

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

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

CIIDIR IPN UNIDAD MICHOACÁN

BIOCONTROL DE *Rhizopus stolonifer* EN FRUTOS DE  
ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*) EMPLEANDO MICROBIOTA NATIVA,  
ASOCIADA A LA PLANTA

T E S I S

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

P R E S E N T A:

IIA ISMAEL FERNANDO CHÁVEZ DÍAZ

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA VALENTINA ANGOA PÉREZ

DR. SIGIFREDO LÓPEZ DÍAZ

JIQUILPAN MICHOACÁN, 2011





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich; siendo las 13:00 horas del día 06 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR – MICH. para examinar la tesis titulada:

Biocontrol de *Rhizopus stolonifer* en fruto de Zarzamora (*Rubus fruticosus*) empleando microbiota nativa, asociada a la planta.

Presentada por el alumno:

**CHAVEZ**

Apellido paterno

**DIAZ**

Apellido materno

**ISMAEL FERNANDO**

Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	3	4	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

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

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dra. María Valentina Angoa Pérez

  
Dr. Sigifredo López Díaz


  
Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

  
Dr. Luis Fernando Ceja Torres

  
Dr. José Vargas González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



  
Dr. Guillermo Herrera Arreola



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de JIQUILPAN, MICHOACÁN el día 14 del mes de NOVIEMBRE del año 2011, el que suscribe C. I.I.A. ISMAEL FERNANDO CHÁVEZ DÍAZ alumno del programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE con número de registro B091348, adscrito a CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO REGIONAL INTEGRAL (CIIDIR-IPN UNIDAD MICHOACÁN), manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la DRA. MARÍA VALENTINA ANGOA PÉREZ y el DR. SIGIFREDO LÓPEZ DÍAZ y cede los derechos del trabajo intitulado 'BIOCONTROL DE *Rhizopus stolonifer* EN FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*) EMPLEANDO MICROBIOTA NATIVA, ASOCIADA A LA PLANTA, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: JUSTO SIERRA No. 28 JIQUILPAN, MICHOACÁN, MÉXICO. C.P. 59510, TELEFONO: 01 (353) 53-30218. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

I.I.A. Ismael Fernando Chávez Díaz.



## **Reconocimiento**

Al INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL por haber brindado el apoyo económico para la realización del presente trabajo de investigación otorgando una beca de Maestría. Así como también a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP), por haber otorgado el apoyo económico para la asistencia como participante a congresos por el Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI). De igual manera a la Coordinación de Cooperación Académica del IPN por haber otorgado la beca de movilidad misma que cubrió la estancia de investigación desprendida por las actividades del presente trabajo de investigación científica.

Con gratitud a los Honorables Miembros del Comité Revisor:

Dra. María Valentina Angoa Pérez.

Dr. Sigifredo López Díaz.

Dra. Ana Niurka Hernández Lauzardo.

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante.

Dr. Luis Fernando Ceja Torres.



## **Agradecimientos**

El logro del presente trabajo es producto de la colaboración de un gran equipo de trabajo entre los que agradezco de manera personal a:

Admirables directores de Tesis:

Dra. María Valentina Angoa Pérez y Dr. Sigifredo López Díaz, gracias por su apoyo, dirección y enseñanzas.

Mi tutor externo al centro:

Dra. Ana Niurka Hernández Lauzardo, le estoy profundamente agradecido por las diversas enseñanzas, su hospitalidad y apoyo incondicional, de igual manera agradezco a su esposo el Dr. Miguel Gerardo Velázquez del Valle.

A los encargados de laboratorio:

M.C. Guadalupe Oyoque Salcedo en CIIDIR-IPN Unidad Michoacán y a M.C. Monica Hernández López en CEPROBI-IPN, quienes me apoyaron y aportaron un poco de su tiempo.

A los técnicos de laboratorio:

Tec. Erendira Jazmin Novoa Medellin y Tec. José Antonio Cortez Pérez.

A los docentes que me formaron como Maestro en Ciencias:

Dr. José Venegas, Dra. Martha Velázquez, Dr. José Luis Montañez, Dr. Francisco Covarrubias, Dr. Hipólito Cortez, Dra. Hortencia Mena, Dr. Luis Ceja Torres, Dr. Carlos Muñoz, Dra. Dioselina Álvarez, gracias a todos por su experiencia y conocimiento.



## Agradecimientos

Agradezco también a cada uno de mis compañeros por haberme brindado su amistad, haberme acompañado en cada una de las etapas que viví a su lado y hacerme una estancia agradable durante los estudios de maestría realizados, de cada uno de ustedes me llevo el recuerdo con alegría, y los considero como colegas con basto potencial para lograr sus metas:

Claudia, Rosy, Lupita, Alejandro, Oswaldo, Blanquita, Estrella, Maggy, Jesús, Rafa, Fabián, Melisa, Daniela, Verónica, Verito, Charly, Carlos, Oswaldo, Erika, Rosalba, Jure, Beto, Medina, Hugo, Charls, Violeta, Dora, Benjamín, Cesar, Ludwig, Stephanie, Gustavo, Teo, Cyali, Luis, Dynora, Elizabeth, Luz, Manuel, Jonás, Víctor, Omar, Manuel, Alex, Martha, Tania, Oaxaco, Isrrael, Alex Pimienta, Selva-sankar, Sarry, Carlos Castillo y Henri Piña.

Con especial cariño a Alejandra Gonzales Urias, Deneb Maldonado, Liliana Córdova, Olga Cruz, Miguel Olvera y Myrna Cervantes, a mis primas Cinthia y Estefania Benites, a mis abuelos Socorro Rodríguez e Ismael Chávez gracias por estar siempre que los necesité.

Agradezco también con especial cariño a Lupita Arceo, Becky, Licha, Ely, Fabián, Toño y Cony, personal del CIIDIR que siempre me apoyó y gracias a ellos pude llevar a cabo cada trámite.

A todos ustedes GRACIAS.



### **Dedicatoria.**

El presente trabajo de investigación lo dedico a quien me enseñó a amar la naturaleza, a quien ha sido mi luz y mi guía en la vida, a quien me dio todo sin esperar nada a cambio, a ti que me enseñaste a razonar, a ti que me enseñaste el valor del trabajo y la dedicación, no tengo manera de agradecerte mis éxitos, gracias por estar presente en cada uno de ellos.

Dedico el presente trabajo a mi MADRE, Ma. Luisa Díaz Ventura.

A mi hermano por enseñarme a ser fuerte, a no caer y a levantarme cuando lo he hecho, eres un ejemplo a seguir

A mi hermano Alvaro Chávez Díaz

A quien fue como mi padre, y recuerdo constantemente, se que te llenaría de orgullo estar conmigo al presentar este trabajo, Dios te tenga en su gloria.

A mi abuelo, Jorge Díaz Jiménez



*“Hay siempre un libro abierto para todos los ojos: La Naturaleza”...*

*Jean Jacques Rousseau*

*“Lo que conocemos es una gota de agua; lo que desconocemos es el océano”...*

*Isaac Newton*

*“Nunca desistas de un sueño. Solo trata de ver las señales que te llevan a él”...*

*Paulo Coelho*





## Índice

Índice de Tablas.....	1
Índice de Figuras .....	2
RESUMEN: .....	4
ABSTRACT: .....	5
Capítulo I. Introducción	
1.1 Zarzamora ( <i>Rubus fruticosus</i> ) .....	6
1.1.1 Historia, Morfología, Taxonomía y Clasificación de los cultivares. 6	
1.1.2 Composición química del fruto .....	9
1.1.3 Actividad nutracéutica y compuestos fitoquímicos .....	9
1.1.4 Producción de zarzamora en el mundo.....	11
1.1.5 Perfil productivo y comercial de la zarzamora mexicana .....	13
1.1.6 Manejo del Cultivo en México .....	14
1.1.7 Cosecha y Manejo Postcosecha .....	15
1.1.8 Zona productora en Michoacán .....	16
1.2 Género <i>Rhizopus</i> .....	17
1.2.1 <i>Rhizopus stolonifer</i> , agente causal de podredumbre blanda .....	18
1.3 Estrategias de Control de <i>Rhizopus stolonifer</i> .....	19
1.3.1 Fungicidas .....	19
1.3.2 Control Químico .....	20
1.3.3 Control cultural pre y postcosecha .....	21
1.3.4 Control por atmosferas y radiaciones.....	21
1.3.5 Control con productos naturales .....	22
1.3.6 Control por medio de microorganismos.....	23



1.4 Interacciones planta-microorganismo, microorganismo-microorganismo .....	24
1.5 Control biológico postcosecha.....	25
1.5.1 Competencia por nutrientes y espacio .....	27
1.5.2 Formación de biosurfactantes y biopelículas.....	27
1.5.3 Antibiosis .....	28
1.5.4 Producción de enzimas y parasitismo .....	28
1.5.5 Inducción de resistencia.....	29
1.5.6 Sideróforos .....	29
1.5.7 Liberación de compuestos volátiles .....	31
1.6 Género <i>Bacillus</i> .....	31
1.7 <i>Leifsonia aquatica</i> (anteriormente <i>Corynebacterium acuaticum</i> ) .....	32
1.8 Justificación .....	33
1.9 Hipotesis.....	34
1.10 Objetivos .....	34
Capítulo II. Materiales y Métodos	
2. Materiales y Métodos.....	35
2.1 Toma de muestras.....	35
2.2 Obtención de la microbiota nativa asociada a la planta.....	36
2.3 Obtención de aislados fúngicos del género <i>Rhizopus</i> .....	36
2.4 Identificación microscópica de cepas fúngicas del género <i>Rhizopus</i> . ..	38
2.5 Identificación de los antagonistas .....	38
2.6 Purificación de las cepas fúngicas de <i>Rhizopus</i> .....	39
2.7 Reproducción de los postulados de Koch y patogenicidad de las cepas .....	40
2.8 Diseño de técnica de inoculación y cantidad mínima de inóculo ....	42



2.9	Bioensayos preliminares.....	43	
2.10	Bioensayo de antagonismo <i>in vitro</i> .....	44	
2.11	Detección de sideróforos.....	45	
2.12	Antagonismo en presencia de iones Fe (III) para reducir producción de sideróforos .....	45	
2.13	Bioensayo de antagonismo <i>in situ</i> .....	46	
2.14	Análisis estadístico.....	47	
Capítulo III. Resultados			
3.1	Caracterización morfológica e identificación de aislamientos de <i>Rhizopus spp</i> .....	48	
3.2	Pruebas de patogenicidad y grado de severidad .....	50	
3.3	Morfología de la infección de <i>Rhizopus stolonifer</i> en fruto de zarzamora. ....	53	
3.3.1	Características de Fruto Maduro de Zarzamora .....	53	
3.3.2	Germinación y formación de estructuras .....	55	
3.1.1	Infección y dispersión .....	55	
3.1.2	Lisis y desintegración del fruto .....	57	
3.1.1	Descripción de estructuras características encontradas durante la infección.....	59	
3.2	Identificación de agentes con poder antagónico .....	61	
3.3	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> .....	62	
3.4	Producción de Sideróforos .....	64	
3.5	Actividad antifúngica en presencia de Hierro .....	66	
3.6	Antagonismo <i>in situ</i> y grado de severidad .....	68	
Capítulo IV. Discusión y Conclusiones.....			72
4.1	Discusión .....	72	



4.2 Conclusiones .....	82
Capítulo V. Perspectivas .....	84
Literatura citada .....	85



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación taxonómica de la zarzamora variedad 'Brazos'.	7
<b>Tabla 1.2.</b> Composición química del fruto de zarzamora por cada 100g	10
<b>Tabla 1.3.</b> Actividad antioxidante y compuestos fitoquímicos en el fruto de zarzamora	11
<b>Tabla 1.4.</b> Clasificación taxonómica de <i>Rhizopus stolonifer</i>	18
<b>Tabla 1.5.</b> Productos comerciales para biocontrol de enfermedades postcosecha	26
<b>Tabla 2.1.</b> Escala de severidad diseñada para la evaluación de la patogenicidad de los aislados del género <i>Rhizopus</i> .	42
<b>Tabla 3.1.</b> Identificación y clasificación de aislados del género <i>Rhizopus</i> por medio de las estructuras características	49
<b>Tabla 3.2.</b> Descripción de síntomas y signos mostrados por los frutos sometidos a la inoculación por los aislados de <i>Rhizopus</i> .	53
<b>Tabla 3.3</b> Identificación de antagonistas por medio del kit BBL CRYSTAL™ para Gram positivas.	61
<b>Tabla 3.4.</b> Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de los agentes antagónicos asociados al cultivo de zarzamora versus los aislados de <i>R. stolonifer</i> nativos del agroecosistema	63
<b>Tabla 3.5.</b> Valoración de la producción de sideróforos en un rango de 72 h, en medio casaminoácido con CAS como solución indicadora (MCAS).	65
<b>Tabla 3.6.</b> Evaluación del antagonismo entre aislados bacterianos asociados al cultivo de zarzamora versus los aislados de <i>R. stolonifer</i> nativos del agroecosistema, en un medio enriquecido con FeCl <sub>3</sub> .	67
<b>Tabla 3.7.</b> Evaluación del antagonismo entre los agentes antagónicos asociados al cultivo de zarzamora vs. los aislados de <i>R. stolonifer</i> nativos del agroecosistema, en fruto de zarzamora.	70



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Morfología del cultivar de zarzamora variedad 'Brazos'.	8
<b>Figura 1.2.</b> Principales países productores de zarzamora en el mundo.	13
<b>Figura 2.1.</b> Metodología de obtención de microbiota nativa asociada a la planta de zarzamora.	37
<b>Figura 2.2.</b> Cámaras húmedas para desarrollo de <i>R. stolonifer</i> .	38
<b>Figura 2.3.</b> Procedimiento para la reproducción de los postulados de Koch.	41
<b>Figura 3.1.</b> Aislados de género <i>Rhizopus</i> nativos del cultivo de zarzamora.	48
<b>Figura 3.2.</b> Frutos inoculados con diferentes aislados del género <i>Rhizopus</i> después de 72 h.	51
<b>Figura 3.3</b> Gráfica de evolución cronológica del daño causado por los aislados del género <i>Rhizopus</i> en fruto de zarzamora.	52
<b>Figura 3.4.</b> Fruto de zarzamora con calidad de exportación visto al microscopio estereoscópico.	54
<b>Figura 3.5.</b> Infección por <i>R. stolonifer</i> a las 24 h.	56
<b>Figura 3.6.</b> Fruto infectado por <i>R. stolonifer</i> a las 48 h.	57
<b>Figura 3.7.</b> Infección por <i>R. stolonifer</i> a las 72 h.	58
<b>Figura 3.8.</b> Estructuras características encontradas en fruto de zarzamora al ser infectado por <i>R. stolonifer</i> .	60
<b>Figura 3.9.</b> Morfología de las colonias formadas por los agentes antagonistas en medio PDA.	62
<b>Figura 3.10.</b> Antagonismo de <i>B. licheniformis</i> y <i>B. subtilis</i> aislado de suelo versus el aislado A de <i>R. stolonifer</i> .	63
<b>Figura 3.11.</b> Antagonismo de <i>B. licheniformis</i> y <i>L. aquatica</i> versus aislado C de <i>R. stolonifer</i> .	64



<b>Figura 3.12</b> Producción de sideróforos por aislados bacterianas en MCAS.	65
<b>Figura 3.13.</b> Producción de sideróforos por <i>R. stolonifer</i> aislado C en MCAS como solución indicadora.	66
<b>Figura 3.14.</b> Actividad antifúngica de <i>L. aquatica</i> y <i>B. licheniformis</i> hacia <i>R. stolonifer</i> aislado A, en presencia de hierro.	67
<b>Figura 3.15.</b> Actividad antifúngica de <i>B. licheniformis</i> (derecha) y <i>L. aquatica</i> (izquierda) hacia <i>R. stolonifer</i> aislado C.	68
<b>Figura 3.15.</b> Bioensayos de antagonismo <i>in situ</i> hacia <i>R. stolonifer</i> aislado A.	70
<b>Figura 3.16.</b> Bioensayos de antagonismo <i>in situ</i> hacia <i>R. stolonifer</i> aislado C.	71

**RESUMEN:**

Recientemente se han detectado y demostrado varios de los efectos secundarios que ocasiona el uso de fungicidas sintéticos sobre la biosfera, medio ambiente, salud humana y la generación de resistencia en diversos fitopatógenos. Por lo que, el uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha ofrece una opción viable con resultados alentadores. El objetivo de la presente investigación fue obtener la microbiota nativa asociada al cultivo de la zarzamora para discernir entre ésta los efectos antagónicos potenciales hacia *Rhizopus stolonifer*, considerado a nivel mundial como un fitopatógeno destructivo para productos agrícolas.

