



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE LOS REYES

MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

“Efecto de las bacterias ácido lácticas como inhibidores
del hongo *Fusarium sp.*, en zarzamora (*Rubus sp.*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN AGROBIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:

ING. Montserrat Magaña Márquez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María de Lourdes Velázquez Hernández

Los Reyes de Salgado, Michoacán a 14, octubre, 2022



SÍNTESIS CURRICULAR

Montserrat Magaña Márquez originaria de Jiquilpan Michoacán nacida en el año 1994. Ingreso a la carrera de Ingeniera Bioquímica en Alimentos en el Instituto Tecnológico de Jiquilpan del año 2012-2017, obteniendo el título universitario en el año 2017 por el proyecto de innovación A-VOCADOS el cual llego a nivel estatal representando al Tecnológico de Jiquilpan. Del 2017 al 2019 trabajo como supervisora de calidad y encargada del departamento del desarrollo de nuevos productos en la empresa de alimentos COMAVO, S. DE R.L de C.V. Realizó la maestría en Agrobiotecnología en el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, Michoacán, desde 2019 al 2021.

AGRADECIMIENTO INSTITUCIONAL

Agradezco al Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes, por aceptarme ingresar a la Maestría de Agrobiotecnología e ingresar a los laboratorios para realizar los experimentos de la tesis. También agradezco al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, en el laboratorio 4 del cual es responsable el Dr. Juan José Valdez Alarcón y la estudiante de doctorado Adriana Zavala Hernández por facilitarme el acceso y uso de las instalaciones del CMEB.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Humberto Magaña Ceja y Martha Verónica Márquez Alonzo por el gran apoyo incondicional que me brindan día con día, ya que son mi gran motivación, así como el gran agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. María de Lourdes Velázquez Hernández agradeciendo su ayuda incondicional por este gran proyecto, por brindarme de sus grandes conocimientos en lo profesional, disfrute esta experiencia de la mano de mi directora de tesis y compañeros y amigos Bryan, Jenni, Mariela, a mi pareja Jorge Alberto ya que siempre ha estado incondicionalmente para mí, por último y en general doy infinitamente las gracias a cada una de estas personas ya que formaron parte de este gran proyecto este logro se consiguió gracias de todos ustedes.

ÍNDICE

ÍNDICE	V
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo general.....	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
I. MARCO TEÓRICO	13
Producción internacional, nacional y local de las berries.	13
Hongos patógenos en las berries	14
<i>Fusarium</i> sp., características de crecimiento, su ciclo, síntomas y signos de infección en zarzamora	¡Error! Marcador no definido.
Marchitamiento por <i>Fusarium</i> sp., en planta	16
La planta y su desarrollo de la enfermedad por el ataque <i>Fusarium</i>	17
Control	18
Lactobacilos aislados de fermentados con propiedades antifúngicas	19
Metabolitos producidos por lactobacilos que inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos	23
Pulque, bebida fermentada	24
II. MATERIALES Y METODOS	26
Material biológico y aislamiento de hongos patógenos de zarzamora	26
Material biológico, aislamiento e identificación de BAL	26
Catalasa	27
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de BAL contra el hongo fitopatógeno <i>Fusarium</i> sp. ..	27
Aislamiento del ADN del <i>Lactobacilos</i> sp.	29
Aislamiento del ADN del hongo <i>Fusarium</i> sp.	29
Electroforesis del ADN.....	30
III. RESULTADOS	32
Aislamiento de lactobacilos de pulque.....	32
Aislamiento del hongo <i>Fusarium</i> sp., del cultivo de zarzamora	34
Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>Fusarium</i> en presencia de lactobacilos... ..	36
Prueba en tubos con cámara de Durham	42

Caracterización molecular de aislamientos bacterianos <i>Lactobacilos</i> sp., y del hongo <i>Fusarium</i> sp.	43
IV. Conclusiones	46
V. Recomendaciones	46
Referencias Bibliográficas	27
Anexo	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MUNICIPIOS LÍDERES POR VALOR DE PRODUCCIÓN EN EL AÑO 2018. FUENTE: INFOGRAFÍA AGROALIMENTARIA 2018.....	14
FIGURA 2 MARCHITAMIENTO DE PLANTAS POR <i>FUSARIUM</i> . A) DECOLORACIÓN MARRÓN SEVERA DE LOS TEJIDOS VASCULARES A LO LARGO DEL TALLO DE LA PLANTA INFECTADA. B) TEJIDOS VASCULARES OBSTRUIDOS Y DECOLORADOS EN UNA SECCIÓN TRANSVERSAL DE UN TALLO INFECTADO. C)-D) PLANTAS INFECTADAS MARCHITAS Y MUERTAS EN EL CAMPO. E) LAS HOJAS INFERIORES DE LA PLANTA DE BANANO INFECTADA SE MARCHITAN, SE VUELVEN MARRONES Y MUEREN. G) DESCOLORACIÓN VASCULAR DE TEJIDOS INFECTADOS. FUENTE: AGRIOS 2005.....	17
FIGURA 3. CICLO PATOLÓGICO DE LA MARCHITEZ OCASIONADA POR <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> , <i>F. LYCOPERSICI</i> . FUENTE: AGRIOS 2005.....	19
FIGURA 4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE BAL EN EL AGAR MRS. FUENTE: BIANCHINI, 2015.....	22
FIGURA 5. AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS EN DILUCIONES SERIALES DE PULQUE. (A) 10^{-6} INCONTABLES UFC/ML; (B) 10^{-7} 42 UFC/ML; (C) 10^{-8} 8 UFC/ML; (D) 10^{-9} SIN CRECIMIENTO.....	32
FIGURA 6. LACTOBACILOS AISLADOS DEL PULQUE OBSERVADOS A 40X.	33
FIGURA 7 REACCIÓN EN PRUEBA DE CATALASA NEGATIVA EL AISLAMIENTO DE LA BACTERIA L4 Y L5.....	34
FIGURA 8 MARCHITAMIENTO DE PLANTA DE ZARZAMORA.....	35
FIGURA 9 RAÍZ DE ZARZAMORA DAÑADA POR <i>FUSARIUM SPP</i>	35
FIGURA 10. AISLAMIENTO DE <i>FUSARIUM SP</i> . A) CRECIMIENTO EN MEDIO PDA. B) Y C) MICROCONIDIAS DE <i>FUSARIUM SP</i>	36
FIGURA 11 AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS CON <i>FUSARIUM SP</i> ENSAYO CON LA TÉCNICA DE QUATTRINI 2018.	37
FIGURA 12 AISLAMIENTO DE <i>LACTOBACILOS</i> CON <i>FUSARIUM SP</i> ENSAYO #1 BASADO A LA TÉCNICA AHLBERG 2016.	38
FIGURA 13 AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS CON <i>FUSARIUM SP</i> ENSAYO #2 BASADO A LA TÉCNICA AHLBERG 2016.	39
FIGURA 14 AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS CON <i>FUSARIUM SP</i> ENSAYO #3 BASADO A LA TÉCNICA AHLBERG 2016.	40
FIGURA 15 REACCIÓN EN TUBOS CON CÁMARA DE DURHAM.	42
FIGURA 17 SECUENCIACIÓN GENÉTICA DEL <i>LACTOBACILOS SP</i>	45
FIGURA 18 SECUENCIACIÓN GENÉTICA DEL HONGO <i>FUSARIUM SP</i>	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS EN LA ZARZAMORA. FUENTE: ORIENTACIONES PARA EL CULTIVO DE LA ZARZAMORA, 2008.....	15
TABLA 2. REPORTE DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE BAL Y SU FUENTE DE AISLAMIENTO.	21
TABLA 3. ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS CONTRA EL CRECIMIENTO DE ESPORAS DE CULTIVOS FÚNGICOS SELECCIONADOS.	24
TABLA 4. INTERPRETACIÓN DE LAS COLONIAS SELECCIONADAS PARA LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO, EN LOS ASPECTOS DE FORMA TAMAÑO Y COLOR.	33
TABLA 5. PH DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP., EN MEDIO MRS LÍQUIDO DURANTE SU CRECIMIENTO.	34
TABLA 6 RESULTADOS DE INHIBICIÓN BASADO A LA TÉCNICA DE QUATTRINI 2018.....	41
TABLA 7 RESULTADOS DE INHIBICIÓN BASADO A LA TÉCNICA DE AHLBERG 2016.....	42

RESUMEN EN ESPAÑOL

Actualmente la zarzamora (*Rubus* sp.) cuenta con una gran área de cultivo en la región de los Reyes de Salgado, Michoacán, con gran importancia agrícola debido a que cada año aumenta la producción de esta frutilla, sin embargo, hoy en día se usan muchos agroquímicos para su producción dañando los suelos y la gran problemática que tiene los productores contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. El comprobar el efecto que tienen las bacterias ácido lácticas contra este hongo patógeno fue la parte fundamental y objetivo de este trabajo. El hongo *Fusarium* sp., se aisló de las raíces de la zarzamora y las bacterias ácido lácticas fueron aisladas del pulque de la región de Jiquilpan, Michoacán, comprobando con ayuda de la tinción de Gram que eran bacilos Gram negativos, junto con las características de morfología macroscópica y microscópica tanto de bacterias ácido lácticas como del hongo *Fusarium* sp., se verificó la inhibición de este hongo fitopatógeno *Fusarium* sp., con bacterias ácido lácticas.

Palabras clave: zarzamora, *Lactobacillus* sp., *Fusarium* sp.,

Abstract

Currently the blackberry (*Rubus* sp.) has a large area of cultivation in the region of the Reyes de Salgado, Michoacán, with great agricultural importance in the region because each year the production of this blackberry increases, however, today they are used many agrochemicals for its production damaging the soil and the great problem that producers have against the phytopathogenic fungus *Fusarium* sp. Verifying the effect that lactic acid bacteria have against this pathogenic fungus on the seedling and/or blackberry fruit is the fundamental and objective part of this work. The fungus *Fusarium* sp., was isolated from the roots of the blackberry and the lactic acid bacteria were collected by means of pulque from the Jiquilpan, Michoacán region, verifying with the help of Gram stain that they were Gram negative bacilli, together with the characteristics of macroscopic and microscopic morphology of both lactic acid bacteria, and the fungus *Fusarium* sp., having as satisfactory results the inhibition of this phytopathogenic fungus *Fusarium* sp., with lactic acid bacteria.

Keywords: Blackberry, lactic acid bacteria, *Fusarium* sp.,

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se consideran las berries como una de las frutas preferidas en México y todo el mundo, formando parte de su consumo diario, debido a su fácil accesibilidad y su aporte nutricional (HortiCultivos, 2017).

Como el primer productor de berries a nivel mundial se encuentra el estado de Michoacán. Hoy en día la producción de berries en nuestro país de México ha crecido de manera considerable en los últimos diez años y se espera que para el 2030 se duplique. Michoacán se ha consolidado, por séptimo año consecutivo, como el productor número uno de berries, además de ser el líder en producción de zarzamora, posicionándose al municipio de Los Reyes, como la capital mundial de esta frutilla (HortiCultivos, 2017).

El deterioro de los alimentos es un problema importante en la actualidad para la industria alimentaria, lo que conlleva al desperdicio de alimentos, a las altas pérdidas económicas para fabricantes, consumidores y un impacto negativo en las marcas, entre las causas, se puede encontrar la contaminación fúngica en varias etapas de la cadena alimentaria ya sea en postcosecha, durante el procesamiento o almacenamiento. El desarrollo de hongos conduce a defectos que varían desde deterioro visual hasta cambios notables de olor, sabor o textura, pero también tienen impactos negativos en la salud, a través de la producción de micotoxinas por algunos hongos, para evitar el deterioro microbiano y, por lo tanto, poder extender la vida útil del producto, se utilizan diferentes tratamientos, incluidos los fungicidas o conservantes químicos, demostrándose hoy en día diferentes cepas de BAL (bacterias ácido lácticas) que logran inhibir el desarrollo de hongos en la superficie de algunos frutos (Leyva et al., 2017).

Uno de los problemas del cultivo de la zarzamora es la presencia de hongos patógenos, dicho problema es cada vez más frecuente y con mayor virulencia afectando la producción de este cultivo a nivel local. La producción de zarzamora es una fuente importante de ingresos en el estado de Los Reyes de Salgado, Michoacán, y en los últimos años ha ganado aceptación en el mercado mundial. Una nueva alternativa para el control de hongos fitopatógenos en la zarzamora es la obtención de sustancias que inhiban el crecimiento de los hongos como lo son los *Lactobacilos* aislados de alimentos fermentados. La posibilidad de encontrar una BAL que

logre solucionar el problema del hongo patógeno *Fusarium* en la zarzamora para poder ayudar a los productores. Para la elaboración de dicho producto, es necesario aislar BAL del pulque de la región de Jiquilpan, Mich., que producen sustancias que inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos y aislar el hongo fitopatógenos *Fusarium* de la zarzamora de la región para verificar la eficacia de inhibición del crecimiento de dichos hongos por las BAL aisladas.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las situaciones a las que se enfrentan los productores de zarzamora en la zona de los Reyes, Michoacán, por el hongo patógeno *Fusarium* sp., que se encuentran en sus frutos es la pérdida de su valor y/o producción dentro del mercado, es importante encontrar alternativas que resuelva dicho problema a las que se enfrentan los productores de esta región. Una de las alternativas amigable con el medio ambiente es encontrar un lactobacilo (bacteria ácido láctica) que sea capaz de inhibir o eliminar estos patógenos. Al encontrar un lactobacilo para inhibir el desarrollo de estos patógenos se busca dar un valor al fruto cuando este no tiene precio en el mercado, debido a que no cumple con las especificaciones de calidad para su exportación. De esta manera se estará contribuyendo a resolver esta problemática y beneficiar a los productores de la región de los Reyes, Michoacán.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente una de las problemáticas en el cultivo de la zarzamora es la presencia de hongos patógenos afectando la producción de este cultivo a nivel local, actualmente la producción de zarzamora es una fuente de ingresos en el estado de Michoacán y en los últimos años ha ganado aceptación en el mercado mundial. La posibilidad de encontrar un lactobacilo (bacterias ácido láctica) que logre inhibir el crecimiento del hongo patógeno *Fusarium* sp., sentara las bases para que en un futuro se genere un producto que ayude a los productores con este problema. En este proyecto se aislará el hongo patógeno *Fusarium* sp., y el aislamiento de bacterias ácido lácticas productores de sustancias antifúngicas.

