barreras para el reforzamiento de las células y la oxidación de compuestos fenólicos generando quinonas, las cuales pueden actuar como antimicrobianos (Chittoor *et al.*, 1999; Mayer., 1987), así como también participan en la biosíntesis de fitoalexinas tal es el caso de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Mohammadi *et al.*, 2002; Niranjan *et al.*, 2012). En varios estudios se ha indicado que enzimas como la PPO pueden participar en reacciones de defensa e hipersensibilidad en plantas resistentes a virus, bacterias y hongos. También se encuentra dentro de las enzimas involucradas en reacciones de oscurecimiento del tejido inducido por la herida y participar en la síntesis de barreras físicas contra parásitos. Estas actividades se han correlacionado con la resistencia a las enfermedades en plantas (Goodman *et al.*, 1986; Leina *et al.*, 1996; Mohammadi *et al.*, 2002). Se ha reportado que la actividad de estas enzimas de defensa favorecen la deposición de calosa y lignina, así como la rápida formación de papilas directamente por debajo de los apresorios de los hongos invasores en las paredes celulares epidérmicas con lo cual se restringe la penetración de hongos en los tejidos vegetales que han sido inducidos (Kovats *et al.*, 1991). En este mismo sentido se ha observado en las plantas una correlación positiva entre los niveles de PPO y la resistencia a patógenos y herbívoros, es decir la inducción de PPO por condiciones de estrés y el ataque de patógenos incluyendo la función del jasmonato en el proceso de inducción (Mayer, 2006). Por lo tanto nosotros consideramos que en nuestro modelo de estudio se podría estar induciendo el sistema de defensa mediante el tratamiento con el sobrenadante bacteriano, al

probarse su efecto a través de la infección con el patógeno y la respuesta dada en el fruto.

Waewthongrak *et al.*, 2014, analizaron el efecto de los lipopéptidos cíclicos (CLP) obtenidos de *B. subtilis* ABS-S14 sobre la transcripción de genes relacionados con la defensa y la actividad de enzimas involucradas en el sistema de defensa en naranja valencia. El experimento se realizó probando el efecto de los lipopéptidos Iturina A, fengicina y surfactina sobre frutos de naranja sin infectar e infectadas con *P. digitatum*. La actividad de la POD a las 48 y 72 h presentó aumentos de 610 ± 22.0 y 796 ± 50.4 U/mg proteína respectivamente en los frutos que fueron tratados con surfactina e inoculados con el patógeno. Para el efecto sinérgico de la surfactina más iturina, se obtuvieron aumentos de 479 ± 51.3 U/mg proteína durante las 48h después de su aplicación. Los resultados obtenidos en nuestro estudio difieren con el previamente mencionado. Al día 3 se obtuvo un aumento de la POD de 24.02 U/mg proteína, muy por debajo de lo obtenido por Waewthongrak *et al.*, 2014, lo cual se puede explicar ya que en nuestro estudio se aplicó el sobrenadante crudo, es decir, no se fraccionaron los metabolitos para obtener su efecto por separado y no se probó cada lipopéptido por separado, además, la concentración de metabolitos producidos no es la misma debido a que la cepa bacteriana es diferente. No obstante estas diferencias los metabolitos bacterianos de la cepa *B. atrophaeus* B5 mostraron un posible efecto inductor del sistema de defensa al modificar favorablemente la actividad enzimática. Durante la reacción de defensa en las plantas contra agentes patógenos, las POD, enzimas oxido-reductoras, participan en los procesos de construcción de la pared, oxidación de fenoles, la suberización y lignificación de las células de la planta (Chittoor y Leach., 1999; Naglaa y Heba., 2011). Las POD están involucradas en funciones fisiológicas importantes de las plantas como la síntesis de polímeros de pared

celular como la lignina y suberina, las cuales constituyen barreras físicas contra el estrés biótico y abiótico (Cosgrove, 1997; Quiroga *et al.*, 2000).

De acuerdo con lo mencionado anteriormente y con base en los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere que el efecto que ejerció el SOB bacteriano sobre los frutos de aguacate, podría estar asociado a la inducción del sistema de defensa del fruto mediante la ISR.