Se aisló la microbiota nativa de un cultivo comercial de zarzamora variedad 'Brazos' de muestras de plantas provenientes de la localidad exportadora de Atapan, Michoacán. Se evaluó la patogenicidad de 5 aislados del género *Rhizopus*, y posteriormente el potencial antagónico de 113 microorganismos al confrontarse *in vitro* sobre medio PDA, evaluándose el índice antifúngico de los más efectivos. Por medio de confrontaciones *in situ* con los aislados de *R. stolonifer* obtenidos, se determinó el grado de severidad, el porcentaje de inhibición así como el porcentaje de incidencia de la enfermedad.

Cuatro aislados bacterianos mostraron actividad antagónica en contra de los 2 aislados de *R. stolonifer*, 3 pertenecen al género *Bacillus* y uno al género *Leifsonia*, del cual no existen reportes anteriores sobre actividad antagónica hacia fitopatógenos. Se obtuvo un índice antifúngico con una media de hasta 42.78% *in vitro* y una incidencia de la enfermedad de 15% (Tukey  $p < .005$ ). Se obtuvo también una descripción detallada del proceso infectivo del hongo en el fruto.

Es elemental profundizar en la investigación de las interacciones entre fruto-antagonista-fitopatógeno con la finalidad de esclarecer los procesos biológicos emergentes que dan paso a los mecanismos de acción implicados en el control biológico para comprender su funcionamiento y así desarrollar estrategias tecnológicas de manejo integrado de enfermedades postcosecha y por consecuencia lograr sistemas agrícolas productivos de forma sustentable.



**ABSTRACT:**

The use of synthetic fungicides render severe side effects affecting the biosphere, environment, and human health, they even induce resistance on plant pathogens. The usage of antagonist microorganisms against postharvest pathogens offers a viable option with hopeful results. In this study the main purpose is to obtain the native microorganisms associated to blackberry fruit crop in order to determine the potential antagonist effects over the soft rot caused by *Rhizopus stolonifer*. This fungus disease is considered a devastating threat fungus for fruits and vegetables worldwide.

Native microbiota was isolated from plant 'Brazos' variety samples of a commercial blackberry fruit exporter zone located in Atapan Michoacán, Mexico. The pathogenicity of 5 isolates from *Rhizopus* genus was determined. The antagonistic potential *in vitro* of 113 microorganisms was evaluated on PDA medium, such as antifungal index of the most effective antagonists. Confrontations against *R. stolonifer in situ* were also evaluated, determining severity grade, inhibition percentage and incidence of disease percentage.

Four bacterial isolates showed efficient antagonistic activity against two *R. stolonifer* isolates. Three of them belong to *Bacillus* genus and the last one to *Leifsonia* genus, which had no antagonistic properties on previous reports.

The main antifungal index had a mean up to 42.78% *in vitro*, while the disease incidences were significantly reduced to a 15% (Tukey  $p < 0.005$ ). Also a detailed description of infection process for blackberry fruit in particular was obtained.

A deeper understanding on the interactions among fruit, antagonist and postharvest's pathogens is needed in order to elucidate the biological process previous to mechanisms of action involved in biological control. This information could help to develop technological strategies applied to integrated postharvest disease management and consequently achieve productive and sustainable agricultural systems.



# Capítulo I. Introducción

## 1.1 Zarzamora (*Rubus fruticosus*)

### 1.1.1 Historia, Morfología, Taxonomía y Clasificación de los cultivares

Procedente mayormente de América, oeste de Europa, algunas zonas de Asia y del Ártico, la zarzamora (género *Rubus* spp.) figuró en el pasado como una especie invasiva, pero también como una fuente de alimento interesante para diversas especies animales. Posteriormente los frutos fueron considerados como un recurso alimentario de temporada y las plantas fueron usadas por sus propiedades medicinales. Hasta finales del siglo XIX, la demanda por los frutos permitió que se considerara como un cultivar (Strik *et al.*, 2007).

Taxonómicamente, la zarzamora pertenece a la familia de las rosáceas (Tabla 1.1) por lo que crece de forma arbustiva, presentando tallos leñosos dotados de espinas. Las hojas tienden a distribuirse de forma imparipinnada, constando de tres a cinco folíolos los cuales son ovados con bordes aserrados, el haz presenta coloración verde intenso brillante, mientras que el envés es blanquecino con pilosidad. Presenta flores de hasta tres centímetros de diámetro, las cuales crecen en racimos al final de las ramas, constan de 5 pétalos variando de blanco a rosado, y 5 sépalos. La infrutescencia forma una polidrupa, la cual consta de diversas drupas individuales arracimadas a un eje central (Berg, 2008) (Figura 1.1).



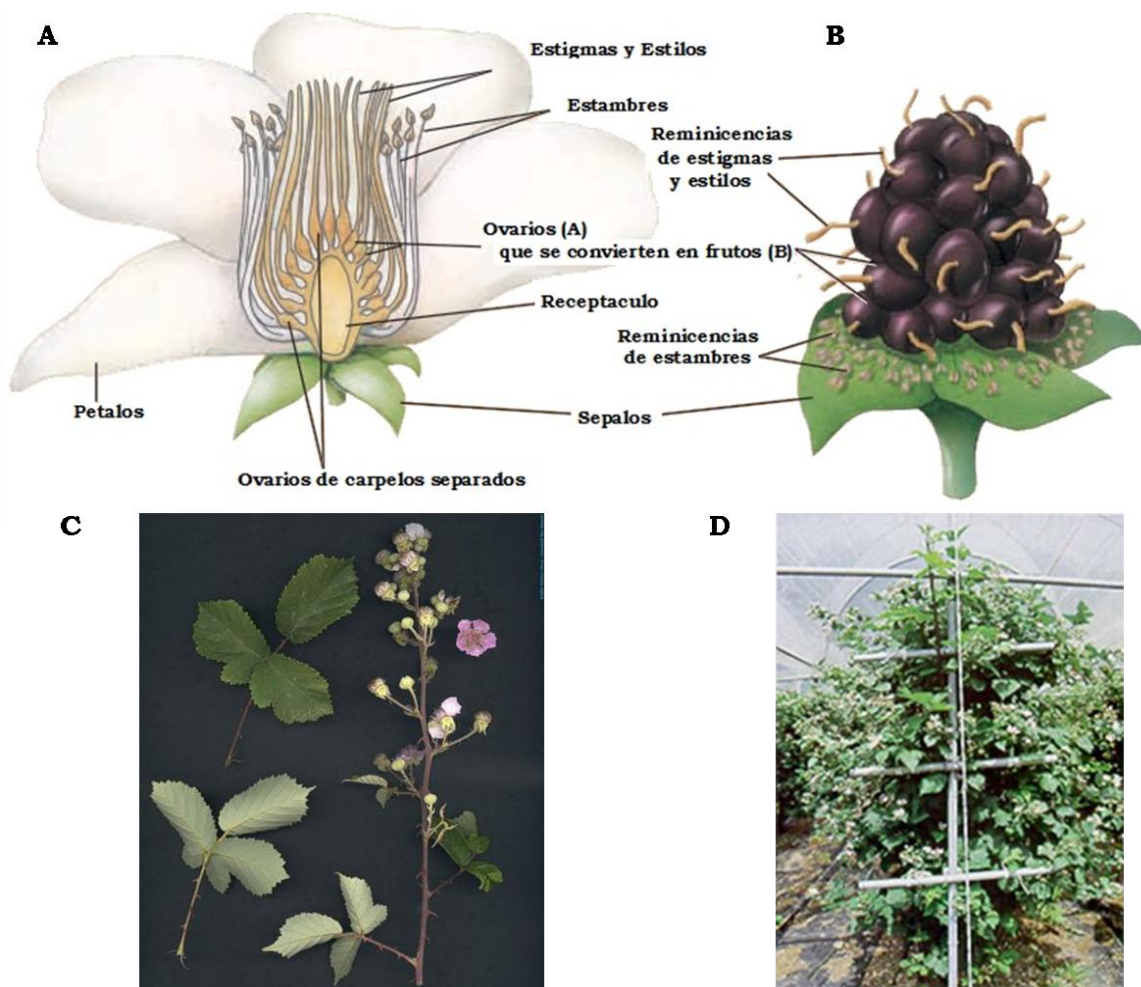
**Tabla 1.1.** Clasificación taxonómica de la zarzamora variedad 'Brazos' (USDA, 2011).

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reyno	<i>Plantae</i>
Subreyno	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosoideae</i>
Genero	<i>Rubus</i>
Especie	<i>fruticosus</i>
Variedad	'Brazos'
Nombre binominal:	<b><i>Rubus fruticosus</i></b>

Son diversos los cultivares y las especies mejoradas que han tomado lugar en el mundo comercial de este cultivo, los mayormente usados alrededor del mundo se clasifican en tres tipos, según las estructuras de sus cañas: 1) Los cultivares rastreros necesitan de tutores o soportes para llevar a cabo su producción, comprenden las variedades 'Marion', 'Silvan', 'Black Dimond' y 'Thornless Evergreen'; sus frutos son redondeados y suaves, por lo que son mayormente comercializadas como mermeladas o bases frutales para alimentos. 2) Cultivares como 'Chestern Thornless', 'Thornfree', 'Loch Ness', 'Dirksen Thornless', 'Hull Thornless', 'Smoothstem', 'Gazda' y 'Čačanska Bestrna' presentan cañas semierectas, sus frutos son ligeramente redondeados y consistentes, con posibilidad de comercializarse en fresco o congelados, por otra parte los frutos de los híbridos de zarzamora-frambuesa de las variedades 'Boysen' y 'Logan', se comercializan procesados. 3) Y las variedades de cañas erectas como la 'Brazos', 'Tupy', 'Kiowa', 'Ouachita', 'Apache', 'Chickasaw' y 'Cherokee', además de las variedades sin espinas 'Navaho' y 'Arapaho', resultan ser mejores para comercialización de fruto en fresco ya que éste es más firme y grande en comparación con las demás variedades, en esta clasificación se incluyen los cultivares desarrollados



recientemente en la Universidad de Arkansas llamados 'Prime-Jan' y 'Prime-Jim' los cuales son erectos con espinas y tienen la capacidad de fructificar en las cañas principales. Los cultivares erectos y semierectos cultivados de forma comercial, también necesitan tutores para controlar el crecimiento de las cañas ya que estas al ser muy largas tienden a doblarse hacia el suelo 4) También en México se encuentran cultivares silvestres del tipo *R. americanus*, *R. laciniatus* y *R. ulmifolius*, aunque en menor medida por ser carentes de uso comercial (Strik *et al.*, 2007).



**Figura 1.1.** Morfología del cultivar de zarzamora variedad 'Brazos'. Morfología de A) Flores; B) Fruto; C) Hojas y Ramas; D) Cultivar comercial de tipo erecto, variedad 'Brazos' con tutores (Berg, 2008).



### **1.1.2 Composición química del fruto**

Alrededor del mundo los frutos conocidos como berries son valorados, reconocidos y cotizados por su sabor dulce, aroma afrutado y actualmente por sus propiedades nutraceuticas. La composición química de los frutos de zarzamora puede ser variable dependiendo del cultivar, el lugar de establecimiento del cultivo y el estado de madurez al ser cosechado, ya que estos son frutos no climatéricos con respecto a su producción y respuesta al etileno (Perkins-Veazie *et. al.*, 2000; Talcott, 2007). En general, las zarzamoras se componen por carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra dietética, ácido málico (siendo el ácido orgánico predominante), ácido ascórbico, ácido fólico, carotenoides y polifenoles concentrados que les otorgan el color, sabor y propiedades nutraceuticas que los caracteriza, además de contener también trazas minerales (Talcott, 2007). En particular, la sacarosa es el carbohidrato mayoritario de los frutos verdes, sin embargo, en el proceso de madurez éste es rápidamente hidrolizado a fructosa y glucosa quedando menos del 1% del contenido de este disacárido en los frutos maduros, por lo cual puede ser consumido por diabéticos (Tabla 1.2) (Reyes-Carmona *et. al.*, 2005; Kafkas *et. al.*, 2006).

### **1.1.3 Actividad nutraceutica y compuestos fitoquímicos**

Investigaciones actuales corroboran el hecho de que enfermedades de orden cardiovascular como la arterioesclerosis, y crónicas degenerativas como el cáncer y la diabetes se encuentran íntimamente ligadas a los hábitos alimenticios a los cuales se ha acostumbrado el ser humano o bien, a los cuales está sometido por los ritmos de la vida cotidiana actual, resultando en el incremento de la incidencia de las mismas (Yildiz y Peral-Eyduran, 2009;



Hai-Liu, 2007). Tales hábitos alimenticios excluyen las porciones diarias recomendadas de frutas y vegetales, los cuales son proveedores, en gran escala, de compuestos funcionales, como la fibra dietética, vitaminas, y clorofila, los cuales promueven el buen funcionamiento del organismo, y nutraceuticos como los polifenoles, flavonoides, isoflavonas, y tocoferoles, que por su parte confieren un efecto protector debido a sus capacidades antioxidantes, las cuales evitan que la célula sufra posibles daños de tipo oxidativo causados por radicales libres, además de reducir los niveles de grasa en sangre (Wada y Ou, 2002; Yildiz y Peral-Eyduran, 2009). Así los frutales conocidos como berries, se distinguen por contener compuestos nutraceuticos (Tabla 1.3), siendo reportados como uno de los 50 productos mayormente consumidos y como uno de los mayores suministros de compuestos antioxidantes en la dieta de norteamericanos y europeos, aportando hasta 5.75  $\mu\text{mol}$ /porción consumida (144 g, 1 taza). Como resultado al conocimiento de tales hechos, en los últimos años, se ha despertado un gran interés en los consumidores del mundo hacia la adquisición de frutos frescos de zarzamora (Halvorsen *et al.*, 2006; Talcott, 2007; Yildiz y Peral-Eyduran, 2009).

**Tabla 1.2.** Composición química del fruto de zarzamora por cada 100 g (Talcott, 2007).

Contenido Químico del Fruto de Zarzamora								
Compuesto	Unidad	Cantidad	Vitaminas	Unidad	Cantidad	Minerales	Unidad	Cantidad
Sacarosa	%	0.12-0.26	Acido Ascorbico Total	mg	21	Calcio (Ca)	mg	29
Fructosa	%	2.11-3.38	Tiamina	mg	0.02	Hierro (Fe)	mg	0.62
Glucosa	%	1.58-2.61	Rivoflavina	mg	0.03	Magnesio (Mg)	mg	20
Solidos Solubles	°Brix	10.8-11.4	Niacina	mg	0.65	Fosforo (P)	mg	22
Solidos Totales	%	8.20-13.6	Acido Pantotenico	mg	0.28	Potasio (K)	mg	162
Acido Málico	%	0.06-1.10	Vitamina B6	mg	0.03	Sodio (Na)	mg	1
pH	pH	2.55-4.28	Folato Total	$\mu\text{g}$	25	Zinc (Zn)	mg	0.53
Acidez Titulable	%	0.16-4.22	Vitamina A	IU	214	Cobre (Cu)	mg	0.17
			$\alpha$ -Tocoferol	mg	1.17	Manganeso (Mn)	mg	0.65
			$\beta$ -Tocoferol	mg	0.04	Selenio (Se)	mg	0.4
			$\gamma$ -Tocoferol	mg	1.34			
			$\Delta$ -Tocoferol	mg	0.9			
			Vitamina K	$\mu\text{g}$	19.8			



**Tabla 1.3.** Actividad antioxidante y compuestos fitoquímicos en el fruto de zarzamora (Wada y Ou, 2002).

<b>Compuestos Fitoquímicos Nutraceuticos en Fruto de Zarzamora</b>	
<b>ORAC<sup>a</sup></b>	175 $\mu$ mol de TE/g*
<b>Compuestos Fenólicos</b>	30.94 mg/g*
de los cuales:	
Ácido Gálico	0.13 mg/g*
Rutina	1.50 mg/g*
Quercitina	2.5 mg/g*
Isoquercitrina	0.38 mg/g*
Ácido Elágico	1.50 mg/g*
Catequina	1.40 mg/g*
Epicatequina	11.20 mg/g*
Ácido Hidroxibenzoico (salicílico)	3 mg/g*
Ácido Hidroxicinámico	8.8 mg/g*
<b>Antocianinas</b>	5.69 mg/g*
de las cuales:	
cianidina 3-glucósido	80.43%
cianidina 3-arabinósido	10.19%
cianidina 3-(6'- malonil)glucósido	6.06%
Otras	3.40%

**a** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) expresado en Equivalentes Trolox (análogo de vitamina E). \* Expresado por gramos de materia seca.