HIPÓTESIS

Las bacterias ácido lácticas aisladas del pulque son productores de sustancias antifúngicas que inhiben el crecimiento de *Fusarium* sp.

OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Identificar bacterias ácido lácticas del pulque de la región de Jiquilpan, Michoacán, que produzca inhibidores contra el hongo patógeno *Fusarium* sp., de las zarzamoras que se cultivan en la región de los Reyes, Michoacán.

1.1.2 Objetivos específicos

1.1.2.1 Aislar lactobacilos, del pulque productores de sustancias antifúngicas.

1.1.2.2 Aislar el hongo patógeno *Fusarium* sp., de las zarzamoras.

1.1.2.3 Medir la actividad antifúngica *in vitro* de las bacterias ácido lácticas contra hongos fitopatógenos.

1.1.2.4 Identificar genéticamente los aislados de lactobacilos y *Fusarium* sp.

I. MARCO TEÓRICO

Producción internacional, nacional y local de las berries.

La zarzamora es una fruta con mayor producción en el estado de Michoacán, teniendo una alta demanda de exportación encontrándose dentro de la lista de los principales productores. Dada la predilección existe una preferencia por la exportación de estos productos, en los cuales México se posiciona como segundo lugar mundialmente, teniendo a Michoacán consolidado como el productor número uno de berries, posicionando al municipio de Los Reyes como la capital mundial en la producción de zarzamora. De acuerdo con el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) y de la Asociación Nacional de Exportadores de Berries, A.C. (AneBerries), Michoacán está por encima de Baja California Norte y Jalisco, con una superficie sembrada de aproximadamente 25 mil hectáreas (ha). En total existen alrededor de 33 mil ha, sembradas de berries en México, donde Michoacán tiene una posición geográfica y climatológica privilegiada, al contar con el clima idóneo para producir estas frutillas y la producción puede ser distribuida fácilmente a todo el país, e incluso para su exportación ya que cuenta con una superficie plantada de 12 mil 100 ha de zarzamora, donde se producen 128 mil toneladas, lo que representa un valor de producción de 4 mil millones de pesos, siendo el municipio de Los Reyes de Salgado el número uno en producción (HortiCultivos, 2017).

Los Reyes de Salgado Michoacán cuenta con una superficie plantada de 6 mil 100 ha, con una producción de 64 mil toneladas, lo que representa un valor de producción de 1 mil 979 millones 983 mil 250 pesos, lo que representa el 50 % del valor de la producción estatal. Los principales mercados de exportación de berries mexicanas, son: Estados Unidos (94%), Holanda, Reino Unido, Alemania, Francia, Italia, Bélgica y España (4%), Canadá (1%) y algunos otros destinos, como Hong Kong. Actualmente se busca que autoridades y productores trabajen para obtener un sello de calidad a estos frutos a través de una normatividad sencilla que tendrá que diseñarse juntamente con los industriales, empaques, exportadores y gobierno estatal (HortiCultivos, 2017).

Los municipios líderes por valor de producción de zarzamora se muestran en la Figura 1 (HortiCultivos, 2017).



Figura 1. Municipios líderes por valor de producción en el año 2018. Fuente: Infografía Agroalimentaria 2018.

Hongos patógenos en las berries

La principal problemática en el cultivo de la zarzamora es el ataque por hongos patógenos causando conflictos para cada uno de los productores de estos frutos. Las principales enfermedades causadas por hongos que afectan a la zarzamora haciendo alusión a los agentes causales y los síntomas que se exhiben en los diferentes órganos de la planta cuando son afectados se resumen en la Tabla 1 (Issuu, 2008).

***Fusarium* sp., características de crecimiento, su ciclo, síntomas y signos de infección en zarzamora**

Fusarium sp., es un patógeno de hongo ascomiceto filamentosos productores de toxinas de importancia agrícola cosmopolita (Ma et al., 2013).

Esta enfermedad se caracteriza por la pudrición basal la cual se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial causando una limitante en las zonas de producción. Se manifiesta con coloraciones café en las puntas de las hojas, cuando el hongo patógeno logra extenderse hasta la base de las hojas se van tornando rojizas o púrpuras y presenta diversos síntomas como enanismo en la planta, los bulbos esponjosos y tallos de consistencia roja, blanda y raíces con coloraciones café algunas de las sintomatologías antes mencionadas han sido reportadas en plantas infectadas por *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. solani* y *F.*

acuminatum encontrados en Estados Unidos, Turquía, Venezuela, Uruguay, Países Bajos, Japón, Serbia, España y México (Delgado-Ochoa et al., 2016).

Tabla 1. Enfermedades causadas por hongos en la zarzamora. Fuente: Orientaciones para el cultivo de la zarzamora, 2008

ENFERMEDAD	FIGURAS	SÍNTOMAS
<i>Botrytis cinérea</i>		Produce la pudrición del fruto
<i>Verticillium</i>		Produce marchitez.
Roya		Ataca a las hojas, se manifiesta con pústulas anaranjadas que se desarrollan en hoja y tallos.
Oídio		Su principal síntoma es que las hojas se cubren principalmente en la parte axial con una capa algodonosa de micelio gris blancuzco. Con un fuerte ataque a las hojas se tornan color amarillas y posteriormente se secan.
<i>Cercospora</i>		Los síntomas aparecen después de cinco días con condiciones de alta humedad y calor. Formando manchas, relativamente redondas con el centro gris claro y el borde café rojizo.
Antracnosis		Producen manchas en hojas. La apariencia es variada, dependiendo de las especies atacadas.
<i>Fusarium sp.</i>		Desencadena un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas de las plantas.

La infección inicialmente se asemeja a la de un patógeno que depende de un huésped vivo (biotrófico), pero finalmente pasa a matar y consumir células del huésped (necrotrofico). Las enfermedades por *Fusarium* pueden iniciarse en las raíces a partir del inóculo del suelo o en partes de la planta que se encuentran por encima del suelo a través del aire o el agua. *F.*

oxysporum, por ejemplo, inicialmente penetra en las raíces de forma asintomática; posteriormente coloniza el tejido vascular y desencadena un marchitamiento masivo, necrosis y clorosis de las partes aéreas de las plantas (Ma et al., 2013).

F. oxysporum ocupa el quinto lugar entre los 10 principales patógenos fúngicos de las plantas transmitido por el suelo, causando un devastador marchitamiento vascular en más de 100 especies de plantas, la devastadora marchitez vascular causada por este hongo se ha convertido en una amenaza para los agricultores de todo el mundo, reduciendo la producción de cultivos de importancia económica. Las plantas reconocen el ataque de *Fusarium* para una defensa eficaz, así como señales endógenas que se originan en sus propias paredes celulares la cual es la primera barrera que encuentra el *F. oxysporum* durante el ataque y esta barrera define la fuerza primaria o básica de las plantas para encontrarla y restringirla (Husaini et al., 2018).

Marchitamiento por *Fusarium* sp., en planta

Ya mencionado anteriormente, el ataque de *Fusarium* sp., afecta y ocasiona pérdidas económicas causando marchitamiento viéndose favorecidos ampliamente por las condiciones ambientales. Este marchitamiento causado por *Fusarium* es una de las enfermedades más prevalentes y dañinas ya que es más propensa en climas cálidos y lugares arenosos de las regiones templadas, este marchitamiento se caracterizado por el achaparramiento de las plantas, las cuales en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren. Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después ocurre la epinastia de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los pecíolos, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas, si la infección es severa y el patógeno cuenta con un clima favorable, es muy probable que en plantas adultas pueden marchitarse y morir repentinamente. Cuando las raíces también son infectadas después de un período inicia surge el achaparramiento debido a que se pudren sus raíces laterales más pequeñas. Al realizar cortes transversales del tallo, cerca de la base de la planta infectada, se logra ver un anillo color café en el área de los haces vasculares y el avance de la decoloración hacia la parte superior de la planta, esto depende de la gravedad de la enfermedad que se encuentra la planta. Sin embargo, es más frecuente que en las plantas adultas ocurra epinastia foliar y un previo aclaramiento de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca el efecto de achaparramiento, así como el amarillamiento de las hojas inferiores, el marchitamiento de sus hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis, hasta su muerte, como se muestra en la Figura 2 (Agrios G. , 2005).

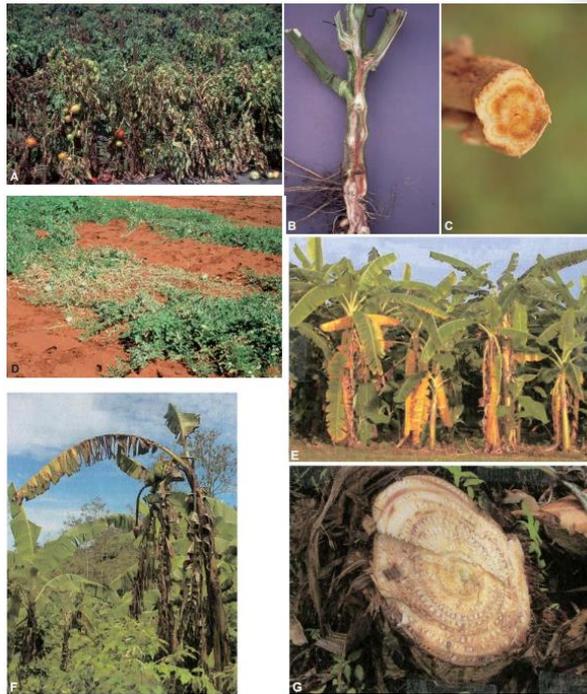


Figura 2 Marchitamiento de plantas por *Fusarium*. A) decoloración marrón severa de los tejidos vasculares a lo largo del tallo de la planta infectada. B) Tejidos vasculares obstruidos y decolorados en una sección transversal de un tallo infectado. C)-D) plantas infectadas marchitas y muertas en el campo. E) Las hojas inferiores de la planta de banano infectada se marchitan, se vuelven marrones y mueren. G) Descoloración vascular de tejidos infectados. Fuente: Agrios 2005.

La planta y su desarrollo de la enfermedad por el ataque *Fusarium*

Una de las características es el micelio incoloro al principio, pero conforme va madurando adquiere un color amarillo pálido o hasta una tonalidad rosa pálido o un poco púrpura. Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales (Figura 3). **Microconidios**, los cuales tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones de las plantas hospedantes que ha infectado. **Macroconidios**, estas esporas típicas de "*Fusarium*" aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno. Y por último las **Clamidosporas**, que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo. Estas tres esporas se forman en los cultivos del hongo y quizá también en el suelo, aunque cabe decir que sólo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo. Este patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas (Figura 3). Una de

las formas que se propaga es a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, o bien también puede ser a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos, es normal y frecuente que una vez que un área ha sido infectada por *Fusarium* se mantenga así por tiempo indefinido y cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, los tubos germinales de las esporas o el micelio penetren directamente en las puntas de las raíces, por heridas o bien al nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del este hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz hasta llega a los vasos xilémicos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia el tallo y la corona de la planta. El hongo invade en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, hasta llegar a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente, estas esporas son diseminadas hacia nuevas plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores (Agrios G. , 2005).

La humedad del suelo y la temperatura relativamente cálida son condiciones que permiten a las plantas que sean infectadas por este hongo, cuando el hongo llega a penetrar o contamina la semilla es frecuente que los frutos infectados se pudran y se desprendan e incluso después de haber sido cosechados sus semillas infectadas son tan ligeras que el hongo se eliminan durante los métodos de extracción y limpieza de las semillas, lo cual hace que casi no tengan importancia alguna en la propagación del hongo (Agrios G. , 2005).

Control

La esterilización del suelo es demasiado costosa para que se lleve a cabo en el campo, pero siempre debe practicarse en el caso de invernadero. El uso de semillas sanas y de trasplantes es de hecho obligatorio. Se han llevado a cabo un gran número de investigaciones en los últimos años en torno a la posibilidad de controlar biológicamente la marchitez de muchos cultivos ocasionada por *Fusarium*. El calentamiento solar (solarización) del terreno cubriéndolo con una película de plástico transparente durante el verano, disminuye también la incidencia de la enfermedad. Aun cuando sean prometedores estos tratamientos, hasta ahora ninguno de esos métodos se utiliza para controlar eficientemente los marchitamientos vasculares por *Fusarium* (Agrios G. , 2005).