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

El sobrenadante bacteriano obtenido a partir del crecimiento de *B. atropaeus* B5 logró reducir la severidad e incidencia de la antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides* sobre frutos de aguacate cv. Hass, en un 64.19% y 50% respectivamente.

Las actividades de las enzimas Polifenol oxidasa (PPO) y Peroxidasa (POD) las cuales se ha reportado su aumento cuando se induce el sistema de defensa vegetal, presentaron un mayor aumento en los frutos que fueron tratados con el sobrenadante bacteriano respecto de los controles empleados a lo largo de los días de medición, lo que sugirió el posible efecto inductor ejercido sobre el sistema de defensa del fruto, mismo que fue infectado con el patógeno

Se propone que los metabolitos bacterianos están ejerciendo una inducción del sistema de defensa en el fruto a través de la inducción de la ISR. Esto se sustenta por el aumento en la actividad de las enzimas PPO y POD, además, el aumento en la expresión de los genes *NPR1*, *PAL*, *EIN3* y *POD* en los frutos tratados con el sobrenadante.

Con base en las actividades enzimáticas y la inducción de genes específicos, se puede concluir que *B. atropaeus* B5 es una bacteria candidata para llevar a cabo estrategias que permitan reducir la antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass durante la postcosecha.

CAPÍTULO IX. PERSPECTIVAS

CAPÍTULO IX. PERSPECTIVAS

- * Evaluar diferentes tiempos para la obtención del sobrenadante bacteriano debido a que se pueden estar biosintetizando metabolitos con diferente capacidad de inducción de la ISR dependiendo de la etapa de crecimiento bacteriano, de esta manera se podría obtener el sobrenadante con mejor efecto en el control de la antracnosis.
- * Extender un poco más el periodo de inducción de los frutos debido a que en estudios reportados, el periodo dado con suspensiones celulares de cepas del genero *Bacillus* son mayores que el de nuestro estudio.
- * Probar el efecto del sobrenadante bacteriano de esta cepa en plántulas de aguacate con el fin de evaluar si les favorece en su desarrollo, o inclusive, en plántulas de otros cultivos y evaluar su efecto contra fitopatógenos.
- * Identificar los metabolitos en el SOB que estén ejerciendo el efecto ISR para llegar a desarrollar productos de mayor actividad inductora.
- * Evaluar la expresión del gen *NPR1* en tiempos más largos para que el patógeno se encuentre mayor tiempo en el fruto.
- * Analizar la actividad enzimática o la expresión de la lipoxigenasa, debido a su importancia directa en la síntesis de ácido jasmónico, que es la hormona involucrada en la ISR.

*Realizar pruebas de calidad en frutos tratados con el sobrenadante, puesto que en el estudio realizado, cuando se tomó la correspondiente muestra para el análisis enzimático del día 9, los frutos de este tratamiento se mostraron más firmes y en mejor estado a comparación de los controles.

CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO X. BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, FB., Morgan, PW., Saltveit ME, Jr. (1992). Ethylene in Plant Biology, 2nd edn. New York: Academic Press.
- Abhayashree, M., Murali, M., Amruthesh, K. (2016). Abiotic elicitors mediated resistance and enhanced defense related enzymes in *Capsicum annuum* L. Against anthracnose disease. *Sci. Hortic.*204. pp: 172–178.
- Agrios, G. (2005). Plant Pathology, 5th edition Academic Press, San Diego, Calif, USA.
- Agrios, G.N., 2004. Plant Pathology [Electronic Resource]. Elsevier, EBL: Burlington.
- Albarran, G., Boggess, W., Rassolov, V., Schuler, R. (2010). *Absorption Spectrum, Mass Spectrometric Properties, and Electronic Structure of 1,2-Benzoquinone. The Journal of Physical Chemistry A, 114(28), 7470–7478.* doi:10.1021/jp101723s
- Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A. (2005) Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta* 1713, 51–56
- Arora, N. (2015). Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. Springer, India. pp: 383.
- Aryal, S., Davis, R., Stevenson, K., Timper, P., Ji, P. (2011). Influence of infection of cotton by *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on the production of enzymes involved in systemic acquired resistance. *J. Nematol.* 43 (3-4):152– 159.
- Arroyave, J., Mosquera, S., Villegas, V. (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological control.*