#### 1.1.4 Producción de zarzamora en el mundo

El interés por el cultivo de las especies de zarzamora (*Rubus sp.*) ha crecido substancialmente en los últimos años, específicamente por las especies comercializables para su consumo en fresco, autores como Clark (2006), lo atribuyen a factores como: a) El desarrollo de especies con mayor vida de



anaquel, calidad, adaptación y libres de espinas. b) El incremento en la mercadotecnia enfocada a la promoción de beneficios a la salud relacionados con el consumo de este producto frutícola. c) El Incremento en el desarrollo de tecnologías para su cultivo. d) El desarrollo de técnicas de manejo postcosecha.

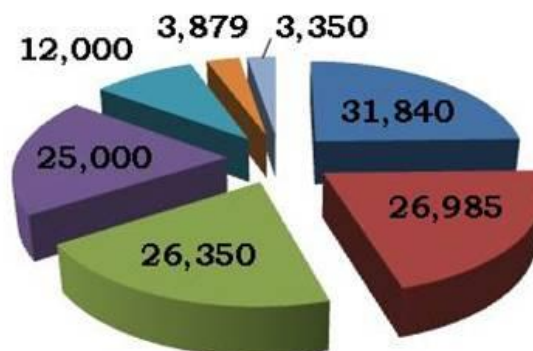
Es abundante la producción de zarzamoras en el mundo, cultivándose gran diversidad de variedades. En Europa se reportaron alrededor de 7,692 ha cultivadas en el 2005, siendo Serbia y Hungría los mayores productores en este continente, cerca del 90% de la producción es procesada, se cultivan mayormente variedades semierectas y rastreras. Asia cultivó en el mismo año alrededor de 1,550 ha de las variedades ‘Chester Thornless’ y ‘Hull Thornless’ (semierectos) y con menor producción de ‘Boyse’, ‘Marion’ y ‘Siskiyou’. Tanto en Oceanía como en África la producción es escasa contando 259 ha y 100 ha, siendo los mayores productores Nueva Zelanda (‘Boysen’) y África del Sur (‘Hull Thornless’, ‘Loch Ness’, ‘Choctaw’ y ‘Arapaho’). El mayor productor de zarzamoras en la actualidad es el continente Americano siendo Estados Unidos de América el principal productor en el mundo. Para el 2005, se reportaron 4,818 ha cultivadas mayormente en los estados de Oregon, California, Texas, y Georgia, cultivando las variedades ‘Marion’, ‘Boysen’, ‘Thornless Evergreen’ y ‘Silvan’, comercializando el 95% de la producción como productos procesados. Por su parte México aumentó drásticamente la producción de zarzamora de 1995 al 2004 aportando 32% de la zarzamora producida en Norte América, así el país mexicano se coloca como el segundo productor más importante de zarzamora en el mundo, sin embargo, sigue siendo el principal de frutos para comercialización en fresco (Strik *et al.*, 2007) (Figura 1.2).





### Principales Productores de Zorzamora en el Mundo (Mg)

■ E.U.A. ■ México ■ China ■ Serbia ■ Hungría ■ Chile ■ Nueva Zelanda



Producción Total: 129,404 Mg

**Figura 1.2.** Principales países productores de zorzamora en el mundo (2005) (Strik *et al.*, 2007).

#### 1.1.5 Perfil productivo y comercial de la zorzamora mexicana

Con una historia bastante alentadora, México ha sobresalido en la exportación de berries en el mundo. Desde la diversificación de productos de exportación en los países Latinoamericanos, México incursionó tomando importancia a nivel internacional en el mercado frutícola, postulándose como uno de los principales productores de zorzamora en el mundo y aportando el 7% de la producción mundial de este fruto en 1995 (Muñoz y Juárez, 1995). Para el 2004, entre los países de América Latina y el Caribe, México ocupó el tercer lugar como país productor contribuyendo con el 13% de las exportaciones de frutales, entre los cuales la zorzamora figuraba como uno de los productos principales (Benavides y Segura, 2006). En el periodo de



1995-2005, debido al desarrollo de técnicas especializadas en su producción, se distingue un incremento explosivo en la obtención de este frutal llegando a cotizar la tonelada en \$20,139.00 pesos en los mercados internacionales, considerándose actualmente como una de las mayores fuentes de ingresos económicos para el país (SEDRU, 2010). Finalizando la década de 1995-2005 México contaba con un total de 2,300 ha cultivadas que produjeron un total de 28,985 Mg de fruto. Cerca de la totalidad de la producción de zarzamora en México se destina a su comercialización en fresco en países de Europa, Norte América y Asia, por lo que se cultivan variedades de tipo erecto con fruto grande, firme, de color llamativo y aroma afrutado. En su mayoría los cultivares son de la variedad 'Brazos' y 'Tupy' aunque también se cultivan las variedades 'Cherokee', 'Apache', 'Shawnee', 'Comanche', 'Choctaw' y 'Arapaho', así como la variedad 'Sleeping Beauty' de uso exclusivo de la compañía Driscoll's (Calderón-Zavala, 2006; Clark, 2006; Strik *et al.*, 2007).

### **1.1.6 Manejo del Cultivo en México**

A partir de 1995, la producción de zarzamora crece de forma acelerada, debiéndose al desarrollo de sistemas y técnicas de cultivo desarrolladas a partir de la investigación en campo, con el objetivo de extender la temporada de fructificación de las variedades 'Brazos' y 'Tupy'. México cuenta con un sistema extensivo de producción de zarzamora único en el mundo, lo cual le permite obtener alto rendimiento en los cultivares y ser el segundo productor más importante a nivel mundial (Calderón-Zavala, 2006; Clark, 2006; Strik *et al.*, 2007).

Dicho sistema de producción forzada, consta de la aplicación de un defoliante en el cual se mezcla urea ó sulfato de amonio (20%), con sulfato de cobre (3%) y aceite agrícola (2%), esta solución se aplica de dos a tres veces después de que emerge la caña principal. Posteriormente se cortan las



puntas de las cañas y los laterales se reducen 30 cm para después aplicarse promotores de crecimiento como giberelinas o fenil ureas, siendo ampliamente usado el Thidiazurón (TDZ); estas son sustancias con actividad citocinínica, que se asperjan aproximadamente tres semanas después de la defoliación promoviendo el brote de nuevas cañas y la floración, para después de 90 a 100 días cosechar los frutos. Antes de defoliar nuevamente, se aplica una mezcla de sulfato de zinc, cobre y boro para detener el crecimiento tan acelerado y “sazonar” la planta. Esta práctica se lleva a cabo varias veces durante la temporada para obtener varias cosechas en el temporal de Octubre a Mayo para el mercado internacional y la última cosecha de Mayo a Junio para el mercado local, después de esto, las cañas se cortan a nivel del suelo y se dejan crecer para el temporal siguiente. El sistema de producción usado por los productores mexicanos es único en el mundo, permitiéndoles obtener frutos de alta calidad durante la mayor parte del año para abastecer el mercado Norte Americano, Europeo y Asiático (Calderón-Zavala, 2006; Strik *et al.*, 2007).

### **1.1.7 Cosecha y Manejo Postcosecha**

Por lo general la cosecha se lleva a cabo en las primeras horas de la mañana, después de que no haya rocío en los frutos, procurando temperaturas frescas. La cosecha de la zarzamora debe ser retrasada hasta obtener una madurez óptima ya que no son frutos climatéricos, por otra parte, no se debe dejar sobre madurar ya que esto acortaría notablemente la vida de anaquel. El objetivo de cosechar en plena madurez implica que el fruto haya acumulado los azúcares suficientes para tener un buen balance entre su acidez, dulzor y astringencia. En México, la cosecha se hace de forma manual, desprendiendo directamente el fruto de la planta para colocarlo en un contenedor tipo ‘Clamshell’ sin procesos intermediarios de lavado o desinfección. Los frutos se toman cuidadosamente para evitar pinchaduras o



daños mecánicos ya que son delicados y una herida implicaría la entrada de fitopatógenos. Los frutos defectuosos, con drupelas de coloración diferente, muy pequeñas, con pocas drupelas o dañadas, son colectados en contenedores aparte, ya que son procesados como jugos, concentrados, bases, o mermeladas. Ya colectados los frutos son llevados por el colector a un proceso de control de calidad en donde son examinados visualmente, los envases son sellados, empacados en cajas y estivados sobre soportes de madera para evitar el contacto con el piso, después se les retira el calor de campo por medio de aire forzado bajando la temperatura hasta 1°C durante dos horas. Finalmente los frutos se embarcan a su destino en camiones con cámaras a bajas temperaturas. Generalmente se exhiben en los supermercados a temperaturas entre los 14°C y 16°C, temperatura óptima para mantener la calidad del fruto, pero no la suficiente para detener a algunos fitopatógenos postcosecha (Calderón-Zavala, 2006; Strik *et al.*, 2007; Talcott, 2007; Llamas, 2010).

### **1.1.8 Zona productora en Michoacán**

En su mayoría la producción de zarzamora en México es llevada a cabo en el Estado de Michoacán, específicamente en las ciudades de Los Reyes, Atapan, Zamora, Uruapan, Peribán, Tangancicuaro, Ario de Rosales, Tacámbaro y Ziracuaretiro, aunque el cultivo está ampliamente extendido en todo el Estado. Michoacán ofrece las condiciones idóneas para el desarrollo del cultivo, contando con vegetación propia de ecosistemas boscosos (pino-encino) la cual favorece un clima templado y una alta humedad relativa, sin embargo, las condiciones óptimas para el desarrollo del cultivo, propician de igual manera el buen desarrollo de una amplia gama de hongos, entre los cuales algunos resultan ser fitopatógenos que han afectado la economía de los productores por los problemas fitosanitarios en estadios postcosecha que



han surgido en los últimos años (Cajuste *et al.*, 2000; Calderón-Zavala, 2006).

## 1.2 Género *Rhizopus*

El agroecosistema en el cual se desarrolla el cultivo de la zarzamora, cuenta con características que favorecen la proliferación de una gran variedad de hongos, incluyendo a varias especies del género *Rhizopus*, este es considerado un género cosmopolita ya que sus especies son capaces de subsistir en diversos ecosistemas y condiciones cumpliendo varias funciones biológicas, al mismo tiempo que son de interés científico en los ámbitos gastronómico-biotecnológico, ya que especies como *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus oligosporus* son objeto de investigación en procesos de fermentación por medio de los cuales se obtienen productos típicos como el sake (bebida alcohólica asiática) y el tempe (alimento a base de soja parecido a la carne) (Egounlety y Aworh, 2003; Zhang-Fengying, 2007); industrialmente se usan varias especies para la obtención de saborizantes artificiales (citronelilo) ó aditivos alimentarios como el ácido láctico (Soccol *et al.*, 1994; Melo *et al.*, 2005); en biotecnología para la obtención de enzimas amilasas termoresistentes con la especie *Rhizopus microsporus* (Piexoto *et al.*, 2003), y en el campo agrícola, en donde la especie *Rhizopus stolonifer* en particular es de amplio interés, ya que la enfermedad que genera, conocida comúnmente como ‘pudrición blanda’, es considerada como uno de los principales y más destructivos factores biológicos que atacan a los frutos en estadios postcosecha alrededor del mundo (Quing *et al.*, 2002).



### 1.2.1 *Rhizopus stolonifer*, agente causal de podredumbre blanda

La especie fúngica *Rhizopus stolonifer* (Tabla 1.4), es un hongo versátil capaz de sobrevivir a temperaturas de hasta 4°C como mínima y 38°C como máxima, al igual que puede desarrollarse a una amplia gama de humedades relativas. Se caracteriza por ser buen colonizador de los restos de plantas y por ser infeccioso para los frutos maduros después de haber sido cosechados, usando heridas o hendiduras naturales como entradas. Su velocidad de crecimiento es rápida en comparación a otros hongos y sus esporas se dispersan fácilmente por el suelo y el aire, lo que le permite colonizar rápidamente a los productos hortofrutícolas en almacenamiento destruyéndolos en pocos días. Es fácilmente reconocido debido a que es un hongo filamentoso con características distinguibles, forma micelio cenocítico el cual es aéreo y filamentoso de color blanco característico de la especie, con esporangios visibles que dan un aspecto de punteado negro a simple vista. En microscopio pueden distinguirse fácilmente las estructuras que lo caracterizan como los rizoides amplios y complejos, esporangióforos erectos, esporangios redondeados y esporangiosporas, ambos en color negro (Shipper, 1984; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006; Mitcham *et al.*, 2007; Bautista-Baños *et al.*, 2008; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2009;).

**Tabla 1.4.** Clasificación taxonómica de *Rhizopus stolonifer* (Shipper, 1984; Agrios, 2002).

Dominio:	<i>Eukaryota</i>
Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Zygomycota</i>
Subfilo:	<i>Mucoromycotina</i>
Clase:	<i>Zygomycetes</i>
Orden:	<i>Mucorales</i>
Familia:	<i>Mucoraceae</i>
Genero:	<i>Rhizopus</i>
Especie:	<i>stolonifer</i>

Nombre binominal: ***Rhizopus stolonifer***



*R. stolonifer* ataca macerando los tejidos de los frutos por medio de la hidrólisis que genera al excretar enzimas pectinolíticas, las cuales disuelven y degradan la pectina de la lámina media de las células vegetales, generando zonas hidróticas con olor desagradable y en algunos casos con fermentación. Se le ha reportado y reconocido como uno de los fitopatógenos postcosecha más destructivos y severos alrededor del mundo, siendo causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda en diversos frutos y vegetales, y apareciendo más comúnmente en las drupas con hueso como los duraznos y ciruelas, así como en berries, papayas, jitomates y tomates, además de todo tipo de cucurbitáceas, ajos, tubérculos como papas, camotes, betabel, zanahorias y yuca, y otros productos hortofrutícolas como cacahuates, frijol, chícharo, cebolla, chiles, tulipanes, cormos de gladiolos, brócoli, col y coliflor, por lo cual se ha recurrido a diversos métodos de control para reducir las mermas económicas que este agente biológico causa en el mercado (Herrera y Ulloa, 1998; Agrios 2002; Quing *et al.*, 2002; Korsten y Wehner, 2003; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2009). Debido a las pérdidas monetarias que representa la aparición de ésta enfermedad, y a que es un microorganismo que se encuentra presente naturalmente en la cutícula de los frutos se ha optado por diferentes métodos de control para detenerlo (Bautista-Baños *et al.*, 2008; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

### **1.3 Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer***

#### **1.3.1 Fungicidas**

Diversas sustancias de acción fungicida han sido usadas para controlar este agente biológico, los mejores resultados se han obtenido usando Dicloran en frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y duraznos (*Purunus persica* Batsch). El Iprodine ha sido de mayor aceptación controlando la enfermedad



en frutos de jitomate en almacén, sin embargo, su producción fue cancelada de manera voluntaria en 1996 debido a que representaba un factor de riesgo social y ambiental. Posteriormente se formularon fungicidas de menor impacto ambiental como el fludixonil y el tebuconazole, los cuales son efectivos en duraznos, nectarinas (*Purunus persica* L. Var. Nectarina) y ciruelas (*Spondias purpurea*), otros fueron el benomil y miclobutanil. Si bien se ha corroborado la efectividad de dichas sustancias, debe reconsiderarse su uso para el control de dicho agente fitopatógeno por diversas razones: 1) *R. stolonifer* ha desarrollado resistencia al dicloran, benomil y miclobutanil, resultando en una incidencia mayor; 2) Los fungicidas son derivados del petróleo por lo que contribuyen a la emisión de gases invernadero y sus costos aumentan continuamente afectando la economía de los productores; 3) En campo tienen efecto nocivo hacia organismos benéficos para los cultivos; 4) Representan un riesgo social y ambiental (Mari y Gouzzardi, 1998; Adaskaveg *et al.*, 2002; Müller, 2002; Northover y Zhou, 2002; Tiripathi y Dubey, 2004; Jasso-de Rodríguez *et al.*, 2005; Fröster *et al.*, 2007; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Control Químico

Algunos productos químicos ofrecen actividad fungicida o fungistática controlando la pudrición como el peróxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), reduciendo la germinación de esporas en pruebas *in vitro*; óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), retrasando la infección en fresa (*Fragaria x ananasa*); ozono ( $\text{O}_3$ ), probado en uvas (*Vitis vinífera*) controlando la pudrición por completo; molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ), reduciendo el diámetro de las lesiones hidróticas en manzanas (*Malus sylvestris*), etanol en soluciones, reduciendo la germinación de esporas, ácido peracético en solución, con eficiencia total al tratar nectarinas. La aplicación de estos productos implica el incremento del precio de los productos hortofrutícolas ya que los costos de producción aumentan,





aunque algunos son relativamente de bajo costo (Sarig *et al.*, 1996; Qadir y Hashinaga, 2001; Nuñez *et al.*, 2001; Gabler *et al.*, 2004; Mari *et al.*, 2004; Zoffoli *et al.*, 2005; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

### **1.3.3 Control cultural pre y postcosecha**

Las buenas prácticas agrícolas son una medida que ayuda a reducir la aparición de la enfermedad en los productos hortofrutícolas, sin embargo, debe aplicarse en conjunto con otras técnicas para lograr buenos resultados: a) El control pre cosecha consiste en la buena selección del material genético del cultivo y el lugar donde se establecerá, las condiciones de aireación, humedad relativa y temperatura idóneas, las fechas propicias para establecer el cultivo y la adecuada desinfección de la herramienta de trabajo. b) Por su parte el control cultural postcosecha incluye un buen planeamiento de las fechas y horas de cosecha, la madurez con la que se recolecta el fruto, manipulación adecuada, selección del material de empaque y condiciones de traslado y almacenamiento. El control cultural ayuda a la reducción de la enfermedad, sin embargo, no es efectivo en su totalidad ya que las esporas de *R. stolonifer* pueden llegar al fruto de diversas maneras, por lo tanto debe conjuntarse con otras medidas para asegurar su éxito (Bautista-Baños *et al.*, 2008; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).