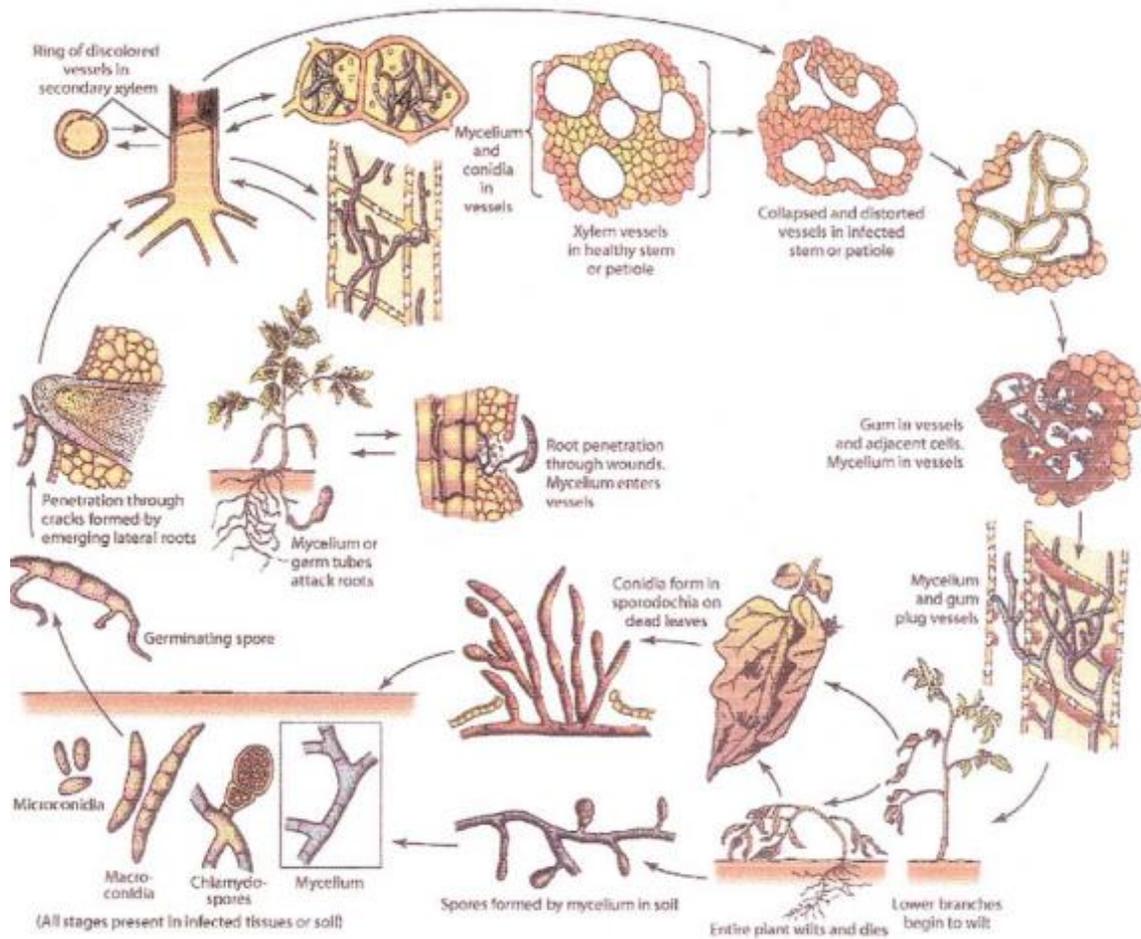


Figura 3. Ciclo patológico de la marchitez ocasionada por *Fusarium oxysporum*, f. *lycopersici*. Fuente: Agrios 2005.

Lactobacilos aislados de fermentados con propiedades antifúngicas

El suelo es un medio donde existen una gran cantidad de microorganismos, entre ellos están los hongos que son de dos tipos, hongos saprofitos y hongos patógenos; los hongos saprofitos se caracterizan por crecer en materia vegetal muerta y los hongos patógenos en materia vegetal viva, por lo tanto, son patógenos de plantas y producen micotoxinas. Existen microorganismos o insectos en el medio ambiente o en las plantas que secretan sustancias inhibidoras de microorganismos patógenos y el utilizar estos organismos o sustancias para inhibir el crecimiento de los patógenos se le llama control biológico. Estudios indican que el pH y la temperatura influye en la eliminación de toxinas, desde entonces muchos estudios han explicado el control del desempeño de los hongos, levaduras y las bacterias sobre el crecimiento de ciertos hongos (Bianchini, 2015).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son otra fuente potencial de organismos que podrían ofrecer biocontrol en hongos produciendo agentes antifúngicos naturales. En el 2014 el grupo de BAL consta de seis familias y al menos 38 géneros, incluidos *Lactobacillus* y/u otros según la taxonomía actual. Actualmente este grupo se conoce como BAL y algunos de ellos se usan tradicionalmente como cultivos iniciadores para las fermentaciones de lácteos, vegetales, cereales y carne ya que contribuyen al desarrollo del sabor y a su conservación. Trias y col., (2008) determinaron la aparición de BAL en frutas y verduras declarando una mayor concentración en verduras listas para su consumo encontrándolas en el rango de 10^2 - 10^6 UFC/g. Las BAL también se encuentran comúnmente en los alimentos al por menor, por lo tanto, se puede decir que el público ya está consumiendo BAL en muchos productos listos para comer. Además, se han utilizado para fermentar alimentos durante muchos años, lo que sugiere la naturaleza de no ser tóxicos los metabolitos producidos por estos organismos. Se cree que la actividad metabólica del BAL puede contribuir de varias maneras al control de patógenos bacterianos, la mejora de la vida útil y las cualidades sensoriales, así como también puede tener aplicaciones para evitar el crecimiento de hongos (Bianchini, 2015).

Previamente se ha reportado la inhibición de hongos por BAL, sin embargo, pocos informes describen sobre la caracterización de compuestos o mecanismos de acción de estas bacterias, algunas de las publicaciones que han demostrado la actividad antifúngica de BAL se ilustra en la Tabla 2 y la actividad antifúngica de estas BAL en la Figura 4 en agar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS). Los *Lactobacillus paracasei* aislados de cultivos de masa fermentada ha demostrado actividad antifúngica contra varias especies de tres géneros de hongo: *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium*. Los resultados del experimento indicaron que *L. paracasei* tiene una fuerte actividad contra los tres hongos (Bianchini, 2015).

Hassan y Bullerman (2008) evaluaron el efecto de BAL en la germinación conidial de *Aspergillus*, *Penicillium* y especies de *Fusarium*. Sus resultados indicaron que 63 cepas mostraron alta inhibición de germinación, (más del 70%) contra *Fusarium graminearum*, con una moderada inhibición (40–70%) contra *Penicillium sp.*, y con una baja inhibición (menos del 40%) en la germinación conidial de *Aspergillus niger*. Se evaluó el crecimiento vegetativo de estos hongos, con muy pocas cepas BAL capaces de inhibe el crecimiento vegetativo dando como resultados observados por Gerez (2009), donde hace mención que de las 95 cepas analizadas, cuatro de las cepas mostraron actividad contra *Fusarium graminearum* (*L. Plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, y dos cepas de *Lactobacillus brevis*) (Bianchini, 2015).

Tabla 2. Reporte de la actividad antifúngica de BAL y su fuente de aislamiento.

Bacterias ácido-lácticas aisladas	Fuente	Actividad
<i>Streptococcus lactis</i> C10	Quesos	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> var, <i>rhamnosus</i>	NRRL colección cultural	Ampleo espectro
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Tracto gastrointestinal humano	Ampleo espectro
<i>Lactobacillus casei</i> sub., <i>pseudopantarum</i>	Inóculo de ensilaje	<i>Aspergillus flavus</i> subsp. <i>parasiticus</i> ,
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queso cheddar y leche cruda de buffalo	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Fusarium</i> spp.
<i>Lactobacillus casei</i>	Productos lácteos verduras y frutas	<i>Penicillium</i> spp.
<i>Lactobacillus sanfrancisco</i> CBI	De masa fermentada	<i>Fusarium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Monilia</i> spp.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	De masa fermentada	<i>Eurotium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Endomyces fibuliger</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium graminearum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393	Ensilaje de hierba	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Kluyveromuces marxianus</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Fusarium</i> spp.
<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076 y VTTE-79098	Cerveza y cabbae	<i>Fusarium</i> spp
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Leche cruda, queso, yogurt, aceitunas y masa madre, así como ensilaje de hierbas y hierbas.	Levaduras <i>Penicillium</i> spp.
<i>Weissella cibaria</i>	Sémola de trigo duro	<i>Aspergillus niger</i> <i>P. roqueforti</i> <i>E. fibuliger</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> .	Pan de masa fermentada	<i>Fusarium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Entorno de cereales (patentado como cepa DSM)	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Fusarium culmorum</i>

Fuente: Bianchini, 2015

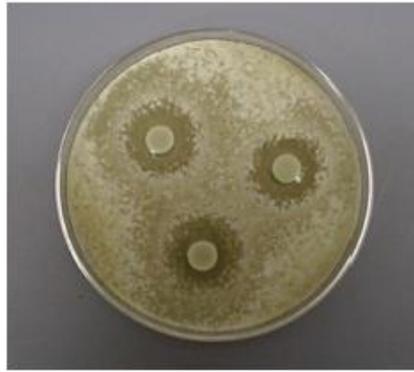


Figura 4. Actividad antifúngica de BAL en el agar MRS. Fuente: Bianchini, 2015.

Mauch y col., (2010) estudiaron a profundidad el efecto de *Lactobacillus brevis* sobre *Fusarium culmorum*, donde observaron que la germinación de *F. culmorum* se retrasó completamente durante 6 o 48 h, dependiendo de la cepa de *L. brevis*. Algunos estudios han tratado de demostrar el potencial del crecimiento entre estos dos grupos de organismos cultivándolos al mismo tiempo, como por ejemplo un informe mostró la actividad antifúngica de *L. rhamnosus* aislada de una salsa tártara checa, cuando las bacterias y el hongo crecen juntas (Bianchini, 2015).

La investigación científica recomienda que la actividad inhibitoria de estas bacterias en los hongos puede producir metabolitos tales como ácidos orgánicos (en particular, ácidos láctico, propiónico y acético), dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, y otros metabolitos de pequeño peso molecular; así como la producción de proteínas compuestas, o péptidos de bajo peso molecular y disminución del pH causado por la producción de ácido o una combinación de estos factores, mientras se realizaba también el estudio de la actividad inhibitoria de BAL sobre *Penicillium digitatum* y *Geotrichum citri-aurantii*, Gerez y col., (2010) informaron que *L. Plantarum*, *L. casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* y *Pediococcus pentosaceus* son capaces de inhibir hongos fitopatógenos (Bianchini, 2015).

El efecto de BAL aislado de frutas y verduras frescas fue estudiado por Trias y col., (2008). La actividad antifúngica *in vitro* de *Lactobacillus plantarum* contra el hongo ocratoxigénico *Aspergillus carbonarius* fue demostrado en este estudio, donde se menciona cuatro diferentes hongos aislados de bayas de uva las cuales fueron co-cultivadas con cuatro cepas diferentes de *L. plantarum* en placas de Agar Extracto de Malta (MEA) a 30 °C, las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento del hongo hasta un 88% y se redujo significativamente la producción de toxinas hasta un 100%. Además, se evaluó *L. plantarum* como agente de control biológico

contra el crecimiento de *A. carbonarius* y la producción de ocratoxina en uvas de mesa (Lappa et al., 2018)

Quattrini y col., exploraron el potencial de 25 cepas de *L. plantarum* aisladas de cereales y productos lácteos, probando características relacionadas con la actividad antifúngica y la calidad nutricional, hace mención de la inhibición de hongos, donde se destacan la capacidad de las cepas para inhibir *Penicillium roqueforti*, *Mucor circinelloides* y hongos micotoxinogénicos como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium verticillioides* en granos de cereales. La cepa de *L. plantarum*, demostró una alta capacidad inhibidora del crecimiento de hongos y fue capaz de producir 1,2-dihidroxibenceno, ácido benzoico, ácido p-hidroxifeniláctico y ácido 3-feniláctico, en donde este último compuesto es descrito como un inhibidor antifúngico eficaz, el cual fue el más abundante y su concentración se incrementó aún más mediante la adición de fenilalanina y ácido fenilpirúvico en el medio de crecimiento (Quattrini et al., 2018).

Metabolitos producidos por lactobacilos que inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos

El *L. plantarum* se aisló de koumiss (también conocido como kumiss o coomys) elaborado tradicionalmente a partir de leche de yegua por fermentación, nacido de las tribus nómadas de Asia Central, Koumiss es ligeramente alcohólico y tiene un sabor amargo. Koumiss es similar al *kefir* (Dhewa et al., 2015) (Wang et al., 2012). Produce un amplio espectro de compuestos antifúngicos, todos los cuales fueron activos contra hongos patógenos de plantas en un ensayo de placa de agar. Se extrajeron dos compuestos antifúngicos principales del sobrenadante libre de células del *L. plantarum*, el ácido 3-feniláctico y el ácido bencenoacético, el éster 2-propenílico Tabla 3 (Wang et al., 2012).

El aumento reciente en la demanda de alimentos libres de conservantes químicos ha llevado a la comunidad científica a desarrollar formas naturales de conservación de alimentos, por lo tanto, la bioconservación podría considerarse como la gran alternativa frente a las químicas debido a su potencial para aumentar la vida útil y los valores nutricionales de los alimentos. En el presente estudio, las especies bacterianas productoras de ácido láctico se aislaron del agua de enjuague de arroz donde se reconocieron mediante la secuenciación del gen RNAr 16S como *L. plantarum* BCH-1 y *L. coryniformis* BCH-4 en donde los metabolitos antifúngicos de ambas especies de *Lactobacillus* se extrajeron con disolventes basados en su polaridad con el acetato

de etilo mostrando una notable actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* por ensayo de difusión de disco (Anwer et al., 2020).

Tabla 3. Espectro de actividad antifúngica de compuestos contra el crecimiento de esporas de cultivos fúngicos seleccionados.

Patógenos	Ácido 3-fenilactico	Ácido bencenoacético, éster 2-propenílico
<i>Phytophthora drechsleri</i> Tucker	+++	+++
<i>Glomerella cingulada</i>	++	++
<i>Botrytis cinérea</i>	++	++
<i>Penicillium citrinum</i>	+	+++
<i>Penicillium digitatum</i>	++	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	++

- Sin inhibición visible. Zona de inhibición de + 0.1~7 mm. ++ Zona de inhibición de 7.1~14 mm. +++> 14 mm de zona de inhibición. Fuente: Wang et al., 2012.