- Abed-Ashtiani, F., Arzanlou, M., Nasehi, A., Kadir, J., Vadamalai, G., Azadmard-Damirchi, S. (2018). *Plant tonic, a plant-derived bioactive natural product, exhibits antifungal activity against rice blast disease. Industrial Crops and Products, 112, 105–112.* doi:10.1016/j.indcrop.2017.11.013
- Awang, Y., Ghani, M.A.A., Sijam, K., Mohamad, R.B. (2011). Effect of calcium chloride on anthracnose disease and postharvest quality of red-flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Afri. J. Microbiol. Res. 5.* pp: 5250–5259.
- Ambatkar, M., Mukundan, U., 2014. Calcium salts enhance activity and azo dye decolourisation capacity of crude peroxidase from *Armoracia rusticana*. *Am. J. Plant Sci. 5 (2), 212–218.*
- Barkai, R. (2001). Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development
- Bhattacharyya, P., Jha, D. (2012). Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR): emergencia en la agricultura. *Mundo J. Microbiol. Biotechnol. 28.* pp: 1327 – 1350.
- Bhattacharyya, D., M, Garladinne., Lee, Y. (2015). Volatile indole produced by *Rhizobacterium Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. *Journal of Plant Growth Regulation. 34.* pp: 158-168.
- Bergh, B. (1992). Nutritious value of avocado. *California Avocado Society Yearbook, 76, 123-135.*
- Beno, D.B., Prusky, D. (2000). Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology 90.* pp: 553–559.
- Bernal, E., Díaz, D. (2005). Tecnología para el cultivo del Aguacate. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. *Manual Técnico 5.* pp: 241.

- Bonmatin, J.M., Laprévotte, O., Pevpoux, F. (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6, 541–556
- Bostock, R. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 545–580
- Bradford, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248–254
- Calvo, P., D.B. Watts, J.W. Kloepper, and Torbert, H.A. 2017. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 180. 56-70.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S., 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73. 181-213.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M. (2014). Plant Defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant Microbe Interactions* .27(2): 87–100.
- Chang, C., Kwok, SF., Bleecker, AB., Meyerowitz, EM. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to twocomponent regulators. *Science*, 262:539-544.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., Ecker, JR. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89:1133-1144.
- Chittoor, J., Leach, J., White, F. (1999) Induction of peroxidase during defense against pathogens, in: S.K. Datta, S. Muthukrishnan (Eds.), *Pathogenesis: Related Proteins in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL. p. 291.
- Choudhary, D., Prakash, A., Johri, B. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47. pp: 289-297.

- Compant, S., B, Duffy., J, Nowak., C, Clément., Barka, E. (2005) Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4951-4959.
- Conejero, V. (1996). La respuesta defensiva de las plantas y su posible manipulación biotecnológica. En *Biotecnología y Agricultura*. Fundación Bancaixa.
- Conrath, U., Pieterse, C., Mauch, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7. pp: 210-216.
- Cosby, W., Vollenbroich, D., Lee, Oh., Zuber, P. (1998) Altered srf expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *J. Bacteriol.* 180, 1438–1445
- Cosgrove, D. (1997). Assembly and enlargement of the primary cell Wall in plants. *Annual Review Cell and Developmental Biol.*, 13: 171-201.
- Dean, R., Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K.I.M.E., Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13. pp: 414–430.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), 358–365.
- Desender, S., Andrivon, D., Val, F. (2007). Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity. *Cellular Microbiology*. 9. pp: 21-30.
- Devendra, C., Bhavdish, J. (2009). Interactions of *Bacillus spp.* and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. Elsevier. 164(5): 493-513.

- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S., Wang L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defense—A genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3:371–390.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldsmith, E., Porat, R. (2002). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Biol. Control.* 92. pp: 393–399.
- De Vleeschauwer, D., Hofte, M. (2009). Rhizobacteria-induced systemic resistance. In *Plant Innate Immunity.* 51. Academic Press.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 547–552
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* Formatec. pp: 1043–1054.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), *Diseases of Fruit and Vegetables*, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 511–535.
- Ebel, J., Cosio, E. (1994). Elicitors of plant defense responses. *International Review Cytology.* 148. pp: 1-36.
- Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J. Chem. Ecol.* 39:869–878.
- Fan, B., Chen, X., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *J. Biotechnol.* 151. pp: 303–311.