### **1.3.4 Control por atmósferas y radiaciones**

Las atmósferas modificadas ofrecen una opción viable y variable en costo dependiendo del gas utilizado para controlar la infección por *R. stolonifer*, pueden tener buenos resultados ya que actúan sinérgicamente con otros tratamientos al aplicarse simultáneamente (Romanazzi, 2001; Romanazzi, 2003). Igualmente efectivas pero de costo elevado, las radiaciones ultra



violeta (UV) aplicadas a los productos cosechados tienen la capacidad de “activar” cierto grado de resistencia interna en los frutos, haciéndolos menos susceptibles al decaimiento debido a la inhibición de las enzimas poligalacturonasa, y al ataque de fitopatógenos. Por otra parte, las radiaciones gamma han tenido éxito al inhibir totalmente el desarrollo de *R. stolonifer* de manera independiente y combinándose con otros tratamientos. Aunque resulta efectivo el control con atmósferas controladas y con radiaciones, los costes de los productos se elevan considerablemente, por lo que su aplicación se ve limitada a nivel comercial (Barkai-Golan et al., 1993; Stevens et al., 1997; Bazza-Zeinab et al., 2001; Stevens et al., 2004; Velázquez-del Valle et al., 2008).

### **1.3.5 Control con productos naturales**

Otras sustancias y técnicas más económicas y amigables con el medio ambiente han surgido junto con el desarrollo sustentable. La quitina desacetilada obtenida de los crustáceos, mejor conocida como quitosano, el cual es un polímero de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) unida por enlaces  $\beta(1-4)$ , se ha usado extensamente en la investigación para su aplicación comercial, debido a sus características fungicidas, no tóxicas, como inductor de resistencia y por ser biodegradable, las cuales hacen al quitosano un polímero con gran potencial de aplicación en el campo agrícola. (Stanford, 1989; El Ghaouth et al., 1992; Tiripati y Dubey, 2004; García-Rincon, 2008; Guerra-Sánchez et al., 2008; Hernández-Lauzardo et al., 2007, 2008). Por otra parte una gran gama de extractos vegetales han sido probados para corroborar su potencial como agentes antifúngicos. Los extractos de semillas de paraíso blanco (*Moringa oleifera*), los aceites esenciales de tomillo (*Thymus compactum*) y orégano (*Origanum compactum*), los vapores de mentol obtenidos de la menta (*Mentha x piperita*) y de lanilol obtenidos de la albahaca (*Ocimum basilicum*), así como los polvos de raíces de



kava (*Piper minthysticum*), han demostrado su actividad antifúngica inhibiendo la formación de micelio y esporulación del hongo. Aunque los extractos vegetales muestran una solución eficaz, la forma de obtener algunos resulta costosa y las investigaciones quedan en la fase *in vitro* (Edris y Farrag, 2003; Plotto *et al.*, 2003; Xuan *et al.*, 2003; Velázquez-Gurrola *et al.*, 2005).

### 1.3.6 Control por medio de microorganismos

Existen microorganismos que de manera natural se asocian formando relaciones simbióticas de comensalismo o de mutualismo con las plantas y que al colonizar y llevar a cabo su ciclo de vida presentan actividad antagonista hacia agentes fitopatógenos. Smilanick *et al.* (1993) observaron que en la superficie de los frutos habitaban levaduras soportando el ataque de los fungicidas comerciales y colonizando las superficies sin dejar espacio o alimento disponible para los patógenos. Se ha comprobado la eficiencia de cepas como *Pantoea agglomerans* al evitar la pudrición por *R. stolonifer* en nectarina, manzana, fresa, pera (*Pyrus communis* L.) y naranja (*Citrus sinensis* L.). Microorganismos como *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii* y *Pichia membranefaciens* han controlado efectivamente la pudrición blanda en cerezas dulces (*Prunus avium* L.), *C. laurentii* incluso actuando a temperaturas de almacenamiento y con atmósferas modificadas. El uso de microorganismos nativos asociados a las plantas resulta ser una alternativa viable, de bajo costo y fácil de obtener, por lo que las investigaciones actuales apuntan a la búsqueda de agentes biológicos en cultivos con actividad antagónica hacia los agentes causales de las enfermedades en los cultivos abriendo paso a la aplicación del control biológico a nivel comercial (Abdel-Mallek *et al.*, 1995; Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 2001; Quin *et al.*, 2004; Rancés *et al.*, 2006; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008).



## 1.4 Interacciones planta-microorganismo, microorganismo-microorganismo

En la historia de la biotecnología vegetal, se ha dilucidado un amplio número de interacciones entre plantas y microorganismos. Por su parte, las plantas ofrecen un gran número de hábitats ricos en nutrientes que promueven el crecimiento microbiano. Las superficies de semillas, raíces, hojas y frutos, pueden llegar a albergar una gran diversidad de comunidades microbianas, en tanto que las flores y tejidos vasculares se encuentran libres o alojan colonias específicas. Los microorganismos asociados a las plantas pueden desempeñar diferentes papeles por un lado deletéreos (parásitos) o bien, neutrales (comensalistas) o benéficos (mutualistas, sinérgicos), tendiendo a colonizar y mantener saludables a las plantas (Quing *et al.*, 2002; Beattie, 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009; Diallo *et al.*, 2011). Los microorganismos asociados a las plantas también interactúan entre sí, estas interacciones se dan entre los miembros de la misma colonia e incluso entre las diferentes colonias de la comunidad. En los casos de algunos géneros, las interacciones entre los individuos de una misma colonia afectan directamente a colonias de géneros diferentes. Es decir, al alcanzar o pasar un umbral de concentración celular, los individuos responden a señalizaciones moleculares como las acil-homoserina-lactonas en Gram negativas o pequeños oligopéptidos en Gram positivas, activando la expresión de genes específicos que desatan comportamientos colectivos como la secreción de ciertos metabolitos secundarios que afectan a otras colonias, reduciendo su número poblacional o incluso erradicándolas. Basado en este fenómeno llamado *quórum sensing*, surge el Control Biológico, en donde se incrementan las poblaciones de algún o algunos géneros microbianos con actividad antagónica hacia organismos específicos con la finalidad de controlar naturalmente las poblaciones de los fitopatógenos. El primer reporte biotecnológico del uso de un microorganismo como antagonista biológico, fue el de *Trichoderma spp.* controlando la



podrición causada por *Botrytis sp.* en plantas de fresa, sin embargo, el primer trabajo clásico de Control Biológico fue llevado a cabo bajo condiciones postcosecha, controlando la podrición café en drupas por medio de un aislado de *Bacillus subtilis* (Tronsmo y Denis, 1977; Pusey y Wilson, 1984; Beattie, 2006).

## 1.5 Control biológico postcosecha

En la mayoría de los casos, los fitopatógenos llegan a los productos hortofrutícolas desde el campo, manteniéndose como infecciones latentes que posteriormente se desarrollan durante los estadios de transporte o almacenamiento, aun más cuando el producto ha sufrido daños a causa de la manipulación. Alrededor del 20% al 25% de los productos agrícolas se pierden por causa de fitopatógenos de origen fúngico en el mundo, aun en los países desarrollados. El control biológico postcosecha ha resultado una alternativa viable para el manejo de enfermedades en frutos y vegetales en almacenamiento, ya que conjunta las características de ser efectivo, económico y seguro tanto para la salud humana como para la del ambiente. En la literatura, se muestran técnicas en las cuales el inóculo del antagonista puede incluirse en el producto de forma pre y postcosecha, siendo más utilizada por su eficacia la inoculación postcosecha por medio de inmersión o aspersión de las células, de los metabolitos o una fracción de éstos. Hasta hoy en día, bajo este principio se han diseñado algunos productos de uso comercial (Tabla 1.5), los cuales han demostrado eficientemente la reducción de las poblaciones de fitopatógenos, asegurando la calidad con la que los productos se comercializan en el mercado y evitando pérdidas económicas por mermas (Dorby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Quin *et al.*, 2004; Quing *et al.*, 2002).



**Tabla 1.5.** Productos comerciales para biocontrol de enfermedades postcosecha (Pusey y Wilson, 1984; McLaughlin *et al.*, 1990; Dorby, 1993; Mercier y Wilson, 1994; Wisniewski, 1995; Janisiewicz y Jeffers, 1997; Korsten *et al.*, 1997; Janisiewicz y Korsten, 2002; Dorby, 2006).

Producto	Agente Antagonista	Frutas/Vegetales	Patogenos Blanco	Distribuidor
Aspire	<i>Pichia guillermondii</i> + Thiobendazole	Citricos, manzanas y peras.	Diversos patogenos.	Ecogen-Israel Paternship Ltd.
Avogreen	<i>Bacillus subtilis</i>	Aguacate	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Cercospora</i> spp.	Cropcheck Ltd. Nueva Zelanda
BioSave	<i>Pseudomonas syringae</i>	Manzanas, peras, citricos, cerezas y papas.	<i>Penicillium</i> spp., <i>Botritis</i> spp.	EcoScience Corp. Orlando, EUA.
Blight Ban	<i>Pseudomonas fluorescense</i>	Manzanas, peras, fresas y papas.	<i>Erwinia</i> spp.	Nu Farm, Inc. EUA.
Contans WG, Intercept WG	<i>Coniothyrium minitans</i>	Cebolla	<i>Fusarium</i> spp., <i>Botritis</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.,	Prohyta Biologischer, Alemania.
Rhio-plus.	<i>Bacillus subtilis</i>	Papas y otros vegetales.	<i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Erysiphe</i> spp., <i>Liveillula</i> spp.	KFZB Biotechnick, Alemania.
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i>	Manzanas, peras, uvas y vegetales.	<i>Podosphaera</i> spp., <i>Sclerotium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp., <i>Puccinia</i> spp., <i>Alternaria</i> spp.	Agro Quess Inc., EUA.
YieldPlus	<i>Candida oleophila</i> + Thiobendazole	Citricos	<i>Penicillium</i> spp., <i>Geotrichum</i> spp.	YieldPlus Agricultural Products Africa del Sur.

Los microorganismos usados para el control biológico, cuentan con diversos mecanismos biológicos para controlar la acción de los fitopatógenos, entre los que se mencionan en la literatura la competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, producción de enzimas y parasitismo directo entre otros (Dorby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Köhl *et al.*, 2011).



### **1.5.1 Competencia por nutrientes y espacio**

Es mencionado que la competencia por nutrientes y/o espacio es considerado como uno de los principales mecanismos de acción por medio de los cuales los microorganismos antagónicos controlan a los fitopatógenos postcosecha. La toma de nutrientes de una manera eficiente, genera que un microorganismo tenga la capacidad de excluir naturalmente a otros de espacios naturales como las superficies de los frutos y vegetales, de igual manera con un crecimiento acelerado y/o una dispersión eficiente, se limita la posibilidad de colonización por microorganismos ajenos al medio, una mejor adaptación a diversas condiciones ambientales y nutricionales, asegura que los agentes antagónicos tengan éxito en el control de enfermedades postcosecha. Aunque es mencionado como el principal mecanismo de acción, también se argumenta que otros mecanismos pueden entrar en juego a la par (Compant *et al.*, 2005; Dorby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Babalola, 2010).

### **1.5.2 Formación de biosurfactantes y biopelículas**

Para permanecer en sus sitios de acción, los microorganismos despliegan dos estrategias, a saber: 1) la excreción de biosurfactantes como la iturina, fenacina, lychehisina y surfactina (*Bacillus spp*) que les facilitan adherirse o mantenerse en un sitio específico, o bien, 2) la generación de matrices de exopolisacáridos que forman biopelículas que cubren áreas de interés. Estos dos mecanismos permiten a los antagonistas fijarse a las superficies sobre las cuales actúan, pudiendo ser las heridas o cutículas de los productos frutales o vegetales, permitiéndoles competir más eficientemente por nutrientes, o bien cubrir las superficie de las estructuras de los patógenos, previniendo la germinación de esporas o permitiéndoles parasitar las hifas de éstos, también se ha propuesto que tanto los biosurfactantes como las



biopelículas facilitan la circulación de sustancias de acción antibiótica (Dorby *et al.*, 2009).

### 1.5.3 Antibiosis

La antibiosis consiste en la segregación al medio de sustancias con la capacidad de atrofiar, inhibir o destruir las células de los organismos fitopatógenos, por medio de productos del metabolismo secundario de los antagonistas, los cuales poseen cualidades antibióticas. Algunas sustancias reconocidas en trabajos clásicos de control biológico incluyen a la iturina (*Bacillus subtilis*), bacitracina (*Bacillus licheniformis* y *B. subtilis*), fenacina-1-ácido carboxílico (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.) siringomicina, pyrrolnitrina, (*Pseudomonas* spp.), 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (*Pseudomonas fluorescens*) y los alcaloides quinolizidínicos (*Burkholderia cepacia*), sin embargo, la secreción de dichos compuestos se encuentra estrechamente ligada a una señalización determinada por el fenómeno conocido como *quórum sensing*, por lo que es importante alcanzar una población mínima para que el control biológico se lleve a cabo bajo este principio. El control de enfermedades por medio de antagonistas que producen compuestos antibióticos es considerado como el segundo mecanismo de acción más importante (Hernández-Rodríguez, *et al.*, 2006; Sharma, *et al.* 2009; Babalola, 2010).

### 1.5.4 Producción de enzimas y parasitismo

La producción de enzimas líticas es otro mecanismo de acción identificado en algunos antagonistas. Debido a que la pared celular de los hongos está compuesta de quitina y  $\beta$ 1-3 glucano, o bien de celulosa y  $\beta$ 1-3 glucano (en el caso de algunos oomycetos fitopatógenos como *Phytophthora*), las enzimas





como las quitinasas,  $\beta$ 1-3 glucanasas, celulasas, lipasas y proteasas, producidas por algunos antagonistas, degradan las paredes celulares de los hongos fitopatógenos lisando sus células. Por otra parte, algunos agentes de biocontrol como *Pichia guilliermondii* y *Trichoderma* spp. son parásitos directos de algunos hongos fitopatógenos, fijándose a la pared celular o apresando las hifas de estos y posteriormente usando este tipo de enzimas para llevar a cabo el parasitismo directo al entrar a las células del fitopatógeno y alimentarse de estas (Quing *et al.*, 2002; Macagnan, *et al.*, 2005; Sharma, *et al.*, 2009).