Pulque, bebida fermentada

El pulque representa un ícono mexicano y es quizá la bebida alcohólica mexicana más tradicional y antigua, los antiguos aztecas lo llamaban *metoctli* o vino de agave (del idioma náhuatl *metl* = agave o maguey + *octli* = vino): se referían a la bebida estropeada con desagradable olor y sabor como *poliuhquioctli* (*de poliuhqui* = estropeado o podrido + *octli* = vino), por lo que probablemente sea de este último término que los españoles adoptaron la palabra *pulque* para designar la bebida recién elaborada (Escalante et al., 2012).

El pulque es producido por la fermentación de la savia conocida como *aguamiel*, que se extrae de varias especies de maguey como *Agave atrovensis* y *A. americana*. Esta bebida se produce y consume actualmente principalmente en los estados centrales de México, su desarrollo de viscosidad es debido a la síntesis de exopolisacáridos y su contenido de alcohol son los principales parámetros para determinar el grado de fermentación (Escalante et al., 2008).

Los productores de pulque recolectan savia de agaves, justo cuando el meristemo comienza a producir inflorescencia, es en ese punto, donde los productores cortan el meristemo y cavan una cavidad donde la savia fluye y comienza a acumularse, respetando la cavidad para permitir que la savia siga fluyendo y proceder a su recolecta (Álvarez et al., 2020).

Se dice que en el maguey se encuentran microorganismos autóctonos como son: bacterias lácticas, las bacterias productoras de etanol, bacterias productoras de exopolisacáridos y levaduras. Su proceso de fermentación puede durar de 12 a 48 horas a 25° C y a medida que

pasa el tiempo se presentan cambios importantes como un incremento en el porcentaje de etanol y formación de exopolisacáridos como b-glucanos y dextranos; los cuales generan un incremento en la viscosidad ya que transforman el fluido de newtoniano a no newtoniano. La literatura declara que a partir del pulque se pueden recuperar diversos grupos de microorganismos clasificados como: subdivisión *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* y/u otros, así como los grupos con actividad probiótica que se encuentran en el pulque se destacan los géneros *Zymomonas sp*, *Lactobacillus sp* y en algunos casos *Saccharomyces sp* (Cervantes et al., 2007).

Estudios microbiológicos realizados 1947-1957 por Sánchez-Marroquín dieron como resultado una explicación de la microbiota pulquera y la propuesta de *Lactobacillus spp.*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiase* como microorganismos esenciales en la fermentación del pulque (Escalante et al., 2012).

La norma mexicana NMX-V-037-1972 define el contenido alcohólico del pulque, de acuerdo con esta norma, el pulque es una bebida con un bajo contenido alcohólico de color blanco y con una textura ácida y viscosa. El pulque es ahora el centro de investigación en muchos laboratorios, no solo por sus propiedades nutricionales sino por la extremadamente compleja microbiología y la diversidad responsable de su fermentación, procesos que han resistido la industrialización (Escalante et al., 2016).

II. MATERIALES Y METODOS

Material biológico y aislamiento de hongos patógenos de zarzamora

El hongo *Fusarium* se aisló de fragmento de raíces de las zarzamoras. Las raíces se desinfectaron con alcohol al 70% y se realizaron lavados con agua destilada estéril, después se sembró la muestra en placas con medio agar Papa-Dextrosa (PDA, Difco®). Las placas de agar se incubaron durante 7 días a 30 °C. Las colonias características del hongo *Fusarium* sp., se transfirieron a nuevas placas con medio PDA hasta que se logró su purificación. Posteriormente, se realizó la caracterización morfológica macro y microscópica de cada uno de los hongos aislados (Olonisakin et al., 2017).

Para la tinción de hongos se utilizó el colorante azul de lactofenol o azul de algodón. La tinción se realizó con el método de impronta como se describe a continuación: Se cortaron segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 a 2 cm. Se colocó una gota de azul de algodón en el portaobjetos y posteriormente se colocó la cinta adhesiva que ya tenga adherido el hongo sobre la gota de azul de algodón y el portaobjetos. Por último, se agregó otra gota de azul de algodón sobre la cinta, se colocó el cubreobjetos sobre la preparación para poder ser observado en 40X en el microscopio óptico (Leica ®) (López et al., 2010).

Material biológico, aislamiento e identificación de BAL

Las bacterias ácido-lácticas se aislaron del pulque de la región de Jiquilpan, Michoacán; en medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS, CONDA®) adicionado con 10 g/L de medio, se realizaron diluciones seriadas en NaCl 2%, adicionado con cicloheximida al 0.01 mg/mL (Olonisakin et al., 2017). Brevemente: tomando 1 mL de la muestra de pulque realizando diluciones seriales en tubos estériles con agua destilada en diluciones 10^{-1} a 10^{-6} y tomando 1 mL de la dilución 10^{-6} se sembró en cajas Petri con medio MRS, (CONDA®), añadiendo 15 mL más de medio MRS y dejar solidificar. Incubar a 30 °C aproximadamente, durante 5 días en atmósfera de microaerofilia. Los recuentos bacterianos de los cultivos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Ahlberg et al., 2016).

El crecimiento de los BAL en medio líquido fue realizado para la medición del pH en cada uno de los matraces inoculados con bacterias utilizando un potenciómetro (Science Med modelo SM-25CW ®). Para la tinción de Gram se realizó rápidamente una limpieza del área de trabajo con alcohol al 75% esperando que se evapore, con ayuda del mechero prendido y a menos de 15 cm de distancia de la flama abrir las cajas Petri, con ayuda del asa previamente estéril

tomamos una colonia para dispersarla en un portaobjeto con unas gotas de agua destilada para formando el frotis, dejando secar el frotis a temperatura ambiente para proceder a realizar al tinción de Gram; fijando el frotis pasándolo dos veces el portaobjetos en la flama cuidando de no sobrecalentar para evitar que se quemem el frotis bacteriano y enfriar pasando el portaobjetos en la manga de la bata, se tiño con cristal violeta durante un minuto, lavado con agua corriente hasta que dejo de desprenderse el colorante, cubrimos la preparación con lugol durante un minuto, lavamos con agua hasta que deje de desprenderse el colorante. Se decoloro con alcohol-acetona hasta que dejo de desprenderse el colorante. Por último, se tiño con safranina durante un minuto y posteriormente se lavó con agua corriente hasta que dejo de desprenderse el colorante, se dejó secar para ser observado al microscopio (Leica DM500 ®) a 100X con aceite de inmersión (W.C et al., 2008).

Catalasa

Con ayuda de un palillo estéril en un portaobjetos se colocó parte de una colonia bacteriana, colocando unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre las bacterias en el portaobjetos. La ausencia de formación de burbujas indico que no hay presencia de la enzima catalasa (Winn et al, 2008).

Actividad antifúngica *in vitro* de BAL contra el hongo fitopatógeno *Fusarium sp.*

La actividad antifúngica de las cepas del *Lactobacilos* se realizó cultivando las bacterias, durante 16 h en caldo MRS a 30 °C, se inocularon en líneas de 2 cm en placas de agar MRS y se dejaron crecer microanaeróbicamente durante 48 h a 30°C. Posteriormente, las placas se cubrieron con 10 mL de suspensión de esporas del hongo. Las placas se incubaron durante 4 días a 25 °C y se evaluó la actividad antifúngica como zonas claras de inhibición alrededor de los frotis bacterianos (Abouloifa et al., 2019).

La inhibición del crecimiento fúngico se observó visualmente de la forma siguiente: haciendo uso del programa de ImageJ el cual es un programa informático de tratamiento digital ideal para calcular áreas. Se realizo una técnica diferente donde el efecto inhibitor se determinó en cajas de Petri mediante la técnica de superposición descrita por Muñoz et al. (2010) con una ligera modificación. Todos los aislamientos de BAL se probaron contra las cepas de del hongo. Para la selección, se inocularon 100 µL de cultivo de BAL en una placa de agar dextrosa papa (PDA, Difco®) por el método de propagación. El centro del agar se inoculó con esporas del hongo utilizando un asa de inoculación. Las placas se incubaron aeróbicamente a 29 °C durante 6 días.

La inhibición del crecimiento se observó como el área de propagación de los hongos cultivados en presencia de cada muestra de LAB. Se determinó el crecimiento fúngico al final del sexto día y se fotografió la placa para registro. Los aislamientos de LAB que mantuvieron su fuerte capacidad contra el crecimiento de hongos en experimentos repetidos se tomaron para estudios posteriores (Ahlberg et al., 2016).

Preparación para el conteo de esporas de *Fusarium*

Las esporas del hongo *Fusarium* se crecieron en medio líquido y se contabilizaron con ayuda de la cámara de Neubauer. Se agitó el tubo con la dilución 1×10^{-1} durante 30 segundos a partir de esta dilución se extrajo con micropipeta $10 \mu\text{L}$ y transfiriéndolo al compartimiento de lectura de la cámara de Neubauer. Se colocó la cámara en el microscopio y observar en el objetivo a $100 \times$. Se enumeraron las bacterias observando que se encontraran en los cuadrantes A, B, C, D y E del cuadrante central, teniendo en cuenta únicamente todas esporas ubicadas en los bordes superiores y a la izquierda del sitio de conteo, pero no las ubicadas en los bordes inferiores y en la derecha. Para la inoculación de las cajas Petri con medio MRS, primero se midieron 15 mL de medio PDA en un matraz inoculado con el hongo, para posteriormente inocular las cajas Petri de MRS las cuales ya tiene muestra de BAL adicionando 1 mL de muestra del hongo para cada uno de los tratamientos dejando secar la muestra y proceder a su incubación.

Para el cálculo de la concentración de bacterias/mL se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer, según la siguiente formula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{bacterias}}{\text{mL}} \right) = \frac{\# \text{ celulas} \times 10000}{\# \text{ cuadrantes}} \times 100$$

El aislamiento H1 de la raíz de la zarzamora prueba 2 se utilizó para preparar una solución concentrada de $350,000$ esporas/mL según como lo indico la siguiente formula, estos conteos se anexan en la Tabla A.

$$\text{Aislamiento 1.1} = \frac{175 \times 10,000}{5} = 350,000 \text{ esporas/mL}$$

El aislamiento H1 de la raíz de la zarzamora prueba 3 se utilizó para preparar una solución concentrada de $340,000$ esporas/mL según como lo indico la siguiente formula, estos conteos se anexan en la Tabla A.

$$\text{Aislamiento 1.1} = \frac{170 \times 10,000}{5} = 340,000 \text{ esporas/mL}$$

Aislamiento del ADN del *Lactobacilos* sp.

La extracción de ADN se realizó según Akamatsu y col., (2000) con algunas modificaciones. Las bacterias de BAL se inocularon en 10 mL de caldo nutritivo e incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante dos días. Las bacterias se recolectaron por centrifugación (Velab Prime PRO-12K ®) a 10,000 rpm durante 5 minutos, para convertirlos a protoplastos se incubaron en baño María a 40°C durante 15 minutos en 1 mL de una solución SMM (sacarosa, malato y MgCl₂) a un pH de 6.5 y 4 mg de lisozima. Después los protoplastos fueron sometidos a la centrífuga a 8,000 rpm durante 5 min y resuspendidos en buffer TNSB 500 mL que contiene Tris-HCL (pH 8), NaCl y docecilsulfato sódico, la suspensión fue incubada a 65°C durante 5 minutos, agitándolos gentilmente. Para extraer las proteínas se adicionó 0.5 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló gentilmente y la parte acuosa fue separada por centrifugación (Velab Prime PRO-12K ®) a 10,000 rpm durante 15 minutos, después la fase acuosa fue separada en un nuevo tubo y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío, se invirtió gentilmente varias veces hasta observar las cadenas de DNA y se centrifugó (Velab Prime PRO-12K ®) a 10,000 rpm por 10 min. La pastilla fue lavada con etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se retiró el alcohol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en agua destilada estéril 50 µL y se conservó en refrigeración hasta su uso (Akamatsu et al., 2000).

Aislamiento del ADN del hongo *Fusarium* sp.

Los hongos de las raíces se aíslan cortando fragmentos de raíces previamente lavados en alcohol a 90 °C y enjuagando con agua destilada estéril, después se siembra la muestra en placas con medio agar Papa-Dextrosa (PDA, Difco®). Las placas de agar se incubarán durante 7 días a 30 °C. Las colonias características del hongo *Fusarium* sp serán transferidas a nuevas placas con medio PDA hasta lograr su purificación. Posteriormente, se realizará la caracterización morfológica macro y microscópica de cada uno de los hongos aislados (Olonisakin et al., 2017). Para la tinción de hongos se requiere, colorante preparado de azul de algodón, cubreobjetos, portaobjetos, microscopio óptico y aceite de inmersión. Para la tinción de impronta se

selecciona las colonias para realizar las improntas. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 a 2 cm y se pega los segmentos de cinta en un asa micrológica. Poner una gota de azul de algodón en el portaobjetos para posteriormente colocar la cinta adhesiva que ya tenga adherido el hongo sobre la gota de azul de algodón y el portaobjetos. Por último, poner otra gota de azul de algodón sobre la cinta y colocar un cubreobjetos sobre la preparación para poder ser observado en 40X (Lopez et al., 2010).

Para la extracción del ADN la muestra se tomó muestra de la placa de PDA con el hongo en tubos con agua esterilizada, sometiéndolas a centrifugación a 5000 rpm (Velab Prime PRO-12K ®) durante 5 min. El sedimento se molió en tubos de microcentrífuga con puntas de pipeta desechables en 500 µl de tampón de extracción buffer (CTAB al 2 %, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, precalentado a 65 °C) y se incubó a 65°C durante 15 min. La mezcla se agitó brevemente 2 o 3 veces. A continuación, las muestras se trataron con 500 µl de fenol: cloroformo (1:1) y se agitaron durante un minuto y se tomó el sobrenadante después de centrifugar (Velab Prime PRO-12K ®) a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. El ADN se precipitó con un volumen igual de isopropanol helado, se incubó a -20 °C durante 60 min y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 8 min a 4 °C. El sedimento obtenido se enjuagó con etanol al 70%, se secó al aire, se resuspendió en 50 µl de agua libre de ácidos nucleicos y se utilizó directamente para la PCR (Sreenivasa 2008).