- Farouk, S., Osman, M. (2011). The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7 (3): 05–22.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., Shabi, E. (2000). Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, Saint Paul. 90(6): 608-614.
- Frias, H. (1994). Propiedades nutritivas del aguacate. Departamento de Nutrición de GUAYAL S.A. Buenos Aires, Argentina. pp: 12.
- García, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., Perez, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6(3): 264-274.
- Glick, R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, Article ID 963401.
- Glick, R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109–117.
- Goswami, D., Thakker, J., Dhandhukia, P. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food Agric.* 2 (1), 1127500.
- Graham, J., Myers, M. (2011). Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-S-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. *Plant Dis.* 95. pp: 725–728.
- Guardado, L., Tovar, E., Chacón, L., López, U., Gutiérrez, P., Aguilera, S. (2017). Identification and characterization of a new *Bacillus atropaeus* strain B5 as

- biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). Microbiological Research.
- Gudiña, E., Fernandes, E., Rodrigues, A., Teixeira, J., Rodrigues, L. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.* 6 (59): 1–7.
- Goellner, K., Conrath, U. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European journal of Plant Pathology.* 121(3): 233-242.
- Goodman, R., Kira'ly, Z., Wood, K. (1986). *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*, University of Missouri Press, USA. p. 433.
- Hernández, R., Rojas, D., Contreras, M., Orozco, M. del C., Macías, H., Reyes, E., Valencia, C., Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83-92.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P., Ongena, M. (2011). The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology*, 13(11): 1824-1837.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Vater, J. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4), 363–378.
- Hyde, K., Cai, L., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J., Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Divers.* 39. pp: 1-17.
- INIFAP. (2017). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-INIFAP. (2017). *Agenda Técnica Agrícola de Michoacán*. Ciudad de México.

- Irtwange, S. (2006). Application of Biological Control Agents in Pre- and Post-harvest Operations. Agri. Eng. Intl. 8, Invited Overview 3, A & M University Press, Texas.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. Appl. Biochem. Biotechnol. 77, 223–233
- Jackson, O., Taylor, C. (1996). Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. Plant Cell. 8. pp: 1651- 1668.
- Jain, S., Vaishnav, A., Kasotia, A., Kumari, S., Gaur, R., Choudhary, D. (2013). Bacteria induced systemic resistance and growth promotion in *Glycine max* L. Merrill upon challenge inoculation with *Fusarium oxysporum*. Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci. 83. pp: 561567.
- Jain, S., Vaishnav, A., Kasotia, A., Kumari, S., Choudhary, D. (2014). Plant Growth-Promoting Bacteria Elicited Induced Systemic Resistance and Tolerance in plants. Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance. 2. pp: 109-132.
- Janisiewicz, J., Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruit. Annu. Rev. Phytopathol. 40. pp: 411–441.
- Janisiewicz, J. (1988). Biological control of postharvest diseases of apple with antagonists' mixtures. Phytopathology. 78. pp: 194–198.
- Jeong, Min-Hae., Lee, Young-seong., Cho, Jeong-young., Ahn, Young-Sang., Moon, Jae-Hak., Hyun, Hae-Nam., Cha, Gyu-Suk., Kim, Kil-Young. (2017). Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. Microbial Pathogenesis. Elsevier. 110. pp: 645-653.
- Jones, J., Dangl, J. (2006). The plant immune system. Nature .444. pp: 323–329.

- Kovats, K., Binder, A., Hohl, H. (1991). Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, *Planta* 183 484–490.
- Kloepper, J., Schroth, M. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes INRA, Angers, France. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, In Station de Pathologie Végétale Phytobactériologie. 2. pp: 879–882
- Kulimushi, P., Argüelles, A., Franzil, L., Steels, S., Ongena, M. (2017). Simulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Frontiers in Microbiology*. 8. pp: 850.
- KyungSeok, P., YungEun, C., Balaraju, K., SeWeon, L., JinWoo, P., Reddy, M., et al. (2013). Induction of systemic resistance against *Phytophthora capsici* and *Pectobacterium carotovorum* SCC1 by treatment of iturin derivatives in chili-pepper. In Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Other Microbials, Manila, Philippines, 21-24 April, 2013 Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture Asian PGPR. Society for Sustainable Agriculture. pp: 342-349.
- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M., Jancova, D. (2001). The role of enzymes in plantfungal pathogens interactions. *J. Pl. Dis. Prot.* 108(1): 89-111.
- Leclère, V., M. Béchet, A. Adam, J.S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, and Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4577- 4584.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol.*