### **1.5.5 Inducción de resistencia**

Aunque la inducción de resistencia en frutos es un campo poco dilucidado de la biotecnología y cuenta con pocos avances, se ha considerado como otro mecanismo de acción de los microorganismos antagonistas, propuesto en 1996 por Arras. Sin embargo, se tienen datos de que algunos oligosacáridos de la pared celular o sideróforos producidos por los antagonistas, funcionan como moléculas elicitoras promoviendo e incrementando la actividad de enzimas como  $\beta$ 1-3 glucanasas, peroxidasas, quitinasas, acumulación de fitoalexinas y la sobre producción de mucílago extracelular en las heridas de los frutos, las cuales promueven el proceso de sanación de la herida, por lo que se considera que inducen a un mecanismo de defensa propio del fruto (Hernández-Rodríguez, *et al.*, 2006; Sharma, 2009).

### **1.5.6 Sideróforos**

El hierro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) es un elemento biológicamente importante, especialmente para los microorganismos que viven en condiciones aerobias, debido a que es esencial para diferentes funciones como la reducción de precursores de DNA



y RNA, así como para la síntesis de ATP por cadena transportadora de electrones, de igual manera, es constituyente de diversos tipos de biomoléculas como los citocromos, clorofila, hemoproteínas, e incluso funciona como cofactor para un gran número de enzimas (Rachid y Ahmed, 2005; Macagnan *et. al.*, 2008; Logeshwaran *et. al.* 2009).

Los sideróforos son compuestos específicos quelantes de hierro los cuales son secretados por los microorganismos bajo condiciones de estrés causadas por una baja concentración de hierro en el medio, siendo su producción inversamente proporcional a la concentración de este elemento, dichas biomoléculas participan en la solubilización y el transporte de iones hierro hacia el interior de las células microbianas (Meyer y Abdallah, 1978; Rachid y Ahmed, 2005; Teixeira-Lacava *et. al.*, 2008). Dependiendo de la naturaleza de las moléculas para generar enlaces con el hierro, estos se pueden clasificar en sideróforos de hidroximato, carboxilato, catecolato y fenolato. Se ha reportado que los hongos son capaces de producir sideróforos del tipo hidroximato y carboxilato únicamente, por otra parte las bacterias son productoras de los cuatro tipos (Das *et. al.*, 2007; Pérez-Miranda *et. al.*, 2007). La producción de sideróforos por parte de los agentes antagónicos en cantidades suficientes puede generar biocontrol debido a que limitan la biodisponibilidad del hierro para algunos patógenos, incluso, estos pueden funcionar como, promotores de crecimiento vegetal o inductores de resistencia en plantas. Por otra parte, los sideróforos también se relacionan con la patogénesis, en especial los de tipo hidroximato, producidos por diferentes hongos fitopatógenos, incluyendo a los del género *Rhizopus* (Machuca y Milagres, 2003; Pérez-Miranda *et al.*, 2007; Macagnan *et. al.*, 2008; Nenwani *et. al.*, 2009;).



### 1.5.7 Liberación de compuestos volátiles

Se han reportado algunos otros compuestos volátiles de bajo peso molecular con poder biocida importante, tales como el ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno (HCN), el cual es liberado a la par con compuestos volátiles orgánicos como el 2,3-butaneidol y la acetoina, mismos que promueven el crecimiento vegetal. La pioluteorina es otro compuesto volátil reconocido en el campo de control de fitopatógenos por tener un amplio espectro antifúngico. Otras sustancias con esta naturaleza que han sido reportadas son las furanonas y el auxofuran (Ezziyyani *et al.*, 2004; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006; Babalola, 2010).

### 1.6 Género *Bacillus*

El género *Bacillus*, descrito por primera vez en 1872 por Cohn pertenece a la división de los 'Firmicutes', siendo bacterias en forma de bastón, ampliamente distribuidas en la naturaleza, creyéndose que aproximadamente el 95% de las bacterias baciliares encontradas en los suelos pertenecen a éste género. Las especies de *Bacillus* se encuentran dispersas por el suelo, aguas dulces y saladas, e incluso en el aire, muchas de estas forman asociaciones simbióticas con las plantas, por lo que se les encuentra en las hojas, raíces (al interior y exterior) y en la rizosfera. Su capacidad de formar endosporas les permite sobrevivir a condiciones adversas y poseen una gran adaptabilidad fisiológica y genética, lo que hace a muchas especies óptimas para su uso como agentes de control biológico. Algunas especies tienen propiedades promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) por su capacidad de solubilizar nitrógeno (diazotroficas), solubilizar fosfato y producir diferentes tipos de hormonas vegetales. En control biológico, varias especies resultan de interés debido a que son una fuente importante de genes que codifican para diversos tipos de enzimas que actúan



en contra de fitopatógenos, enzimas que detoxifican factores de virulencia o bien moléculas de interés con actividad antibiótica como la bacitracina, polymixina, tyrocidina, garamicidina y circulina, o la surfactina, lychehisina, iturina y fenacina que además de tener propiedades antibióticas también actúan como surfactantes. Otros genes encontrados en el género *Bacillus* codifican para moléculas con la capacidad de elicitar la activación de genes en plantas asociados a las rutas del ácido salicílico y del etileno/ácido jasmónico, teniendo así la capacidad de generar Resistencia Sistémica Inducida (ISR) al colonizar las plantas o los frutos. Estas características, hacen idóneas a algunas especies del género *Bacillus* como agentes de control biológico (Azevedo *et al.*, 1993; De la Rosa *et al.*, 2002; Moroginski *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2006; Beattie, 2006; Ahmad, 2008; Barriuso *et al.*, 2008; Egamberdiyeva e Islam, 2008; Sharma, 2008; De-Vleeschauwer y Höfte, 2009;).

### **1.7 *Leifsonia aquatica* (anteriormente *Corynebacterium acuaticum*)**

*Corinebacterium acuaticum* fue descrita por primera vez por Leifson en 1962 (Evtushenko, *et al.*, 2000), sin embargo, hoy en día se ha reclasificado dentro de un nuevo género nombrándose como *Leifsonia aquatica*. Se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva con forma de bacilo que no forma esporas. Naturalmente se ha encontrado en ecosistemas boscosos, asociada a aguas limpias, líquenes, rocas y a suelo rizosférico del árbol de la teca (*Tectona grandis*). Es capaz de formar agregados fácilmente, generando biopelículas para adherirse a las superficies. Tiene afinidad por los minerales por lo que es buena solubilizadora de los mismos, sin embargo, no se ha indagado sobre su relación con los agroecosistemas (Evtushenko, *et al.*, 2000; Rickard, *et al.*, 2003; An, *et al.*, 2009; Madhaiyan *et al.*, 2010).



## 1.8 Justificación

El interés por la investigación biotecnológica enfocada en el desarrollo y aplicación del control biológico, radica en reducir y reemplazar el uso de agroquímicos sintéticos en los productos hortofrutícolas, ya que al ser la mayoría de estos de consumo inmediato y en fresco, las sustancias usadas actualmente para su protección, tienen un impacto directo tanto en la salud del consumidor (especialmente en niños y ancianos), como en el bienestar ambiental. A pesar de esto, es una realidad tangible que alrededor del 20% al 25% de las frutas y vegetales cosechados en el mundo se pierden debido a la acción de fitopatógenos fúngicos en las etapas de traslado y almacenamiento aun en los países desarrollados. El uso de microorganismos asociados a los cultivos para el control de enfermedades postcosecha, surge como una alternativa económica, responsable social y ambientalmente, por lo que se considera como una herramienta potencial y substancial para el desarrollo de una producción agrícola sustentable, sin embargo, su uso no ha alcanzado la aceptación total por los productores agrícolas a pesar de los reportes científicos referentes al éxito en la aplicación de dicha biotecnología. Al analizar algunos casos en los que el control biológico no surte el efecto pronosticado, se han detectado dos principales causas: 1) las prácticas agrícolas en las cuales se implementan y aplican los microorganismos, y en mayor medida 2) a la diversidad biótica y abiótica de los agroecosistemas en los que se introducen y al cual son ajenos, de tal manera que la probabilidad de supervivencia es menor, aun más cuando dichos productos biológicos son conjugados con tratamientos convencionales (Compant, *et al.*, 2005; Dorby *et al.*, 2009; Sharma, *et al.*, 2009; Latour, *et al.*, 2009; Babalola, 2010; Diallo, 2011). Así en el presente trabajo de investigación, se pretende a nivel laboratorio obtener la microbiota nativa asociada al cultivo comercial de la zarzamora, con la finalidad de identificar agentes con poder antagónico, los cuales estén sujetos a las mismas condiciones del cultivo e incluso sean



capaces de controlar naturalmente la pudrición blanda de los frutos causada por *Rhizopus stolonifer*.

## 1.9 Hipótesis

El cultivo de la zarzamora cuenta con microorganismos asociados a la planta capaces de reducir la infección postcosecha por *Rhizopus stolonifer* en frutos.

## 1.10 Objetivos

### Objetivo General

Evaluar la actividad biocontroladora de la microbiota bacteriana asociada al cultivo de la zarzamora (*Rubus fruticosus*) contra el hongo fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

### Objetivos específicos

- 1) Aislar, identificar y evaluar la patogenicidad de cepas pertenecientes al género *Rhizopus* asociados a plantas y frutos de zarzamora.
- 2) Aislar, identificar y determinar la actividad antagónica *in vitro* de cepas bacterianas asociadas al cultivo de zarzamora versus los aislados patogénicos del género *Rhizopus*.
- 3) Evaluar la eficacia de los antagonistas bacterianos para reducir la incidencia de la enfermedad en los frutos de zarzamora en condiciones postcosecha.



## Capítulo II. Materiales y Métodos

### 2. Materiales y Métodos

El trabajo experimental fue desarrollado en dos dependencias del Instituto Politécnico Nacional (IPN), CIIDIR-IPN Unidad Michoacán en el laboratorio de fitopatología, y en CeProBi-IPN Morelos en el laboratorio de fitopatología. Se contó con la colaboración del C. Emanuel Santillán, productor de zarzamora de exportación quién aportó las muestras de material biológico.

#### 2.1 Toma de muestras

Las plantas de zarzamora de las cuales se obtuvo la microbiota nativa asociada se recolectaron en rancho 'Los Molinos', en la localidad de Atapan ubicada geográficamente a 1580 msnm a una longitud de 102°25'26" y una latitud de 19°39'06", perteneciente al municipio de Los Reyes en el estado de Michoacán (INEGI, 2005). La parcela se encontraba dividida por sectores de forma rectangular a los cuales se les numeró del 1 al 6, las muestras de las plantas fueron tomadas de los sectores 3 y 5 seleccionando una planta de cada uno de los vértices del sector y una más del centro, debido a que el sector 6 era el único que presentaba fruto; fue de este de donde se tomaron las muestras de dicho material. Las plantas seleccionadas fueron tomadas desde la raíz, introduciendo en una bolsa de polietileno la raíz completa con una muestra del suelo que la rodeaba, en otra bolsa se colocaron las hojas. Posteriormente, se identificaron e introdujeron en una hielera para conservarlas, lo mismo se hizo para los frutos recolectados. Los frutos con calidad de exportación fueron tomadas directamente de la cosecha del día.



## 2.2 Obtención de la microbiota nativa asociada a la planta

En el laboratorio de suelos y fitopatología del CIIDIR-IPN Unidad Michoacán, se hicieron improntas de las muestras de hojas en medio papa-dextrosa-agar DIFCO (PDA). Los frutos se tomaron y rotaron sobre el mismo medio. Se separó el suelo pegado a las raíces y se llevó a cajas Petri con PDA por medio de improntas con la ayuda de una esponja estéril. Por otra parte, las raíces fueron lavadas con agua corriente y jabón, se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min, se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril (ADE) y se secaron. Con ayuda de un bisturí se separó la corteza y el centro fue cortado en hojuelas, de las cuales una parte fue colocada sobre medio PDA y las otras fueron trituradas con agua peptonada al 2%. Se tomaron 5 hojuelas colocándolas sobre medio PDA. Del líquido resultante de la trituración de hojuelas se tomaron 5 asadas las cuales fueron distribuidas sobre PDA. Se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener la aparición de colonias (Figura 2.1).

Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias que presentaban mayor producción de biomasa y las que presentaron mayores halos de separación de otras colonias; estas se transfirieron a cajas Petri con PDA, por caja se incluyeron hasta 9 colonias. Posteriormente, las colonias que presentaron morfología típica bacteriana se aislaron y purificaron en medio PDA mediante resiembras sucesivas y extensión por agotamiento.

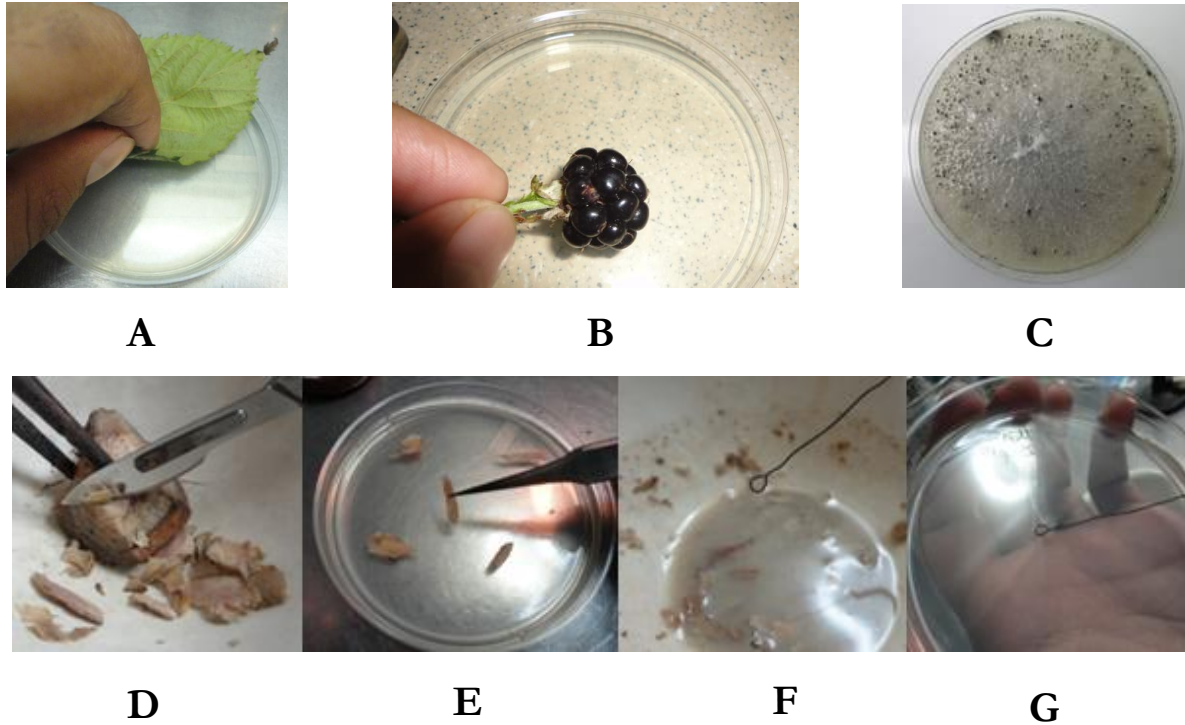
## 2.3 Obtención de aislados fúngicos del género *Rhizopus*

Para obtener aislados del género *Rhizopus* se establecieron cámaras húmedas de la siguiente forma: en el interior de bolsas plásticas se colocó papel absorbente humedecido con ADE, sobre los cuales se colocaron seis frutos y se cerraron de tal manera de que quedara aire dentro de éstas. Se





almacenaron a temperatura ambiente hasta observar la aparición de micelio característico al género (Figura 2.2).



**Figura 2.1.** Metodología de obtención de microbiota nativa asociada a la planta de zarzamora. A) Imprimas con hojas; B) Frutos rotados sobre medio PDA; C) Imprimas de suelo; D) Corte de raíces para obtener hojuelas; E) Hojuelas sobre PDA; F) Hojuelas trituradas con agua peptonada; G) Asada esparcida sobre PDA.



**Figura 2.2.** Cámaras húmedas para desarrollo de *Rhizopus stolonifer*.



Posteriormente, del micelio característico desarrollado sobre los frutos, se tomó una muestra y se colocó sobre medio PDA. Por otro lado, también se tomó micelio con morfología característica al género de las cajas Petri con improntas de hojas, frutos, suelo, con hojuelas de raíz y extracto de raíz y se pasó al medio de cultivo nuevo para cultivar al microorganismo.