Electroforesis del ADN

Para la cámara de electroforesis se preparó un gel de agarosa al 0.8% con buffer TBE. En cada pozo se adicionó 5 µL de la solución de ADN y 1 µL de buffer de carga. El marcador que se utilizó fue 1 kb leader (Goldbio ®). La electroforesis se corrió a 80 V durante 60 min. Para observar el ADN el gel se sumergió en una solución con bromuro de etidio 10 mg/mL durante 15 min en completamente oscuridad, después se llevó al transiluminador de luz UV (Maestroger ®) para poder ser observado.

PCR *Fusarium* y bacterias ácido lácticas

Para el ADN extraído de las muestras *Fusarium* sp., se analizó un PCR, con el empleo de iniciadores específicos para Foc (FF1-FoR1), se utilizó un termociclador (AB Applied Biosystems (Veriti 96 well Thermal Cycler)). Con una muestra de reacción final de 25 µL que contenía 286.8 ng de ADN (muestra H1), una mezcla equimolar de dNTPs, MgCl₂, Primers, Buffer H₂O y ADN Taq polimerasa (T4OLIGO). El ADN extraído de las muestras de las raíces

de zarzamora infectadas por *Fusarium sp.*, fue analizado por PCR con el uso de cebadores específicos Fo (FoF1-FOR1), se enviaron a sintetizar a T4OLIGO. Las condiciones de amplificación para esta especie fueron: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72°C, 1 min.) y un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C., mientras que para Foc y razas las cuales consistieron en: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 58 °C, 2 min; 72 °C, 2 min), un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C para Foc y para las razas, la diferencia fue el grado de alineamiento consistente en 61 °C. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con una solución de Gel Red (Biotium, Catálogo Núm. 41003) (Velarde et al., 2015).

Extracción de ADN de bacterias ácido lácticas en pulque, con el empleo de iniciadores específicos para 16R1f y 1492r y LbLMA1rev, se utilizó un termociclador (AB Applied Biosystems (Veriti 96 well Thermal Cycler)). Con una muestra de reacción final de 25 µL que contenía 33.4 ng de ADN (muestra Lb), una mezcla equimolar de dNTPs, MgCl₂, Primers, Buffer H₂O y ADN Taq polimerasa (Thermofisher). El ADN extraído de las muestras de la bebida fermentada pulque, fue analizado por PCR con el uso de cebadores específicos (16R1f y 1492r y LbLMA1rev). Las condiciones de amplificación para desnaturalizar fueron: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72°C, 1 min.) y un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C., mientras que para Foc y razas las cuales consistieron en: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 58 °C, 2 min; 72 °C, 2 min), un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C para Foc y para las razas, la diferencia fue el grado de alineamiento consistente en 61 °C. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y visualizado bajo UV luz (Maestroger ®) (Dubernet et al., 2002).

III. RESULTADOS

Aislamiento de lactobacilos de pulque

Hu y colaboradores 2017 realizaron estudios de inhibición de infección por *Fusarium solani* en queratocitos por *Lactobacillus salivarius* spp., los cuales fueron filtrados de cultivo *in vitro* en donde este crecimiento de bacterias en medio MRS fue el típico que se reporta para el crecimiento de lactobacilos en ese medio tal cual lo menciona la técnica a seguir, inoculando 1 mL de cada dilución de Lactobacilos en cajas Petri con medio MRS e incubando en condiciones de microaerofilia. La Figura 5 muestra los lactobacilos aislados de pulque que crecieron a las 48 h de incubación; en la dilución de 10^{-6} fueron colonias incontables, dilución 10^{-7} se obtuvieron 42 UFC/mL, dilución 10^{-8} crecieron 8 UFC/mL y en la dilución 10^{-9} sin presencia de UFC/mL.

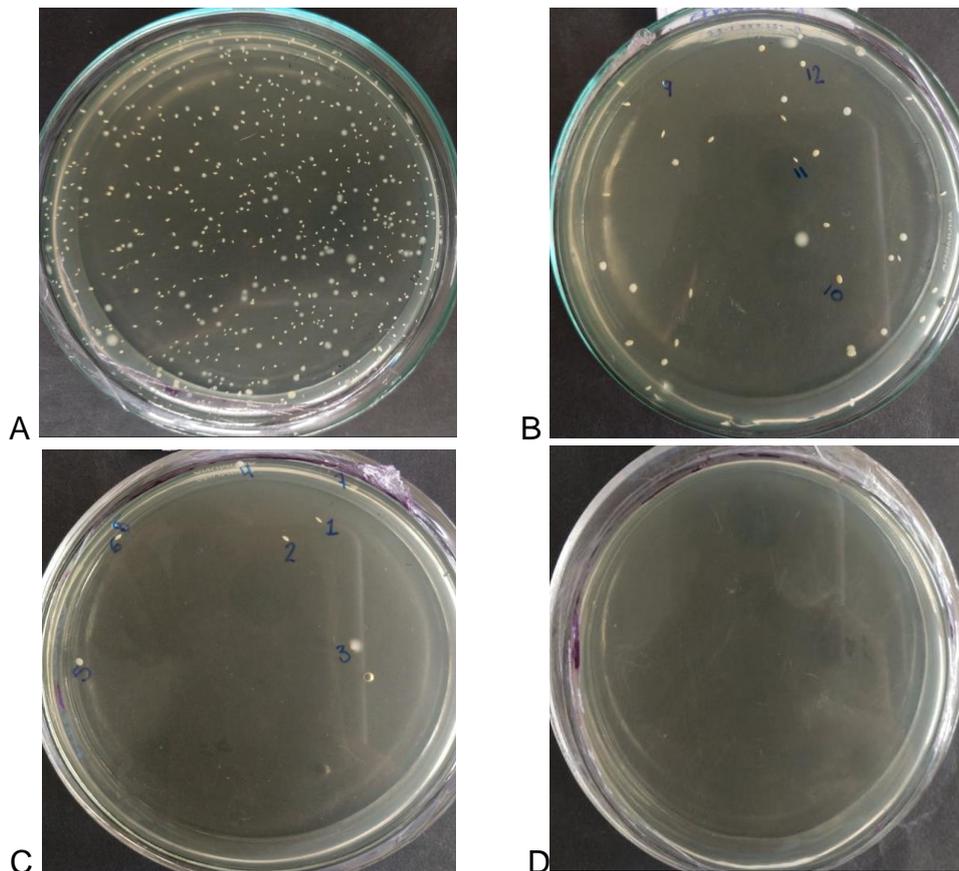


Figura 5. Aislamiento de lactobacilos en diluciones seriales de pulque. (A) 10^{-6} incontables UFC/mL; (B) 10^{-7} 42 UFC/mL; (C) 10^{-8} 8 UFC/mL; (D) 10^{-9} sin crecimiento.

Las colonias marcadas con numeración fueron las seleccionadas para su resiembra Figura 5B y 5C, dichas colonias seleccionadas se aislaron en el medio MRS para su observación al microscopio Figura 6, Quattrini 2018 describe la morfología de lactobacilos para el control de hongos promotoras del crecimiento vegetal donde hace mención de estos lactobacilos como su forma, tamaño y color, basándonos a esta teoría realizamos la descripción morfológica de nuestro lactobacilos obtenido del pulque mencionada Tabla 4.

Tabla 4. Interpretación de las colonias seleccionadas para la observación al microscopio, en los aspectos de forma tamaño y color.

Numero de colonia	Forma	Tamaño	Color
1	Puntiforme	0.1 mm	Blanca
2	Puntiforme	0.1 mm	Blanca
3	Circular	0.2 mm	Blanca
4	Circular	0.1 mm	Blanca
5	Puntiforme	0.1 mm	Blanca
6	Puntiforme	0.1 mm	Blanca
7	Puntiforme	0.1 mm	Blanca
8	Puntiforme	0.1 mm	Blanca

Las colonias obtenidas se observaron al microscopio para descartar la presencia de levaduras en las colonias obtenidas, observándose la presencia de lactobacilos Figura 6.

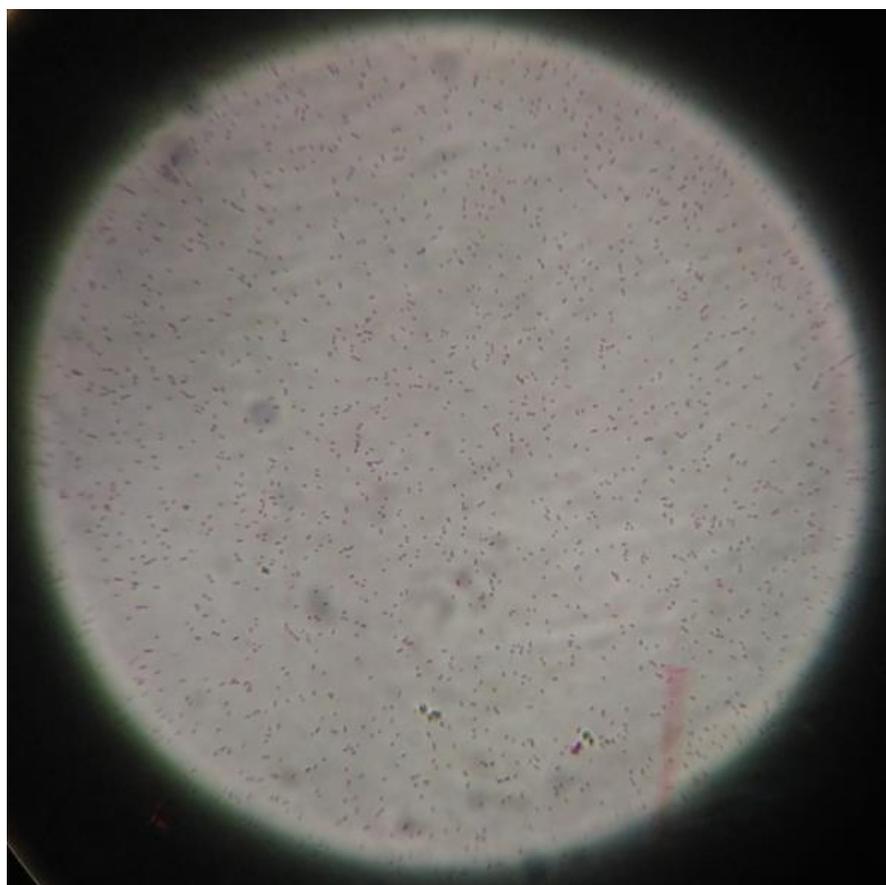


Figura 6. Lactobacilos aislados del pulque observados a 40x.

Las colonias seleccionadas se utilizaron para hacer tinción de Gram Figura 6 y medición de pH para verificar que acidificaban el medio MRS líquido durante su crecimiento. Man et al., 1960 realizaron estudios con lactobacilos tomándoles su nivel de pH en medio MRS basándonos a esto todos los aislamientos fueron bacilos Gram positivos Figura 6 y disminuyeron el pH del medio Tabla 5 dando resultados entre pH 4.33 a 4.35 teniendo un blanco de pH 5.81 basándonos. La disminución del pH es un factor que puede indicar potencialmente la producción de sustancias para inhiban el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Tabla 5. pH de *Lactobacillus* spp., en medio MRS líquido durante su crecimiento.

Numero de colonia	pH de <i>Lactobacillus</i> spp.
1	4.34
2	4.33
3	4.33
4	4.34
5	4.34
6	4.35
7	4.33
8	4.34
Blanco	5.81

Las colonias de esta bacteria L4 y L5 son bacterias que no producen la enzima de catalasa ya que no produjo burbujas en presencia del peróxido de hidrogeno Figura 7.

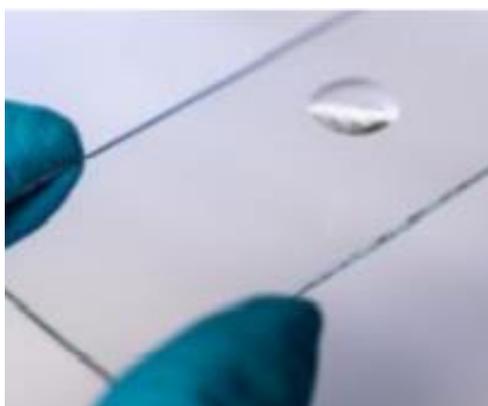


Figura 7 Reacción en prueba de catalasa negativa el aislamiento de la bacteria L4 y L5.

Aislamiento del hongo *Fusarium* sp., del cultivo de zarzamora

SENASICA 2015 hace mención de las características que presenta cualquier planta afectada por el hongo *Fusarium* spp., haciendo daño en todas las etapas del cultivo, atacando en su follaje y raíces provocando una gran cantidad de síntomas, desde manchas foliares, marchites y hasta

pudrición como se muestra en las Figura 8 y 9. En plántula y planta adulta, ocasiona acame (doblez o inclinación que sufre el tallo de las plantas). Cuando la enfermedad es severa, las plantas pueden marchitarse y morir rápidamente, conforme progresa la enfermedad, todo el sistema de raíces se torna café y con frecuencia se pudre la raíz primaria. Aparecen lesiones color café chocolate al nivel del suelo (o cerca del nivel del suelo), las cuales se expanden al sistema vascular.



Figura 8. Marchitamiento de planta de zarcamora



Figura 9. Raíz de zarcamora dañada por *Fusarium* spp.