- Leina, M., Tan, T., Wong, S. (1996). Resistance of *Hibiscus esculentus* L. and *Vigna sinensis* (L.) to *Pseudocercospora* and plant peroxidase activity in relation to infection, *Ann. Appl. Biol.* 129 (2) 197–206.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal *Annu. Rev. Microbiol.* 63. pp: 541 – 556.
- Mackey, D., McFall, A. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology.* 61. 1365– 1371.
- Madhusudhan, K., Deepak, S., Prakash, H., Agrawal, G., Jwa, N., Rakwal, R. (2008). Acibenzolar-S-methyl (ASM)-induced resistance against tobamoviruses involves induction of RNA-Dependent RNA polymerase (RdRp) and alternative oxidase (AOX) genes. *J. Cop. Sci. Biotech.* 11 (2): 127–134.
- Mahesh, H., Murali, M., Pal, M., Melvin, P., Sharada, M. (2017). Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-Proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Pl. Physiol. Biochem.* 117. pp: 12-23.
- Maldonado, R., Álvarez, E., Almaguer, G., Barrientos, F., García, R. (2007). Estándares nutrimentales para aguacatero “Hass”. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(1): 103-108.
- Martínez, S., Rojas, D., Hernández, R., Prieto, C., Orozco, Ma del C., Peña, J., Santoyo, G. (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science & Technology.* 24. 1349-1362.
- Mauch, B., Slusarenko, A. (1993). *Arabidopsis* as a model host for studying plant-pathogen interactions. *Trends Microbiology* .7. pp: 265-70.

- Mayer, A. Polyphenol oxidase in plants—recent progress, *Phytochemistry* 26 (1987) 11–20.
- Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331. doi:10.1016/j.phytochem.2006.08.006
- Mohammadi, M., Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4), 491–498.
- Naglaa, A., Heba, I. (2011). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World journal of agricultural sciences* 7(1): 78-85. ISSN 1817-3047.
- Niranjan Raj, S., Lavanya, S. N., Amruthesh, K. N., Niranjana, S. R., Reddy, M. S., & Shetty, H. S. (2012). Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, 60(2), 90–102.
- Ohme-Takagi M, Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7:173-182
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4): 1084-1090.
- Ongena M, Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115–125.
- Paull, R., Nishijima, W., Reyes, M., Cavaletto, C. (1997). Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya*). *Postharvest Biol. Technol.* 11. pp: 165–179.

- Panebianco, A., Castello, I., Cirvilleri, G., Perrone, G., Epifani, F., Ferrara, M., Vitale, A. (2015). Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in sicily. *Crop Protection*. 77. pp: 65–73.
- Paraszkiewicz, K. (2016). Biosurfactant enhancement factors in microbial degradation processes. In: Długoński, J. (Ed.), *Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application*. Caister Academic Press. pp: 167–182.
- Peypoux, F., Bonmatin J., Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553–563
- Pedapati, A., Aravindaram, K., Kumar, Satish., Singh, A., Vimala, B. (2015). Biocontrol a New Trend in Minimizing Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Plant Diseases and their Sustainable Management*. Cap. 5. pp: 99-111.
- Peiffer, J., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S., Dangl, J., Ley, R. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110. pp: 6548–6553.
- Pérez, P., Valencia, E., Altamirano, J., Pelagio, R., López, J., García, P., Macías, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, doi: 10.1007/s00709-017- 1109-9
- Pieterse, C., de Jonge, R., Berendsen, B. (2016). The soil-borne supremacy. *Trends in Plant Science*. 21. PP: 171-173.
- Pieterse, C., Ton, J., van Loon, L. (2001). Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden? *Agri. Biotech. Net* 3. 1-18.