## **2.4 Identificación microscópica de cepas fúngicas del género *Rhizopus***

Para la observación al microscopio de las cepas para su identificación, el hongo fitopatógeno se cultivó en cámaras húmedas sobre cubos de medio PDA. Para ello, se gelificó una placa de PDA de un centímetro de grosor, el cual fue cortado en cubos de 1cm de largo por 1 cm de ancho, los cubos se colocaron por pares sobre una caja Petri con una capa de PDA de 3 mm, posteriormente se tocó con una punta estéril el micelio esporulado de las cepas fúngicas supuestas a pertenecer al género *Rhizopus* y se pinchó el cubo en la parte superior y en los cuatro laterales. Se colocó un cubre objetos estéril sobre el cubo y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta obtener cuerpos fructíferos esporulados. El cubre objetos se tomó con una pinza estéril y se colocó sobre un porta objetos con una gota de azul de tripano para ser observado al microscopio. La observación tuvo como objetivo identificar las cepas por medio de las estructuras características del género y determinar la especie a la que pertenecían cada una según las claves descritas por Shipper en 1984.

## **2.5 Identificación de los antagonistas**

La identificación de los aislados bacterianos fue realizada con ayuda de la Doctora Graciela Castro del Departamento de Microbiología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN)



en el laboratorio de Bacteriología, en donde los cultivos bacterianos fueron sometieron a pruebas bioquímicas con el sistema de identificación BBL CRYSTAL™ Identification System Rapid Gram-Positive ID Kit, distribuido por BD (Becton, Dickinson y Compañía).

## **2.6 Purificación de las cepas fúngicas de *Rhizopus***

Al obtener los aislados fúngicos en placas Petri con PDA, se aplicaron dos métodos de purificación para asegurar el obtener colonias puras. Primeramente se hizo un cultivo de punta de hifa; en donde se tocó el micelio esporulado de los hongos y se inoculó una caja Petri con medio agar-agua (AA), posterior a esto, bajo el estereoscopio se eligió la punta de una hifa la cual se cortó con un bisturí para colocarse sobre medio PDA en donde se incubó a temperatura ambiente hasta obtener cuerpos fructíferos con esporas. En segunda instancia, se tomaron las cepas cultivadas bajo la técnica de punta de hifa y se vertieron 10 mL de ADE sobre el micelio removiendo con una varilla de dispersión para colectar las esporas, esta solución se filtró haciéndose pasar a través de una gasa estéril para retener el micelio, posteriormente se hicieron diluciones logarítmicas (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006) pasando 2  $\mu$ L de la dilución quinta, sexta y séptima a una caja Petri con medio AA esparciendo con una varilla de dispersión, se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener esporas individuales germinadas las cuales se cultivaron individualmente en PDA para obtener cultivos monospóricos.



## 2.7 Reproducción de los postulados de Koch y patogenicidad de las cepas

Se reprodujeron los postulados de Koch con la finalidad de comprobar la patogenicidad de las cepas del género *Rhizopus* aisladas del cultivo de zarzamora, para lo cual se tomó una caja Petri con micelio esporulado de cada una de las cepas fúngicas, a las cuales se añadieron 10 mL de ADE y se removieron las esporas con una varilla de dispersión, esta solución fue filtrada por medio de una gasa estéril, se calculó el número aproximado de esporas en la solución por medio de un hematocitómetro y aplicando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{NAE = \Sigma(C_1, C_2, C_3, C_4, C_5) * 2000}$$

En dónde:

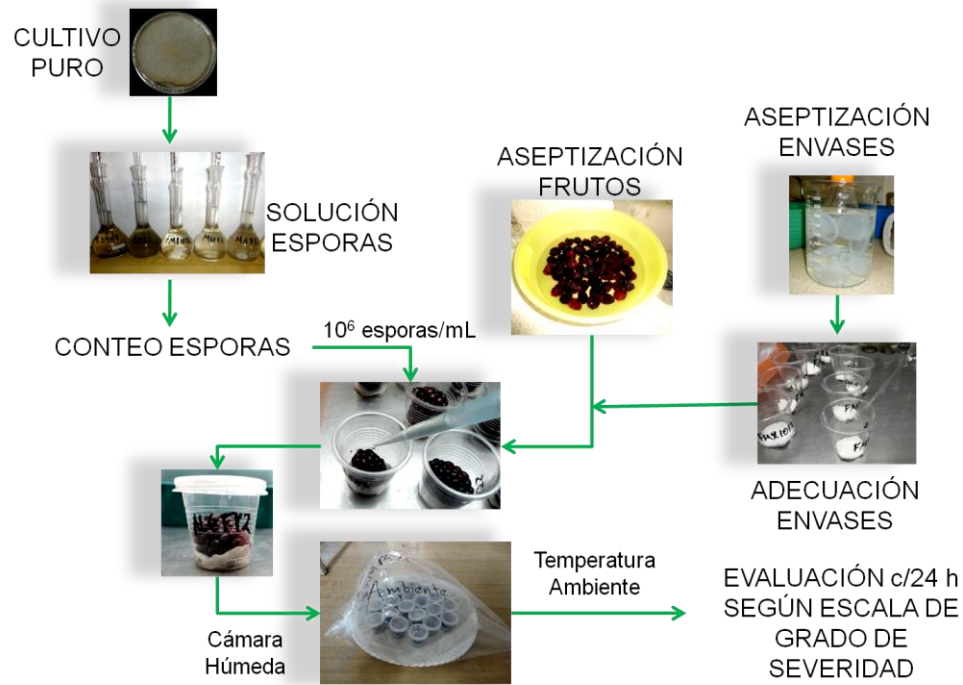
**NAE:** Número aproximado de esporas en la solución.

**C<sub>n</sub>:** El número de esporas presente en cierto campo del hematocitómetro.

Para determinar la patogenicidad de los aislados de *Rhizopus*, se acondicionaron cámaras húmedas individuales para los frutos, las cuales constaban de un envase plástico aséptico (sumergido en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min, enjuagando repetidas veces con ADE) el cual contenía dentro papel secante estéril humedecido con ADE. Los frutos fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min y enjuagados repetidas veces con ADE. Posteriormente se secaron con papel secante estéril, y se colocaron individualmente dentro de un contenedor. Posteriormente, se inocularon con 10<sup>6</sup> esporas/mL (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2009), los contenedores se posicionaron sobre una charola de cartón con papel absorbente humedecido con ADE, la cual se introdujo en una bolsa



plástica simulando una cámara húmeda y se dejaron en incubación a temperatura ambiente (Figura 2.3).








**Figura 2.3.** Procedimiento para la reproducción de los postulados de Koch.

La evaluación de la patogenicidad y severidad de daño causada por las cepas se llevó a cabo mediante el uso y diseño de una escala de severidad (Tabla 2.1) que permite cuantificar por medio de un porcentaje el daño causado por las cepas al fruto de zarzamora. Los frutos fueron evaluados cada 24 h, posteriores a la inoculación durante tres días. Para la evaluación se asignó un grado del 1 al 5 que corresponde a un porcentaje de daño generado por la cepa. La unidad experimental constó de 10 frutos, generándose dos réplicas. Los grados de daño en porcentaje fueron promediados y graficados para observar la evolución del desarrollo del hongo sobre el fruto, considerándose los grados del 2 al 3 como grados en donde el fruto solo sufre daño a la calidad visual, mientras que los grados 4 y 5 corresponden al desarrollo de la enfermedad conocida como podredumbre blanda provocada por *R. stolonifer*.



Al final del bioensayo el agente causal fue aislado nuevamente en PDA y observado al microscopio para completar los postulados de Koch.

**Tabla 2.1.** Escala de severidad diseñada para la evaluación de la patogenicidad de los aislados del género *Rhizopus*.

Escala de Severidad				
Grado de Severidad	Rango de daño		Descripción del daño	Control visual
1	0%	0%	Sin micelio ni exudados, no hay infección.	
2	1%	25%	Aparición de micelio, pocos exudados, no hay infección.	
3	26%	50%	Micelio definido, aparición de esporangios sin esporangiosporas, con escasos exudados, no hay infección.	
4	51%	75%	Fruto cubierto por micelio, esporangiosporas formadas, exudados abundantes, inicio de pudrición, infección presente.	
5	76%	100%	Fruto cubierto por micelio abundante, exudados abundantes, numerosas esporangiosporas, pudrición avanzada, infección en su máxima expresión.	

## 2.8 Diseño de técnica de inoculación y cantidad mínima de inóculo

Basándose en diversos reportes, la forma usual de inoculación de patógenos fúngicos es por medio de discos de micelio o soluciones de esporas colocados sobre heridas ocasionadas intencionalmente en los frutos (Govender et al., 2005; Kefialew y Ayalew, 2008; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2009; Arrevola *et*



al., 2010). Hernandez-Lauzardo *et al.*, (2009) obtienen infecciones viables a partir de discos de micelio de 5mm y de soluciones de esporas de  $1 \times 10^6$  esporas/mL en frutos de durazno, papaya y jitomate, por lo que se parte de estos datos para generar una técnica viable para inocular los frutos de zarzamora. Se usaron frutos maduros asépticos y heridos intencionalmente por medio de un bisturí estéril haciendo una incisión de 5 mm en la zona de abscisión, mismos a los que se les incorporó un disco de micelio de 5 mm sobre la herida o bien solución de esporas a diferentes concentraciones usándose  $10^6$ ,  $10^5$  y  $10^4$  esporas/mL. Los frutos se incubaron en cámaras húmedas, las cuales constaban de recipientes plásticos acondicionados con algodón humedecido con ADE y cubierto por un papel absorbente estéril sobre el cual se posicionaron los frutos infectados, se hicieron evaluaciones cada 24 h según la escala de severidad, al cabo de 72 h se determinó el índice de severidad. La unidad experimental constó de 10 frutos y se hicieron 2 réplicas.

## 2.9 Bioensayos preliminares

Las cepas identificadas bajo los criterios de las claves de Shipper (1984) como *Rhizopus stolonifer* e identificadas como fitopatógenos post cosecha por medio de la reproducción de los postulados de Koch, fueron sometidas a pruebas preliminares de antagonismo confrontándose contra los microorganismos nativos asociados al cultivo de la zarzamora. Dichas pruebas consistieron en colocar una asada de cada uno de los microorganismos en cada uno de los extremos de la caja Petri y colocando un disco de 5 mm de PDA con micelio de *R. Stolonifer* al centro de la caja para ser confrontado. Las placas se dejaron incubar durante 72 h y se midió el halo de inhibición de crecimiento del patógeno.



## 2.10 Bioensayo de antagonismo *in vitro*

En cuatro puntos equidistantes de una caja Petri, se inocularon las cepas bacterianas por medio de una asada, esparciéndolas en un área de 1 cm de ancho del borde hacia el centro y 2 cm de largo en cada uno de los puntos. El patógeno fue inoculado por medio de discos de 5 mm de diámetro de PDA con micelio esporulado de *R. stolonifer*, los controles positivos constaron únicamente de un disco de micelio de cada una de las cepas, mientras que a los controles negativos contaban con un disco de PDA estéril. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente y se evaluó el crecimiento del micelio cada 24 h tomando tres mediciones del diámetro con la ayuda de un vernier y promediando durante tres días. Con los datos obtenidos se calculó el índice antifúngico usando la formula descrita por Gou *et al.*, (2006):

$$\text{Índice Antifúngico} = 1 - (Da/Db) * 100$$

En donde:

**Da:** Diámetro de la zona de crecimiento micelial del bioensayo.

**Db:** Diámetro de la zona de crecimiento micelial del control.

El bioensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorio contando con tres repeticiones por unidad experimental, para asegurar la reproducibilidad del mismo fue repetido tres veces. Todos los bioensayos *in vitro* fueron realizados usando cajas Petri con diámetro de 860 mm, aunque para el acomodo de las fotografías mostradas difieran de tamaño.





## 2.11 Detección de sideróforos

Para determinar la presencia de sideróforos producidos por las bacterias antagonicas, se utilizó la solución indicadora de Cromo Azurol-S (CAS) descrita por Schwyn y Neilands en 1987 disuelta en medio casaminoácido (MCA). Para la solución indicadora se preparó primeramente una solución de  $\text{FeCl}_3$ , la cual constó de 27 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  disueltos en  $100 \text{ mL}^{-1}$  de agua destilada, posteriormente en  $40 \text{ mL}^{-1}$  de agua destilada se disolvieron 72.9 mg de Bromuro Hexadeciltrimetilamino (HDTMA), manteniéndose en agitación se incluyeron  $10 \text{ mL}^{-1}$  de la solución de  $\text{FeCl}_3$  y 60.5 mg de Cromo Azurol-S, se añadieron  $50 \text{ mL}^{-1}$  de agua destilada lentamente para completar  $100 \text{ mL}^{-1}$ . Para un litro de medio se usaron 5 gr de ácido casaminico, 1 gr de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.55 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 15 g de agar bacteriológico disueltos en 1 L de agua destilada. Tanto el medio como la solución indicadora se esterilizaron a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  a 15 lb de presión durante 15 min. Ambos se dejaron enfriar hasta  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , sin perder esterilidad, se retiraron  $100 \text{ mL}^{-1}$  del MCA y se añadieron los  $100 \text{ mL}^{-1}$  del CAS, el medió fue agitado hasta obtener un color oscuro uniforme y fueron vertidos  $20 \text{ mL}^{-1}$  de medio en cajas Petri de 860 mm, dejándose solidificar hasta obtener una coloración azul brillante. Las cepas bacterianas fueron inoculadas por medio de una asada haciendo un círculo en el centro y se dejaron incubar durante 72 h a temperatura ambiente. Los halos de cambio de color fueron medidos cada 24 h.

## 2.12 Antagonismo en presencia de iones Fe (III) para reducir producción de sideróforos

Las pruebas de antagonismo fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones que las descritas en el punto 2.10, sin embargo, se hizo una modificación en el medio de cultivo, añadiéndose 100 mg de  $\text{FeCl}_3$  (Rachid y Ahmed, 2005) por litro de PDA, generando así condiciones con alta



disponibilidad de hierro. El bioensayo se evaluó durante 72 h, al final de las cuales se hicieron tres mediciones de los diámetros de micelio por caja Petri los cuales fueron promediados, posteriormente se aplicó la fórmula de índice antifúngico descrita en el punto 2.10. La unidad experimental constó de 3 repeticiones con tres replicas cada una.