Duglas 2019 realizó el aislamiento de *Fusarium Oxysporum* f sp., en zarcamora in vitro basándose a la teoría de Duglas se utilizaron raíces de zarcamora de plantas con los síntomas de infección con *Fusarium* sp., llamados enfermedad de la tristeza por el marchitamiento de la planta. Las raíces fueron cortadas y tratadas en alcohol para su limpieza, se colocaron en placas con medio agar Papa-Dextrosa hasta lograr su aislamiento Figura 10A. Para la tinción de hongos y poder observar sus conidias se utilizó el colorante azul de lactofenol (Figura 10B y 10C). Nieto-Cortez y colaboradores han reportado la presencia en zarcamora, en los últimos

años el cultivo de la zarzamora (*Rubus L.*) las cuales han sido afectado por *F. oxysporum* en regiones de México y California.

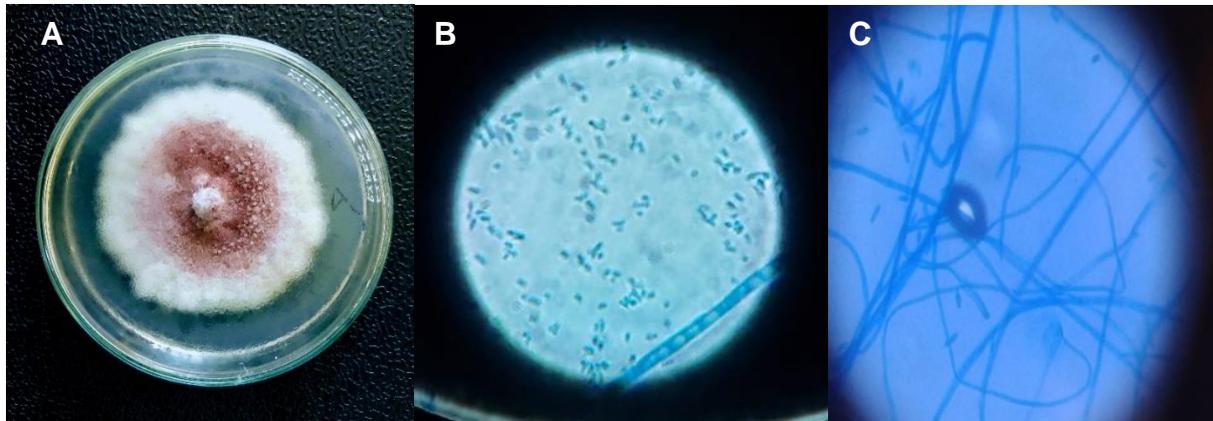


Figura 10. Aislamiento de *Fusarium sp.* A) Crecimiento en medio PDA. B) y C) Microconidias de *Fusarium sp.*

Ensayos de inhibición del crecimiento de *Fusarium* en presencia de lactobacilos

Después del aislamiento del hongo fitopatógeno *Fusarium sp.*, se realizaron los ensayos de inhibición del crecimiento del hongo en presencia de lactobacilos productores de sustancias antifúngicas del pulque en donde se puede mostrar en algunos de los ensayos la inhibición de este hongo. Nuestro primer ensayo se realizó con conidias de *Fusarium sp.*, de acuerdo a la técnica de Quattrini 2018 inoculadas en cajas Petri y al mismo tiempo las BAL de las 8 muestras de los aislamientos dichos resultados se ilustra en la Figura 11 este ensayo se realizó en época de febrero del 2020 a mayo del mismo año teniendo en cuenta que es una época del año de temperaturas altas entre 30° a los 37° ya que estas cajas Petri se dejaron incubar a temperatura ambiente teniendo un alto resultados de inhibición Tabla 6.

Mientras que los ensayos de inhibición del número de conidias de *Fusarium sp.*, inoculadas en caja Petri para los ensayos de inhibición (Figura 12, Figura 13, Figura 14), basándonos a la técnica de superposición descrita por Muñoz et al. (2010) con una ligera modificación, inoculando BAL en una placa de agar dextrosa papa por el método de propagación y el centro del agar se inoculó con esporas del hongo, las cajas del ensayo #1 se incubaron aeróbicamente en la época de septiembre 2020 a noviembre del mismo año teniendo una temperatura ambiente aproximadamente 26 °C a 29°C durante 6 días teniendo resultados de inhibición significativos Tabla 7.

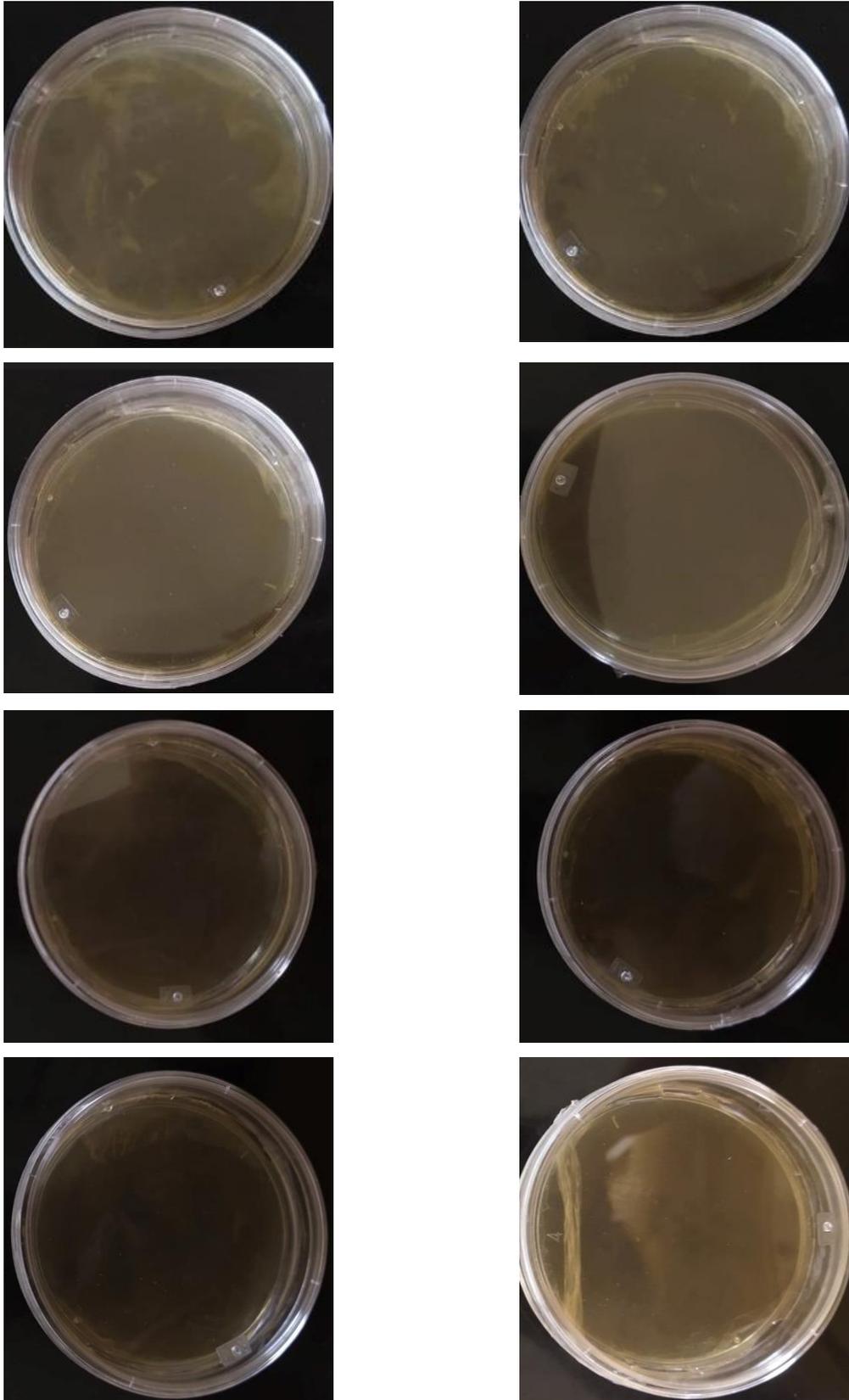


Figura 11 Aislamiento de Lactobacilos con *Fusarium* sp ensayo con la técnica de Quattrini 2018.

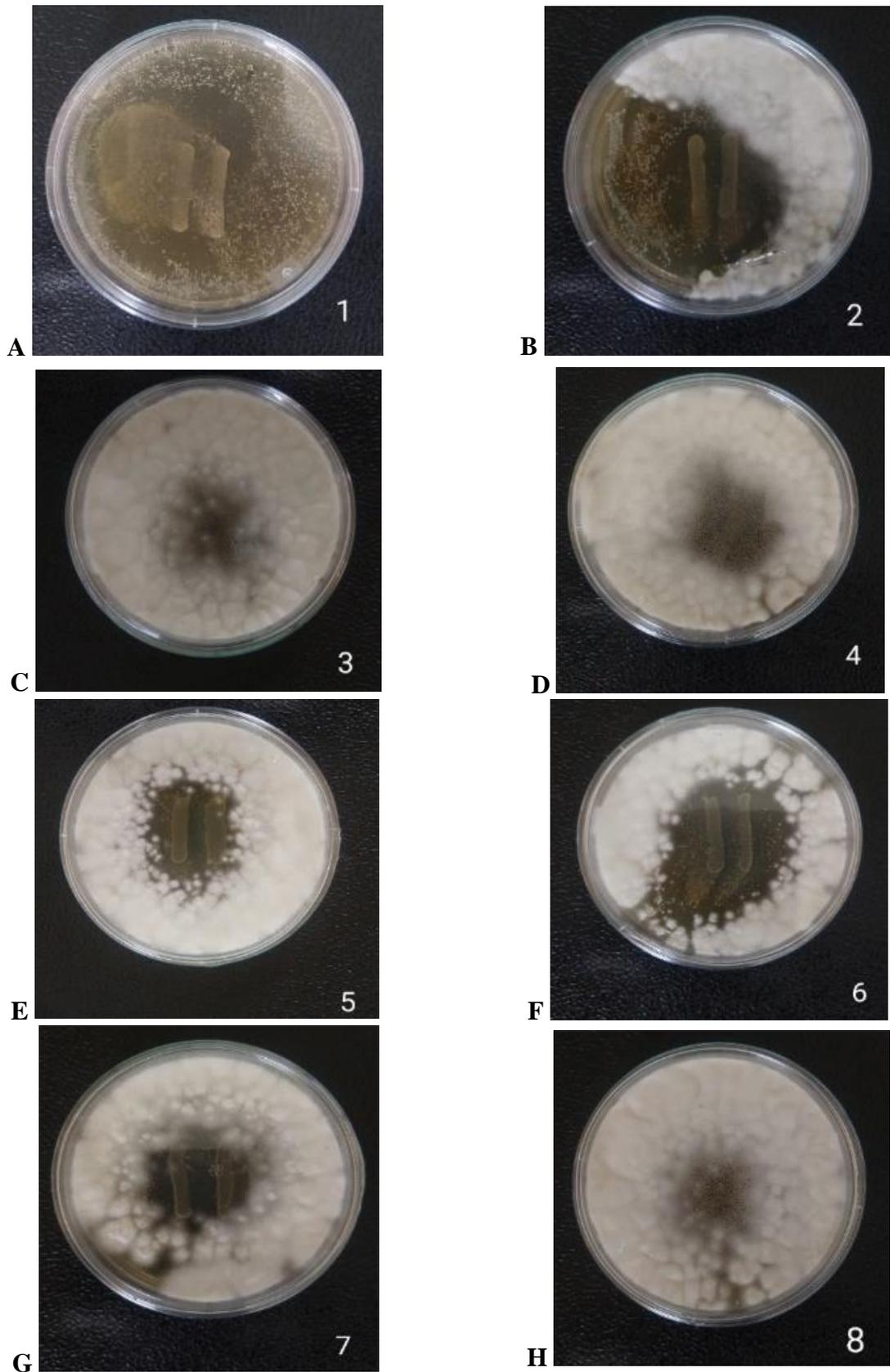


Figura 12 Aislamiento de *Lactobacilos* con *Fusarium sp* ensayo #1 basado a la técnica Ahlberg 2016.