- Prusky, D., Freeman, S., Dickman, M. (2000). *Colletotrichum*. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. . St. Paul: American Phytopathological Society Press. pp: 393.
- Prusky, D., McEvoy, J., Leverentz, R., Conway, W. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology*, Saint Paul. 91(11):1105-1113.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M., Barceló, I., Amaya, M., Medina, F., Alfonso, M., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.*, 122: 1119-1128.
- Rahman, A., Uddin, W., Wenner, G. (2014). Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Molecular Plant Pathology*.
- Rajaofera, M.J.N., Jin, P.F., Fan, Y.M., Sun, Q.Q., Huang, W.K., Wang, W.B., Shen, H.Y., Zhang, S., Lin, C.H., Liu, W.B., Zheng, F.C., Miao, W.G.(2017). Antifungal activity of the bioactive substance from *Bacillus atrophaeus* strain HAB-5 and its toxicity assessment on *Danio rerio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2002). Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Plant Soil*. 239(1): 55–68.
- Riveros, A. (2010). Inducción de resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Universidad de Tolima Colombia. pp: 261.
- Rodriguez, Fl., Esch, JJ., Hall, AE., Binder, BM., Schaller, GE., Bleecker, AB. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*, 283:996-998.

- Ryan, P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D., Dowling, N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 278. pp: 1-9.
- Sandoval, C. (2004). Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- Santoyo, G., Moreno, G., Orozco, Ma del C., Glick, R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183. pp: 92-99.
- Santoyo, G., Orozco Ma del C., Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science & Technology*. 22. pp: 855-872.
- Sellamuthu, P. S., Sivakumar, D., Soundy, P., Korsten, L. (2013). Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 81, 66–72.
- Sharma, C. K., Vishnoi, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. (2018). *A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean*. *Rhizosphere*, 5, 71–75. doi:10.1016/j.rhisph.2018.01.001
- SIAP. (2016). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- SIAP. (2018). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Singh, V., Deverall, B.J. (1984). *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions in British Mycological Society*. 83. pp: 487– 490.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., Ecker, JR. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSEFACTOR1. *Genes Dev*, 12:3703-3714.

- Spadaro, D., Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91. pp: 185–194.
- Thakur, M., Sohal, B. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochem*. pp: 1–11.
- Tripathi, P., Dubey, N. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32(3): 235–245.
- Trouvelot, S., Varnier, A., Allègre, A., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi, V., Klarzynski, O., Joubert, M., Pugin, A., Daire, X. (2008). A β -1.3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 21. pp: 232–243.
- Van Loon, L., Bakker, P. (2006) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Siddiqui, Z.A., ed.), pp. 39–66, Springer
- Van Loon, L., Van Strien, E. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 55 (2): 85–97.
- Van Loon, L. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103. pp: 753-765.
- Verhagen, B., Trotel, P., Couderchet, M., Hofte, M., Aziz, A. (2009). *Pseudomonas spp*, induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*. 12. pp: 1-12.

- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G. (1986) Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. (Tokyo) 39, 888–901
- Van Loon, L., Rep, M., Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 135–162
- Vitale, A., Panebianco, A., Polizzi, G. (2016). Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. Annals of Applied Biology. 169. pp: 36–45.
- Wang, X., Wang, L., Wang, J., Jin, P., Liu, H., y Zheng, Y. (2014). *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. PloS one, 9(11), e112494
- Wang, X., Wang, J., Jin, P., Zheng, Y. (2013). Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. International Journal of Food Microbiology, 164(2-3), 141–147.
- Waewthongrak, W., Leelasuphakul, W., McCollum, G. (2014). Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 Elicit Defense-Related Gene Expression in Citrus Fruit. PLoS ONE, 9(10), E109386.
- Waewthongrak, Waewruedee., Pisuchpen, Supachai., Leelasuphakul, Wichitra (2014). Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc) decay in citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 99. pp: 44-49.
- Wilson, C., Wisniewski, M. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27. pp: 425-441.
- Yakoby, N., Kobilier, I., Dinoor, A., and Prusky, D. (2000). pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. Applied and Environmental Microbiology .66. pp: 1026–1030.

- Yan, Z., Reddy, M., Ryu, C., Mc Inroy, J., Wilson, M., Kloepper, J. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by PGPR. *Phytopathology* 92. pp: 1329-1333
- Zhou, T., Schneider, K., LI, X. (2002). Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 180–185.