### **2.13 Bioensayo de antagonismo *in situ***

El antagonismo *in situ* se llevó a cabo tanto con células viables como con extracto libre de células. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas en 100 mL de medio líquido infusión papa-dextrosa (PDI), el cual se inoculó con 3 asadas de bacterias, dejando incubar 24 h, a temperatura ambiente. El extracto libre de células se obtuvo por centrifugación a 10 mil rpm durante 2 min de una suspensión bacteriana para retirar las células, colocando el sobrenadante en vasos de precipitados estériles. La suspensión bacteriana también se colocó en recipientes estériles para su aplicación. Los frutos fueron asepticados en hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min y enjuagados repetidas veces con ADE, se hizo una incisión de 5 mm de ancho en la zona de abscisión con un bisturí estéril, un tratamiento consistió en sumergir los frutos en el extracto libre de células y otro el cultivo bacteriano. Ya tratadas, las zarzamoras se colocaron en cámaras húmedas diseñadas con envases plásticos tipo clamshell acondicionados con algodón y papel secante estéril, ambos humedecidos por medio de aspersiones de ADE. Se colocaron 10 frutos por cámara húmeda y se inocularon con 50  $\mu\text{L}$  de solución de esporas de *R. stolonifer* a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL sobre la herida intencional. Los controles fueron sumergidos en ADE. En tanto que a los controles negativos se les añadieron 50  $\mu\text{L}$  de ADE, a los controles positivos se les inoculó con la solución de esporas. Todos los tratamientos fueron incubados a temperatura ambiente durante 72 h, evaluándose cada 24 h



según la escala de severidad, al final del bioensayo se aplicó la fórmula para calcular el índice de severidad, la cual fue descrita por Pérez *et al.* en 1995:

$$\text{Índice de Severidad} = \frac{\text{Xi (1)} + \text{Xi (2)} + \text{Xi (3)} + \text{Xi (4)} + \text{Xi (5)}}{\text{N}}$$

En donde:

**Xi:** Es el número de frutos observados por cada grado de daño.

**Números del 1 al 5:** Grado de daño según la escala de severidad diseñada en el punto 2.7

**N:** Número de frutos por unidad experimental.

## 2.14 Análisis estadístico

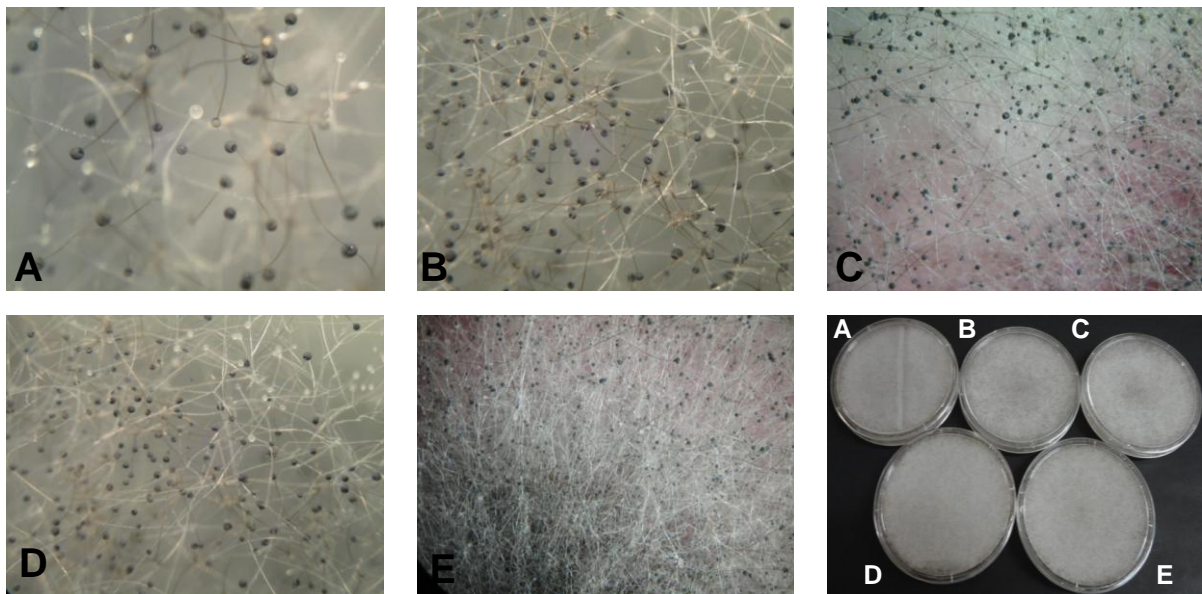
Todos los experimentos tuvieron un diseño experimental completamente al azar. Los bioensayos de antagonismo *in vitro* se realizaron considerando tres placas Petri como unidad experimental, mientras que en los experimentos *in situ* se consideraron 10 frutos por clamshell. Ambos experimentos se realizaron tres veces para comprobar la reproducibilidad de la investigación. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias obtenidas fueron analizadas por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey con una  $p < 0.05$ . Los análisis se llevaron a cabo con el programa SAS System for Windows versión 9.0.



## Capítulo III. Resultados

### 3.1 Caracterización morfológica e identificación de aislamientos de *Rhizopus spp*

Se obtuvieron cinco aislados con micelio característico del género fúngico *Rhizopus*, al purificarse se obtuvieron cultivos monospóricos los cuales presentaron micelio aéreo bien definido, algodonoso, en color blanco, a simple vista, con punteado que varió entre negro, gris y café atenuados, según los distintos aislados. Los diferentes aislados se etiquetaron con las primeras cinco letras del alfabeto. Al observarse bajo el microscopio estereoscópico mostraron similitud en la morfología micelial, sin embargo, el tamaño y color de los esporangios varía según el aislado (figura 3.1).



**Figura 3.1.** Aislados del género *Rhizopus* nativos del cultivo de zarzamora. Vistos en microscopio estereoscópico y a simple vista.



Partiendo de los grupos de especies y las características morfológicas descritas por Shipper (1984), se determinó la especie de cada uno de los aislados (tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Identificación y clasificación de aislados del género *Rhizopus* por medio de las estructuras características según Shipper (1984).

Aislado	Rizoides	Esporangios	Esporangiosporas	Estructura Completa	Especie	Nativo de:
A					<i>R. stolonifer</i>	Hojas
B					<i>R. oryzae</i>	Suelo
C					<i>R. stolonifer</i>	Fruto maduro con calidad de exportación.
D					<i>R. microsporus</i>	Fruto verde
E					<i>R. oryzae</i>	Fruto maduro

**Aislado A:** Aislada de hojas viejas de zarzamora. Mostró rizoides amplios con pequeñas ramificaciones secundarias, los esporangióforos emergen directo de los rizoides, en color café y son erectos con ligeras curvaturas en algunos casos, esporangios globosos, redondeados color negro con abundantes esporangiosporas, las cuales son pequeñas en color negro de forma redondeada irregular, aislamiento clasificado como *Rhizopus stolonifer*.

**Aislado B:** Aislada de suelo rizosférico, muestra rizoides amplios y sencillos, en algunos casos con escasas ramificaciones, esporangióforos largos erectos sin curvaturas, los cuales emergen en un segmento un tanto más arriba de donde se juntan los rizoides. Los esporangios son esféricos color negro con



abundantes esporangiosporas color negro, redondas de forma irregular, estas características corresponden a la especie *Rhizopus oryzae*.

**Aislado C:** Obtenida de frutos maduros con calidad de exportación, presenta los rizoides más complejos de todas los aislados, son amplios con abundantes ramificaciones, los esporangióforos fueron color café, erectos y ligeramente curvados en algunos casos, estos emergieron directamente de los rizoides, por otra parte los esporangios presentaron formas globosas, con esporangiosporas abundantes color negro, redondas de forma irregular, por lo tanto este aislado fue clasificado como *Rhizopus stolonifer*.

**Aislado D:** Nativa de fruto verde, con rizoides cortos sin ramificaciones, los esporangióforos emergen por un lado de los rizoides, son cortos con un esporangio grande y redondeado con esporangiosporas negras esféricas. Catalogado como *Rhizopus microsporus*.

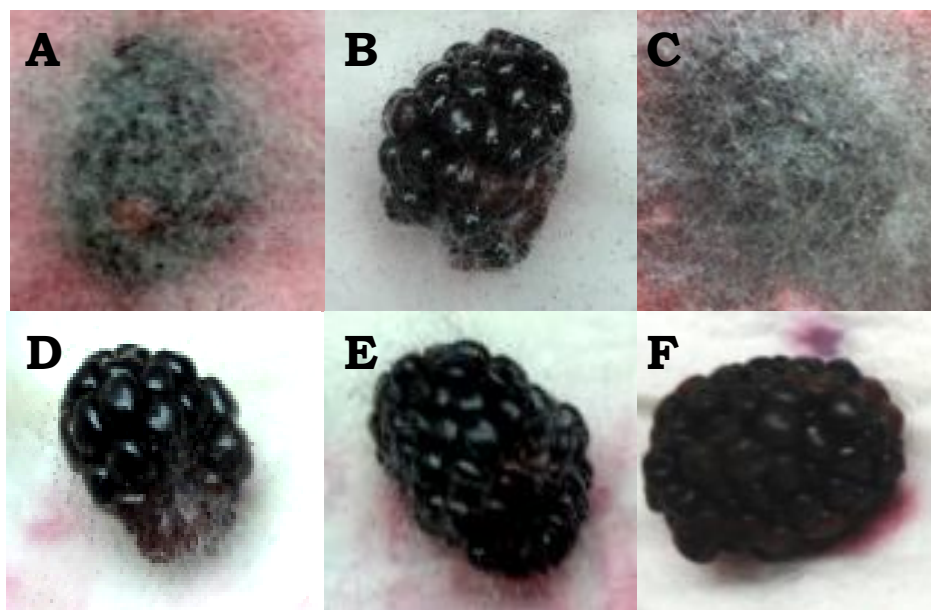
**Aislado E:** Aislada de frutos maduros, con rizoides simples pero amplios, esporangióforos erectos en algunos casos un poco encorvados, los rizoides emergen un tramo más arriba de donde se juntan los rizoides, presentan un esporangióforo redondeado color negro con abundantes esporangiosporas. Clasificada como *Rhizopus oryzae*.

### **3.2 Pruebas de patogenicidad y grado de severidad**

Solo las especies identificadas como *R. stolonifer* resultaron ser agentes causales de la enfermedad conocida como pudrición blanda, desarrollando micelio a las 24 h. A las 48 h cubrieron el fruto y generaron exudados, infectándolo y reblandeciéndolo, mientras que a las 72 h el fruto se encontraba degradado y con indicios de fermentación, al abrir los frutos se encontraron completamente degradados por dentro. Las especies



identificadas como *R. oryzae* y *R. microsporus*, solo generaron micelio sobre el fruto sin generar la enfermedad ni degradar los frutos, sin embargo, la generación de micelio afectó a la calidad visual de los mismos, por su parte, los frutos control, no presentaron daños de pudrición (figura 3.2).

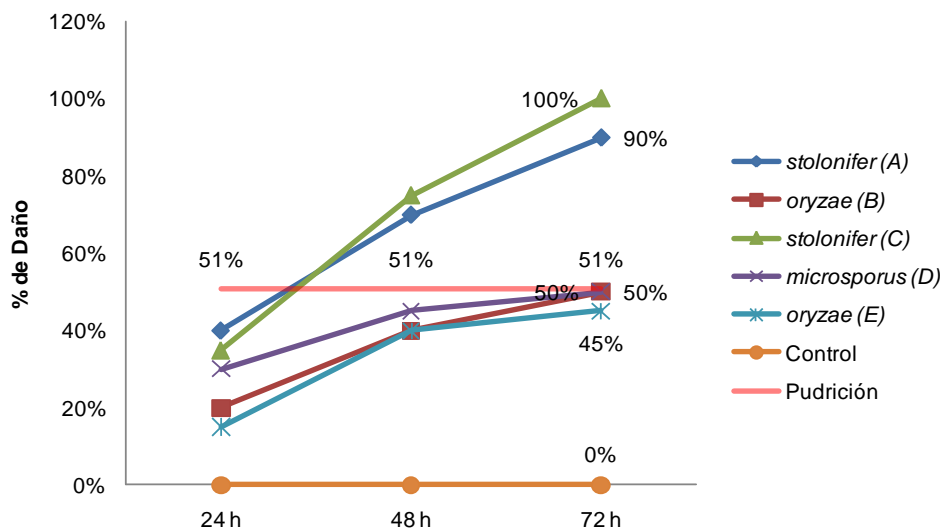


**Figura 3.2.** Frutos inoculados con diferentes aislados del género *Rhizopus* después de 72 h. A) *R. stolonifer* aislado de hojas; B) *R. oryzae* aislado de suelo; C) *R. stolonifer* aislado de fruto maduro con calidad de exportación; D) *R. microsporus* aislado de fruto verde; E) *R. oryzae* aislado de fruto maduro; F) Fruto Control.

A las 24 h se observó que el aislado A de *R. stolonifer* mostró un crecimiento micelial mayor a los demás aislados, mientras que el E y B (*R. oryzae*) mostraron menor producción de micelio. En la segunda medición hecha a las 48 h, el aislado C (*R. stolonifer*) alcanzó un rango de daño del 75%, siendo mayor que el ocasionado por el aislado A, ambos aislados mostraron indicios de desarrollo de pudrición blanda, los otros tres aislados presentaron micelio pobre y disperso sobre todo el fruto, aunque, no generaron síntomas de enfermedad y los frutos permanecieron turgentes. Al final del bioensayo, los



aislados C y A de *R. stolonifer* causaron daños del 100% y el 90% respectivamente mostrando micelio abundante y espeso, exudados con olor fétido y fermentación. Los aislados B de *R. oryzae* y D de *R. microsporus*, solo generaron micelio que cubrió hasta un 50% del fruto y el espesor del micelio no fue muy consistente, en tanto que el aislado E de *R. oryzae* solo cubrió un 45%, estos últimos tres aislados no generaron enfermedad, solo afectaron la calidad del fruto, los frutos control no desarrollaron micelio pero presentaron escasos exudados en comparación a los aislados infectivos (figura 3.2). El daño ocasionado en cada una de las etapas se midió según la escala de severidad, obteniéndose los porcentajes de daño ocasionado, se graficó la tendencia de cada uno de los aislados. Según la escala, a partir del 51% correspondiendo con la descripción de los signos y síntomas, se consideró que solo dos de los aislados desarrollaron la enfermedad, correspondiendo a los aislados A y C. (figura 3.3).



**Figura 3.3** Evolución cronológica del daño causado por los aislados del género *Rhizopus* en fruto de zarzamora (n=15, p<0.05).





A las 72 h, se elaboró una descripción completa de los síntomas y signos encontrados en los frutos inoculados, asignándoseles un grado de infectividad (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Descripción de síntomas y signos mostrados por los frutos sometidos a la inoculación por los aislados de *Rhizopus*, asignando un grado de infectividad.

Aislado	Especie	Infectividad*	Descripción
A	<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	Causal de podredumbre blanda, fruto cubierto en su totalidad con micelio característico, completamente degradado desintegramos al tacto, líquidos drenados con olor fétido, estructuras reproductivas bien formadas.
B	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	No infectivo, micelio aéreo característico cubriendo al fruto afectando calidad visual, frutos íntegros ligeramente suaves al tacto, sin líquidos drenados, estructuras reproductivas bien formadas.
C	<i>Rhizopus stolonifer</i>	++	Causal de podredumbre blanda, fruto cubierto en su totalidad con micelio característico, completamente degradado desintegramos al tacto, indicio de fermentación y producción de gases, líquidos drenados en abundancia con olor fuertemente fétido, estructuras reproductivas bien formadas saliendo del envase.
D	<i>Rhizopus microsporus</i>	-	No infectivo, micelio aéreo característico cubriendo al fruto afectando calidad visual, frutos íntegros suaves al tacto, sin líquidos drenados, estructuras reproductivas bien formadas.
E	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	No infectivo, micelio aéreo escaso cubriendo al fruto afectando calidad visual, frutos íntegros ligeramente suaves al tacto, sin líquidos drenados, estructuras reproductivas en formación.
<b>Control</b>		-	Frutos íntegros, algunas drupelas magulladas, ligeramente suaves, sabor agradable.

+++ Muy infectivo, + Infectivo, - No infectivo.

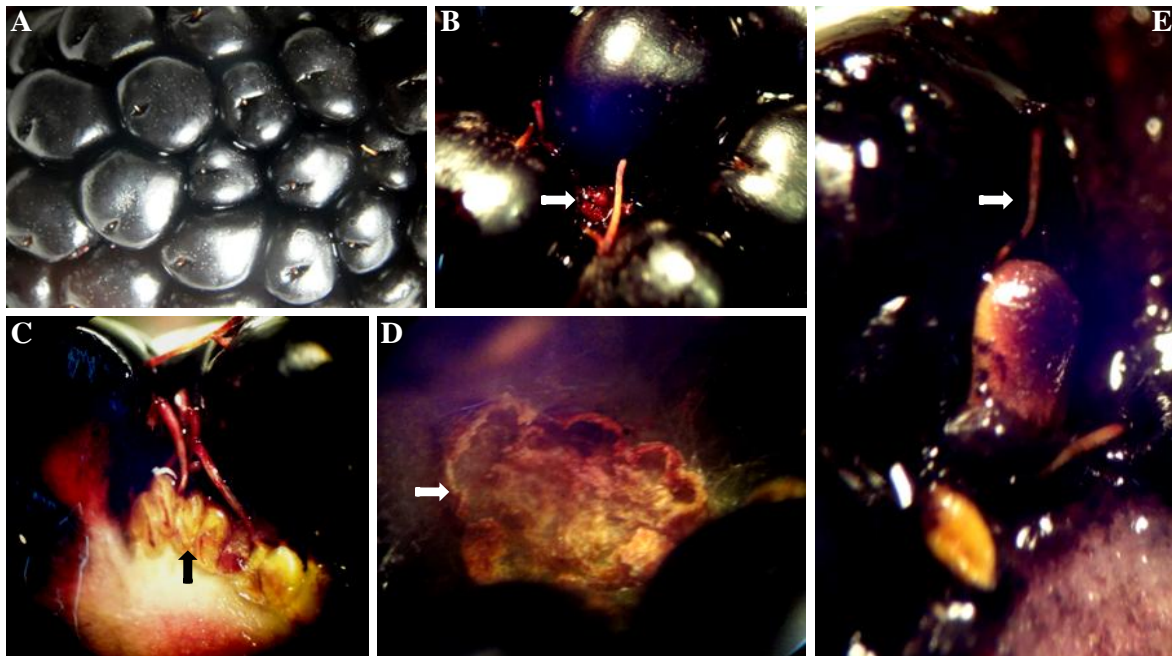
### 3.3 Morfología de la infección de *Rhizopus stolonifer* en fruto de zarzamora

#### 3.3.1 Características de Fruto Maduro de Zarzamora

El fruto de zarzamora es una polidrupa formada por drupelas individuales (figura 3.4A), por lo que al observar al microscopio estereoscópico, se reconocieron espacios entre las drupelas, los cuales no se encontraron



sellados completamente (figura 3.4B). Se observó que dichos espacios eran ocupados por pequeños carpelos que no fueron fecundados o bien, no se desarrollaron correctamente, estando en contacto directo con el centro de la fruta, el cual es suave y acuoso, estos espacios son propensos a resguardar esporas y humedad (figura 3.4C). En cuanto a la zona de abscisión, se observó delgada y con pequeñas vellosidades, propias del fruto, las cuales son reminiscencias de estambres, que propician el alojamiento de esporas (figura 3.4D). En un corte transversal se observó el interior de una drupela, encontrando que la semilla conserva la reminiscencia de lo que fuera un estilo, el cual atraviesa el interior de una drupa individual saliendo al exterior, por lo que cada drupela presenta hendiduras en el centro (figura 3.4E). Los frutos presentaron buen color, sólido y oscuro, y textura firme antes de haber sido inoculados.