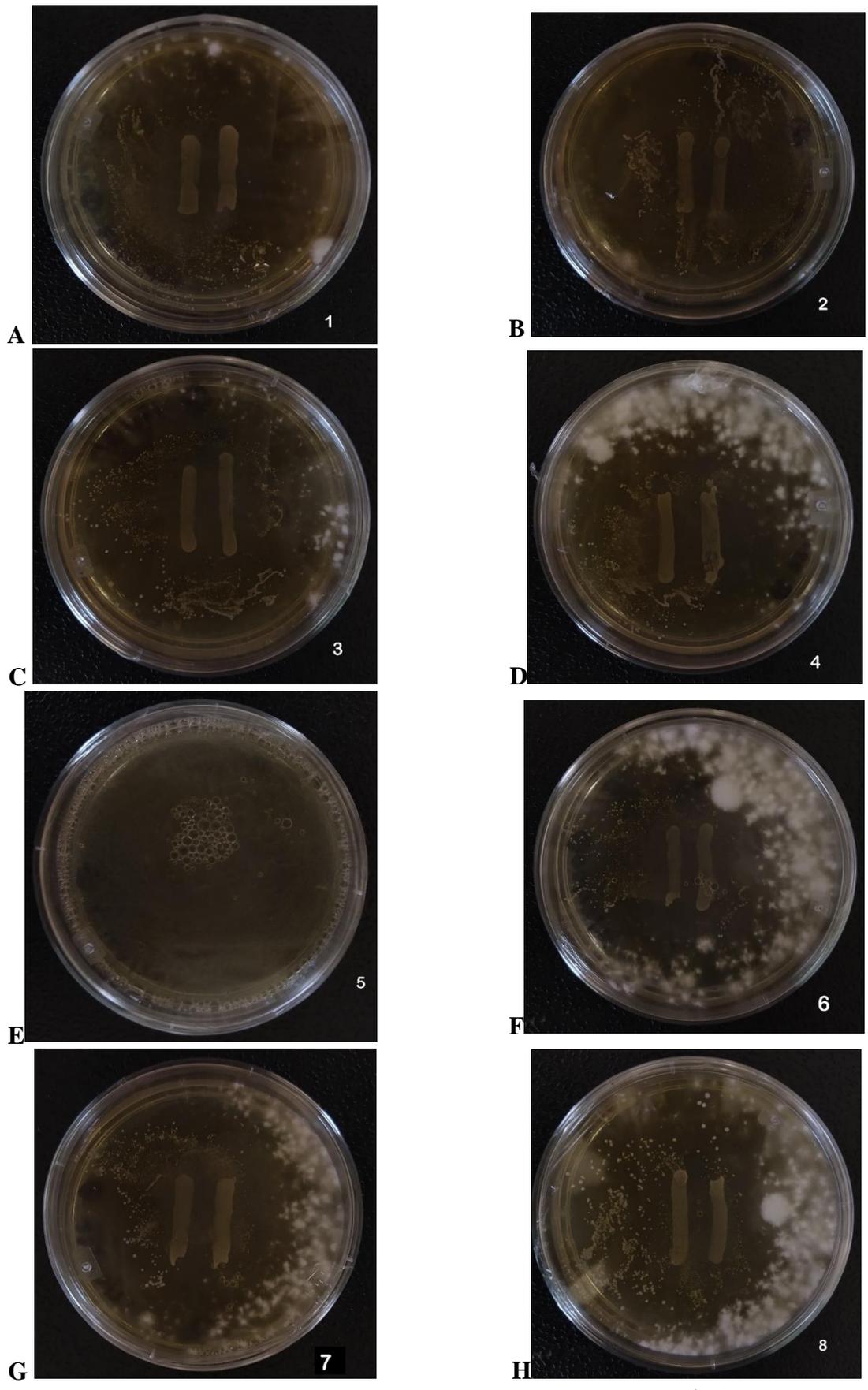


Figura 13 Aislamiento de Lactobacilos con *Fusarium* sp ensayo #2 basado a la técnica Ahlberg 2016.

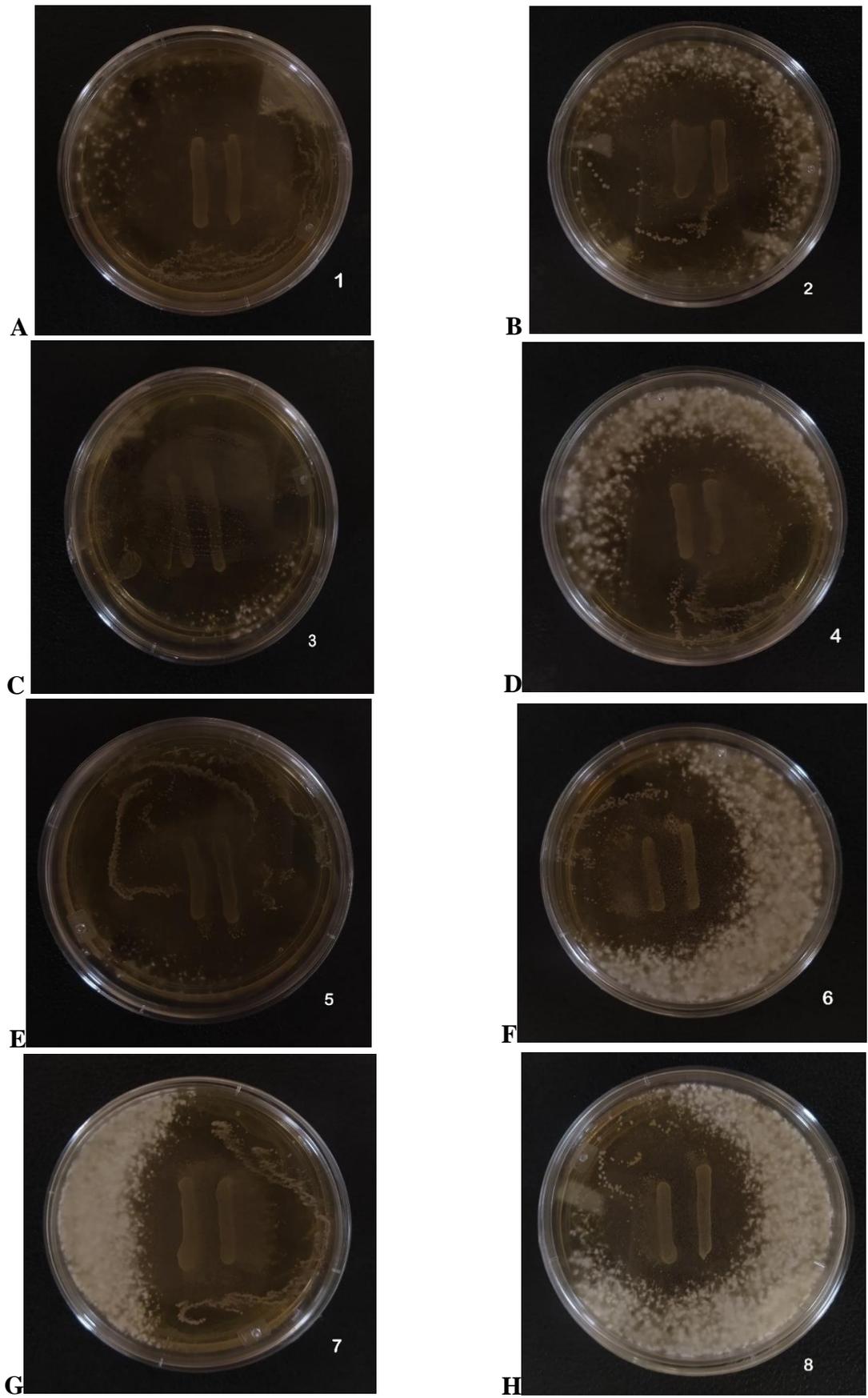


Figura 14 Aislamiento de Lactobacilos con *Fusarium* sp ensayo #3 basado a la técnica Ahlberg 2016.

Mientras que el ensayo #2 y #3 se realizaron en el periodo de febrero a junio 2021 con una temperatura ambiente aproximadamente 29 °C a 35°C, debido a este cambio climático las BAL y *Fusarium* tienden a comportarse de diferentes formas, teniendo en cada uno de estos ensayos buenos resultados.

Haciendo uso de la metodología de Abouloifa 2019 el cual aisló lactobacilos antifúngicos de aceitunas verdes, nuestros lactobacilos aislados pulque, se cultivaron durante 16 h en caldo MRS 30 °C, se inocularon en líneas de 2 cm en placas de agar MRS y se dejaron crecer anaeróbicamente durante 48 h a 30 °C. Posteriormente, las placas se cubrieron con 10 ml de suspensión de esporas del hongo. Las placas se incubaron durante 4 días a 25 °C y se evaluó la actividad antifúngica como zonas claras de inhibición alrededor de los frotis bacterianos.

Duglas 2019 menciona que en los últimos años el cultivo de la zarzamora (*Rubus* L. subgénero *Rubus*) ha sido afectado por *F. oxysporum* f. sp. *mori* en regiones de México, para ello se realizó una evaluación la inhibición *in vitro*. Las fotografías representan diferentes aislamientos de *Lactobacilos* que tienen actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo *Fusarium* sp., dejándolos incubar durante 4 días. Tabla 6 y 7 representan el área de inhibición de los ocho distintos aislamientos que producen sustancias inhibidoras para el crecimiento del hongo dando como resultados un área de inhibición en cada uno de los ensayos, dichos aislamientos seleccionados inhiben el crecimiento de *Fusarium* sp., en condiciones *in vitro*.

Tabla 6 Resultados de inhibición basado a la técnica de Quattrini 2018

Área de caja Petri	ENSAYO #1	Área de inhibición
		(cm ²)
$A = \pi r^2$	COLONIA 1	59.1294489
A = 3.1416 x 4.35² A = 59.44	COLONIA 2	58.9904129
	COLONIA 3	59.1947233
	COLONIA 4	58.9823498
	COLONIA 5	58.9832720
	COLONIA 6	58.8923874
	COLONIA 7	59.3209342
	COLONIA 8	59.2743192

Tabla 7 Resultados de inhibición basado a la técnica de Ahlberg 2016.

Área de caja Petri	ENSAYO #1	Área de inhibición (cm ²)	ENSAYO #2	Área de inhibición (cm ²)	ENSAYO #3	Área de inhibición (cm ²)
$A = \pi r^2$ A = 3.1416 x 4.35² A = 59.44	COLONIA 1	49.0168569	COLONIA 1	0.51037032	COLONIA 1	42.832754
	COLONIA 2	29.4649973	COLONIA 2	42.5404912	COLONIA 2	34.7996506
	COLONIA 3	1.00824294	COLONIA 3	27.6749419	COLONIA 3	55.0124981
	COLONIA 4	0.4630765	COLONIA 4	21.4672591	COLONIA 4	33.8705179
	COLONIA 5	24.6230778	COLONIA 5	44.3459153	COLONIA 5	57.5204667
	COLONIA 6	27.8691405	COLONIA 6	16.8227465	COLONIA 6	13.0784215
	COLONIA 7	23.08312119	COLONIA 7	27.2842266	COLONIA 7	37.1686276
	COLONIA 8	0.00713897	COLONIA 8	18.5306832	COLONIA 8	29.1567048

Prueba en tubos con cámara de Durham

Winn 2008 indica la prueba de cámara de Durham como una prueba para la indicación de formación de gases de bacterias, para la realización de esta prueba basada en cada uno de los tubos inoculados con el número de colonia del 1 al 8 fueron productoras de gases Figura 15. La figura demuestra la producción de gas en el medio MRS en todos los aislamientos. Los *Lactobacillus* spp., son bacterias que tienen la función de convertir la lactosa y los monosacáridos (azúcares) en ácido láctico que esto lo que hace que se produzca un ambiente ácido lo cual inhibe o detiene el crecimiento de bacterias dañinas y es debido a la lactosa que es el carbohidrato de prueba y su fermentación se manifiesta dando como resultado positivas a la formación de gases.



Figura 15 Reacción en tubos con cámara de Durham.

Caracterización molecular de aislamientos bacterianos *Lactobacilos* sp., y del hongo *Fusarium* sp.

El ADN del hongo se extrajo de la raíz de la zarzamora y de las bacterias se extrajeron del pulque. La Figura 16 muestra el PCR teñido con bromuro de etidio en el gel de agarosa y se observó que se obtuvo ADN cromosomal íntegro de las BAL y del hongo *Fusarium*.

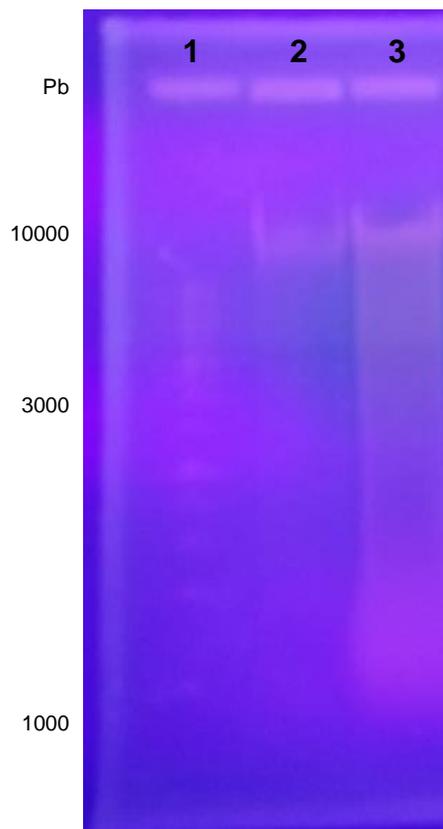


Figura 16. Revisión de la integridad del ADN. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio observado bajo luz UV. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio observado bajo luz UV, 1) Marcador 2) PCR del *Fusarium* 3) PCR del *Lactobacillus*.

El PCR se utilizó para la amplificación de los fragmentos, teniendo la noción de que la integridad del PCR Figura 16 es una característica indispensable para utilizar este ADN en las reacciones de PCR para poder identificar esta bacteria y hongo a nivel de género y especie basándonos en el estudio de Dubernet y col., la siguiente etapa de este proyecto será realizar una reacción de PCR y amplificar el fragmento de 16S de ADN_r, para su identificación definitiva.

PCR resultados del ensayo para la identificación genética de *Fusarium* sp., y BAL

Se describen los resultados correspondientes al análisis para la detección en donde se distinguen los fragmentos amplificados con un tamaño predicho de 0.9 kbp en los carriles 2 y 4 de las muestras analizadas (carril 2 muestra de Lb) (carril 4 muestra de H1), carril 3 y 5 correspondiente al control negativo, donde no se observó amplificación como se menciona en la Figura 17 el ADN genómico se amplificó usando indicadores específicos LbLMA1-rev, R16-1f, FoR1 Y R161f. El producto de PCR obtenido fue aproximadamente 250 pb de largo y abarcaba la región espaciadora 16S ^ 23S ADNr.

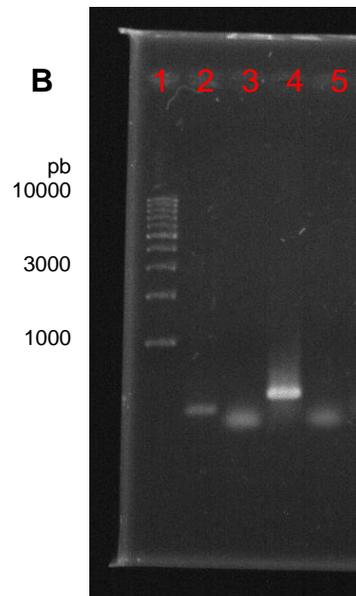


Figura 17 Análisis electroforesis en agarosa al 1%. Amplificación mediante PCR con iniciadores LbLMA1rev, R161f, FoF1, FoR1 obteniendo de diferentes plantas de zarzamora de la región de Los Reyes Michoacán y de bacterias ácido lácticas de la bebida fermentada pulque de la región de Jiquilpan Michoacán. Control negativo (Sin ADN).

Haciendo uso del programa BioEdit Sequence Alignmet Editor dando como resultado de las secuenciaciones de ADN no se logró obtener un ADN integro para su identificación genética, esta secuencia indica la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN, debido a la mala calidad de la secuenciación genetica nos indica que no existen fragmentos suficientes de ADN en óptimas condiciones para su lectura es decir se obtuvo ADN degradado o más de una cadena de ADN Figura 17, Figura 18.

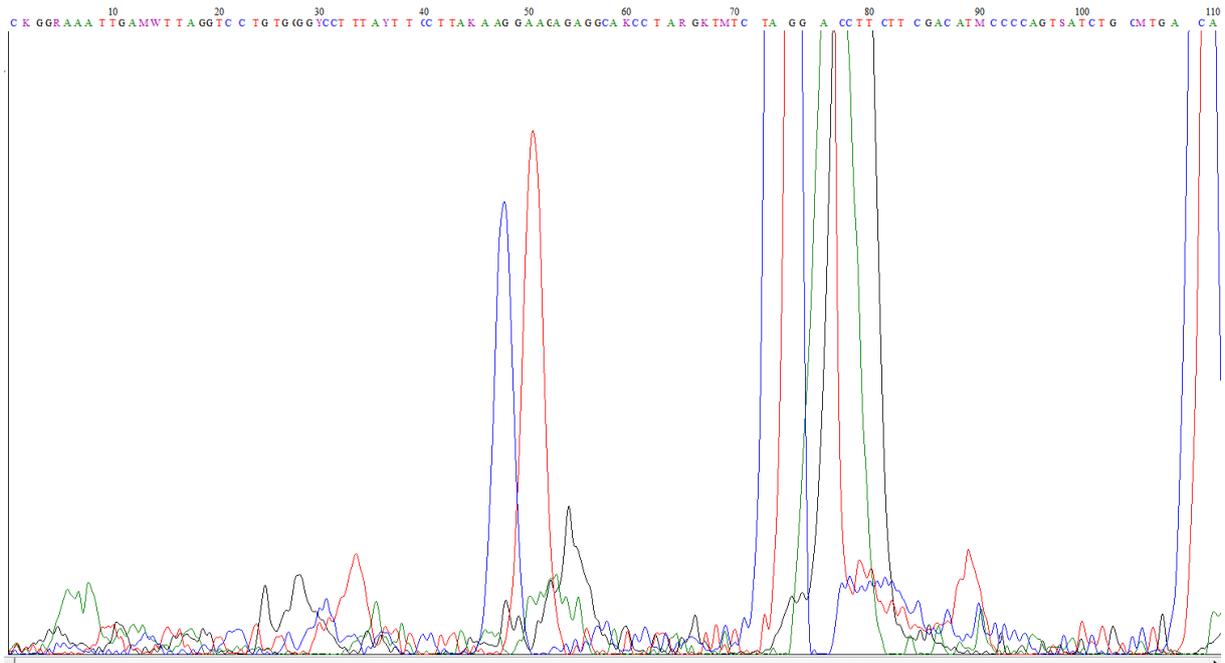


Figura 16 Secuenciación genética del *Lactobacilos sp.*

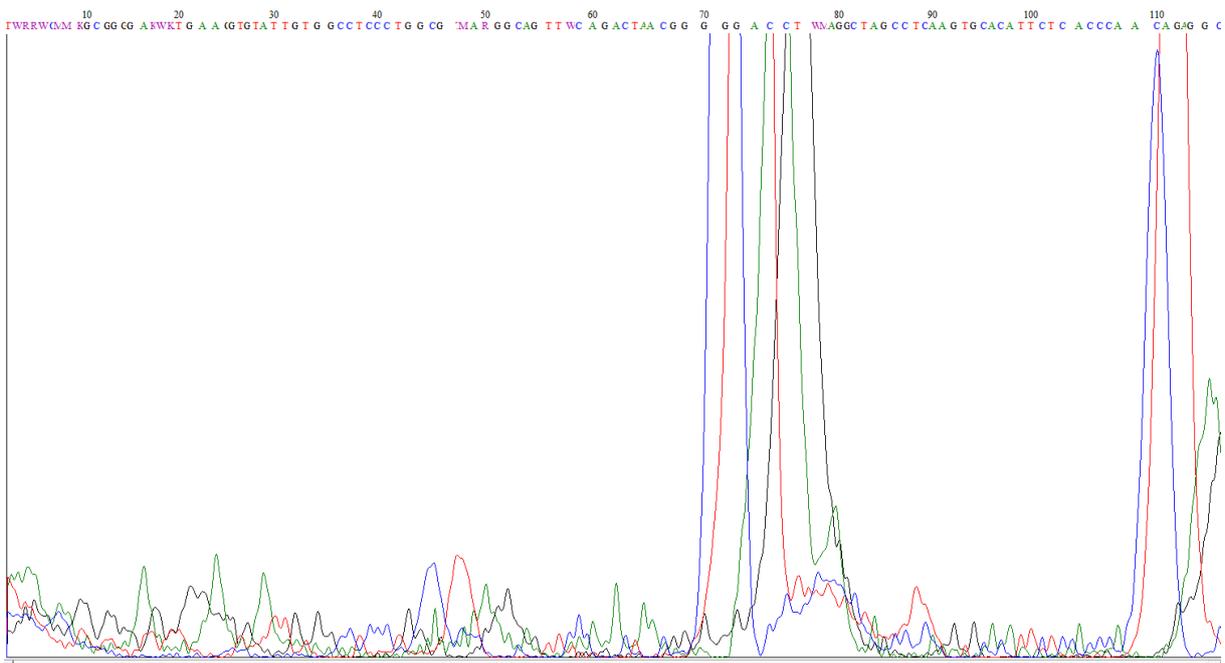


Figura 17 Secuenciación genética del hongo *Fusarium sp.*

IV. Conclusiones

Este estudio demuestra como las bacterias ácido láctica encontradas en el pulque de la región de Jiquilpan, Michoacán, son capaces de inhibir al hongo *Fusarium* sp., extraído de las raíces infectadas de la zarzamora en la región de Los Reyes de Salgado Michoacán, bajo estos experimentos se concluye la obtención resultados con una zona de inhibición, dando una esperanza y solución de la problemática para los productores que sufren de este daño por el ataque de este hongo fitopatógeno *Fusarium* en sus cultivos.

V. Recomendaciones

A partir de los estudios presentados en esta Tesis de Maestría, las perspectivas de estos estudios a futuro se orientan en dos direcciones. En un primer plano tener en cuenta que se pueden realizar más estudios a nivel laboratorio. Y en segundo plano poder llevar a cabo estos experimentos in vitro a nivel in vivo en plantas de zarzamora infectadas con *Fusarium*.

Referencias Bibliográficas

- Abel González G., J. R. (2017). *Manual de manejo agronómico del arándano*. Santiago, Chile.
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., . . . Asehrou, A. (2019). Characterization of Probiotic Properties of Antifungal Lactobacillus Strains Isolated from Traditional Fermenting Green Olives. *Check for updates*, 1-14.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Florida: Compyright.
- Agrios, N. G. (2005). *Plant pathology*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Ahlberg, S., Joutsjoki, V., Laurikkala, S., Varmanen, P., & Korhonen, H. (2016). Aspergillus flavus growth inhibition by Lactobacillus strains isolated from traditional fermented Kenyan milk and maize products. *CrossMark*, 1-8.
- Ahlberg, y., & otros. (2016). Aspergillus flavus growth inhibition by Lactobacillus strains isolated from traditional fermented Kenyan milk and maize products. *CrossMark*, 2.
- Akamatsu, T., Taguchi, H., & Okada, H. (2000). A simple and rapid extraction of high molecular weight chromosomal DNA from Bacillus subtilis Protoplasts for cosmid cloning and interspecific transformation. *JSBA*, 1-2.
- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. (2020). Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Pulque: Management of a Fermented Beverage in Michoacán, Mexico. *MDPI*, 1-17.
- Anwer, S., Salman, M., Numan, M., Rizwan, M., Zubair, M., & Mustafa, G. (2020). Characterization of antifungal metabolites produced by Lactobacillus plantarum and Lactobacillus coryniformis isolated from rice rinsed water. *SprngerLink*, 1-11.
- Bianchini, A. (2015). *Lactic acid bacteria as antifungal agents*. USA: Copyright.
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 101-212.
- D., P. U. (2013). *Manual de Frambuesa*. Chillán, Chile.
- De Man, J., Rogosa, M., & M.E, S. (1960). Medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 1-23.
- Delgado-Ochoa, J. C., Ochoa-Fuentes, R. M., Cerna- Chávez, E., Beltrán-Beache, M., Rodríguez-Guerra, R., Aguirre-Urbe, L., & Vázquez-Martinez, O. (2016). Patogenicidad de especies de Fusarium asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista Argentina de Microbiología*, 222-228.
- Dhewa, T., Kumar, N., & Mishra, V. (2015). Kiumiss: The Nutritional and Therapeutic Values. *ResearchGate*, 484.
- Dubernet Ségolène, N. D., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *ELSEVIER*, 271-275.
- Duglas, R. (2019). CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DE Fusarium oxysporum f. sp. mori EN ZARZAMORA. USO EN ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD VARIETAL Y ALTERNATIVAS DE CONTROL IN VITRO. *ResearchGate*, 1-2.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Muguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the

- fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Elsevier*, 126-134.
- Escalante, A., Giles-Gomez, M., Moreno-Terrazas, R., & Matus, V. (2012). Pulque Fermentation. *ResearchGate*, 691-704.
- Escalante, A., López-Soto, D. R., Velázquez-Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Alcoholic Fermented Beverage Technical Aspects. *frontiers in Microbiology*, 1-18.
- Flores, A. M. (2012). *Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacan, México*. Michoacan, Méx.: Revista Mexicana de Fotopatología .
- Gordon, T. R. (2018). Fusarium oxysporum and the Fusarium Wilt Syndrome. *Annual Reviews*, 23-34.
- HortiCultivos. (2017). Crecen exportaciones agroalimentarias de México. *HortiCultivos*, 11-12.
- Hu, J., Chen, F., Kan, T., Zhuang, H., & Zhang, J. H. (2017). Inhibition of Fusarium solani Infection in Murine Keratocytes by Lactobacillus salivarius ssp. salivarius JCM1231 Culture Filtrate In Vitro. *Current Eye Research*, 1-10.
- Husaini, A., Sakina, A., & Cambay, S. R. (2018). Host-Pathogen Interaction in Fusarium oxysporum Infections: Where Do We Stand? *Current review*, 889-895.
- Issuu, I. (2008). *Orientaciones para el cultivo de la zarzamora*. Bajonálón Grudo Desarrollo Rural.
- Lappa et al. (2018). *Control de Aspergillus carbonarius en en ballas de Lactobacillus plantarum: un estudio de transcripcion fenotipica y genetica*. Italia: ELSEVIER.
- Leyva, y. o. (2017). *Antifungal microbial for food biopreservation*. MDPI.
- Lopez et al. (2010). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad.
- López et al. (2010). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad.
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., . . . Kazan, K. (2013). Fusarium Pathogenomics. *Further*, 399-409.
- Olonisakin et al. (2017). *Isolation Of Antifungal Lactic Acid Bacteria (LAB) From "kunu" Against Toxigenic Aspergillus Flavus*. Copyright.
- Pastrana., A. (2017). *Fusarium Oxysporum f.sp. mori, a new forma specialis causing Fusarium Wilt ok Blackberry*. California.
- Quattrini, M., Bernardi, C., Stuknyté, M., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., . . . Fortina, M. G. (2018). Functional characterization of Lactobacillus plantarum ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Elsevier*, 936-944.
- SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030, Frutas del bosque, Arandano, Frambuesa y Zarzamora Mexicanas*. México.
- SENASICA. (2015). *FICHA TÉCNICA Fusarium spp. (Hypocreales: Nectriaceae) Podredumbre de raíces*. México : Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural .
- Sreenivasa, M., Sharmila, R., Gonzáles, M. T., & Adkar, C. (2008). A PCR-Based assay for the detection and differentiation of potetial Fumonisin-Producing Fusarium verticillioides Isolated from Indian Maize Kernels. *ResearchGate*, 1-13.
- Undurraga D., S. V. (2013). *Manuel de Frambuesa*. Chillán, Chile.: ImaginaChile.

- Velarde, S., Ortega Murrieta, P. F., Fierros, L. G., Padilla, V. I., Gutierrez, P. E., Rodríguez, C. F., . . . Garzón, T. J. (2015). Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. ciceris (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.6, 735-748.
- W.C., W., S. D., A., W. M., J., E. W., K., G. W., P., & P.C., S. (2008). Capítulo 5; Introducción a la microbiología. Parte I. El papel de la microbiología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas: Guía para la práctica y el tratamiento. En: Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. . 6a. edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, 167-210.
- Wang, H., YanHua, Y., JiaMing, W., HePing, Z., & Wei, Q. (2012). Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PlosOne*, 1-7.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, W.E., Procop, W.G., Schreckenberger, P.C., & Woods, G.L. (2008). Koneman Diagnóstico microbiológico Texto y atlas en color. 6a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. pp 1475.

Anexo

Tabla A. Esporas del hongo contadas en la cámara de Neubauer.

Aislamiento/cuadrante	A	B	C	D	E	Total
H1 de la raíz de la planta de zarzamora prueba 2	33	37	35	39	31	175
H1 de la raíz de la planta de zarzamora prueba 3	36	32	39	34	29	170