**Figura 3.4.** Fruto de zarzamora con calidad de exportación visto al microscopio estereoscópico (10X). A) Fruto completo; B) Espacio entre drupelas (flecha); C) Carpelos no fecundados o atrofiados (flecha); D) Zona de abscisión (flecha); E) Reminiscencia de estilo a través de una drupela (flecha).



### **3.3.2 Germinación y formación de estructuras**

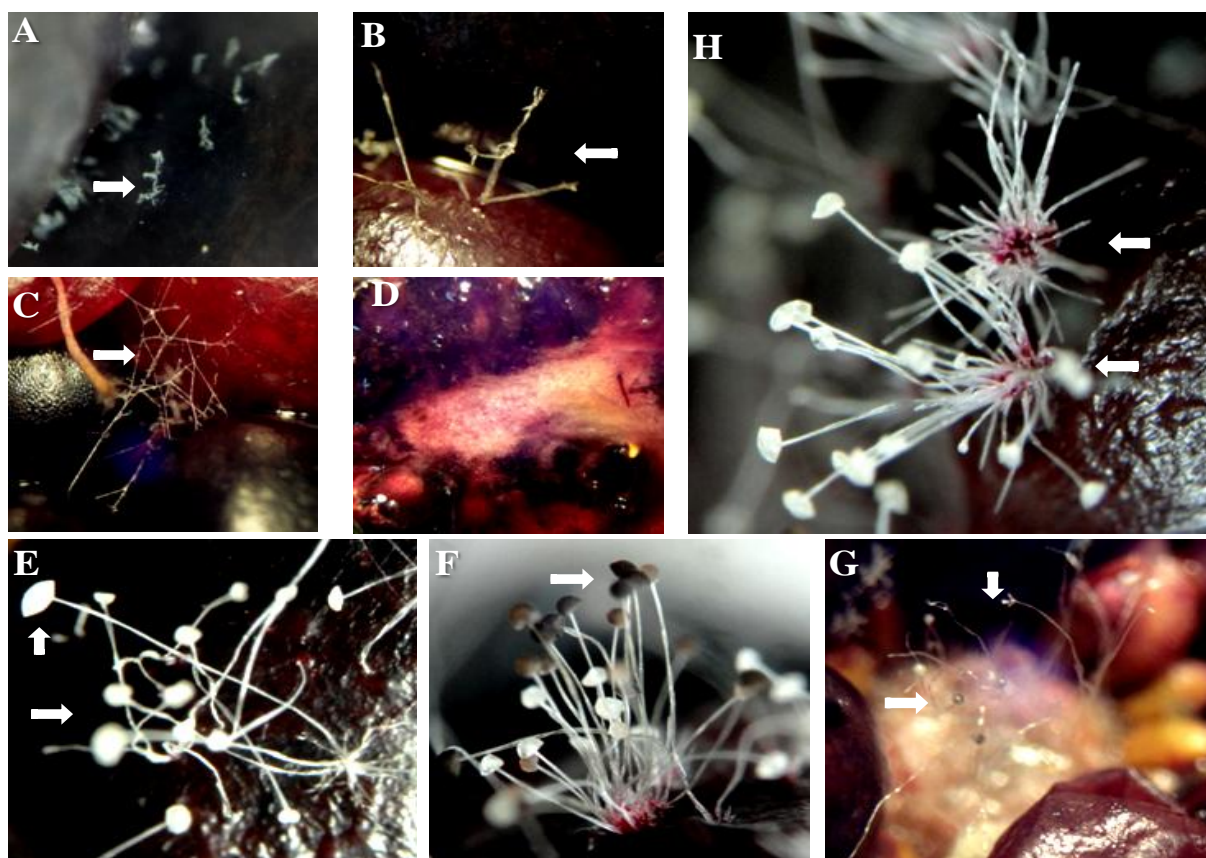
La mayor parte de esporas germinadas se encontró en la zona de abscisión y en los espacios entre las drupelas (figura 3.5 A y G). Las esporas germinadas dieron paso a la conformación de micelio aéreo y de los primeros cuerpos fructíferos que forman esporas capaces de seguir colonizando el fruto (figura 3.5 B, C y E). Los rizoides no fueron visibles, sin embargo, se visualizaron esporangióforos con pequeños esporangios en las puntas, los cuales se encontraron en desarrollo, estos no contenían esporas, aunque en algunos casos se tornaron oscuros (figura 3.5 F y H). En un corte transversal, el interior del fruto se mostró ligeramente oscurecido, no se distinguió con facilidad la integridad de las drupelas, además de ser acuoso (figura 3.5 D). En esta fase, no se desarrolló micelio abundante, sin embargo, las enzimas pectinolíticas comenzaron a actuar, por lo que hubo exudado de líquidos y algunas drupelas empezaron a perder turgencia y a cambiar de color, no se percibieron olores fétidos.

#### **3.1.1 Infección y dispersión**

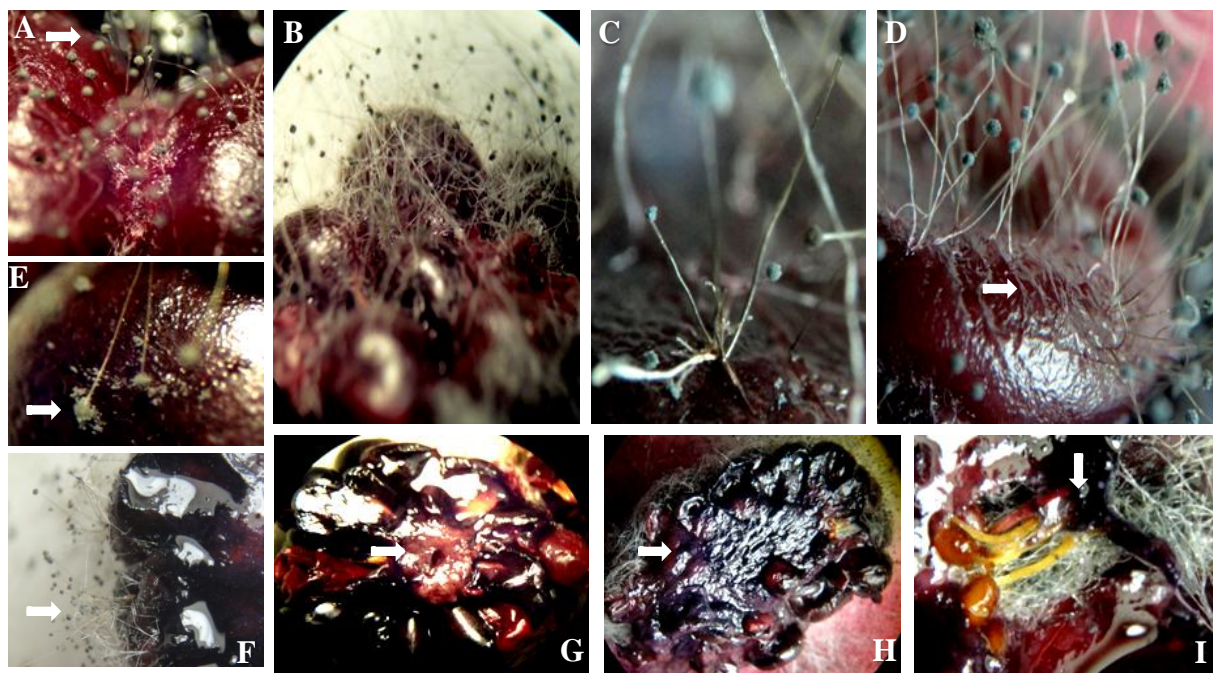
El micelio aéreo mostró un desarrollo considerable, cubriendo los frutos de un 40 a un 75%, las drupelas aún fueron visibles a través de éste (figura 3.6 A y B). Se observó el cambio de color en los esporangióforos de blanco a café claro al estar maduros y con esporangios en las puntas en color negro debido a las esporas maduras, los rizoides no fueron visibles debido a que se encontraron debajo de la cutícula del fruto, mostrando su amplitud como rugosidades en la misma (figura 3.6 C y D). Los esporangios presentaron una consistencia polvosa, debido a la gran cantidad de esporas maduras, las cuales comenzaron a diseminarse por la superficie de todo el fruto (figura 3.6 E). Al examinar un corte transversal se observó que el interior del fruto había perdido consistencia y tenía abundante liberación de líquidos, el micelio se



encontró únicamente en la parte externa del fruto, sin embargo, la infección fue notoria en el interior, en algunos frutos se observó ahuecamiento del centro por la generación de gases (figura 3.6 F y G). Por su parte el corte longitudinal mostró la maceración causada por el hongo en el fruto, por lo que resultó difícil el reconocimiento de las estructuras de las drupelas, el color del fruto fue más oscuro al igual que en el corte longitudinal (figura 3.6 H). La zona de abscisión y los espacios entre algunas drupelas mostró micelio en abundancia sin embargo no mostraron estructuras reproductivas (figura 3.6 I).



**Figura 3.5.** Infección por *Rhizopus stolonifer* a las 24 h (10X). A) Esporas en germinación entre dos drupelas (flecha); B) Formación de micelio (flecha); C) Micelio entre drupelas (flecha); D) Corte longitudinal en donde se muestra cambio de color en el fruto; E) Formación de estructuras reproductivas de forma ovalada (flechas); F) Estructuras reproductivas en maduración (flecha); G) Zona de abscisión con micelio y estructuras reproductivas (flecha); H) Estructuras reproductivas germinando en una drupela (flecha).



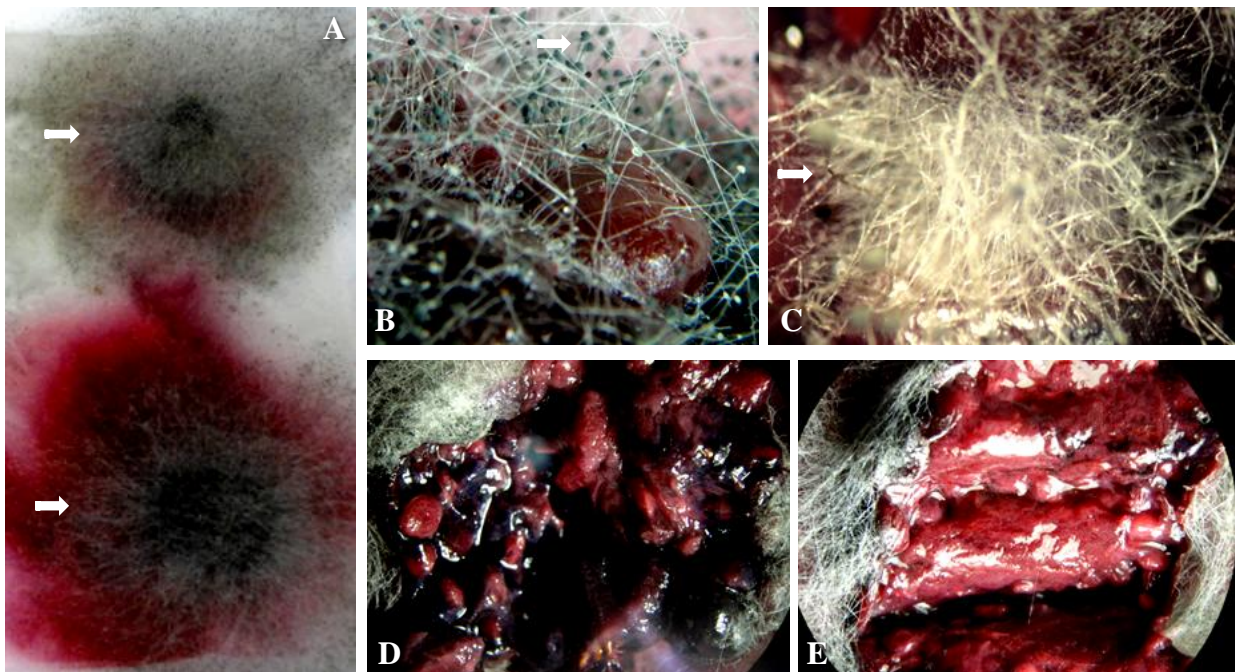
**Figura 3.6.** Fruto infectado por *R. stolonifer* a las 48 h (10X). A) Esporangios maduros entre dos drupelas (flecha); B) Micelio aéreo abundante cubriendo el fruto; C) Estructura característica de *R. stolonifer*; D) Estructuras maduras con rizoides bajo la cutícula de la drupela formando rugosidades (flecha); E) Esporangio diseminando esporangiosporas (flecha); F) Micelio aéreo en la superficie del fruto (flecha), no se encontró micelio dentro del fruto; G) Corte transversal con ahuecamiento en el centro debido a la posible producción de gases (flecha); H) Corte longitudinal mostrando el cambio de coloración en el centro del fruto (flecha); I) Zona de abscisión con carpelos atrofiados y micelio vegetativo (flecha).

### 3.1.2 Lisis y desintegración del fruto

Los frutos se mostraron cubiertos por micelio abundante y espeso, en algunos casos los exudados fueron moderados, mientras tanto en otros el fruto perdió hasta el 50% del volumen inicial debido a la lisis generada por las enzimas secretadas por el fitopatógeno. No fue posible ver los frutos a simple vista debido a que se encontraron cubiertos por micelio al 100% o casi a la totalidad (figura 3.7 A). La mayor parte de los esporangióforos y esporangios se encontraron maduros, estos últimos diseminando esporas (figura 3.7 B). Los espacios entre drupelas y la zona de abscisión se



encontraron llenos de micelio, mientras que en las partes exteriores se observaron las estructuras reproductivas (figura 3.7 C). Los frutos perdieron consistencia y al hacer cortes transversales, se observó que el interior no contenía micelio, sin embargo, la maceración fue avanzada por lo que los frutos se desintegraron fácilmente. No se reconocieron las estructuras del centro y/o de las drupelas, el color fue uniforme y presentaban un olor alcohólico y fétido. En los cortes longitudinales se presentaron las mismas características, el fruto se encontró destruido por completo debido a la digestión enzimática (figura 3.7 D y E). La enfermedad conocida como podredumbre blanda, ocasionada por el agente biológico *Rhizopus stolonifer*, fue completada en un ciclo de 72 h, en las cuales se desarrollo, diseminó y maceró el fruto.



**Figura 3.7.** Infección por *R. stolonifer* a las 72 h (10X). A) Frutos degradados cubiertos con micelio (flechas); B) Micelio con estructuras reproductivas maduras; C) Zona de abscisión; D) Corte transversal de fruto con pudrición blanda (flecha); E) Corte longitudinal de fruto con pudrición blanda.



### 3.1.1 Descripción de estructuras características encontradas durante la infección

Sobre todos los frutos se generó micelio aéreo característico, el cual fue algodonoso, con los esporangios visualizándose como puntos negros a simple vista, el espesor del micelio aumentó conforme avanzaron las etapas de la infección, haciendo cada vez menos visible el fruto (figura 3.8 A). Los esporangióforos, casi en su totalidad fueron erectos, rectos, solo en algunos casos presentaron leves curvaturas, a las 24 h presentaron color blanco, tornándose a café conforme avanzó la infección (figura 3.8 B). En la punta de cada esporangióforo se encontró un esporangio, al inicio de la infección estos esporangios fueron de forma ovalada y de color claro, tornándose a color negro, de forma esférica y adquiriendo una textura polvosa al madurar las esporas (figura 3.8 C). Las esporas fueron visibles en el esporangio hasta las 48 h, en donde ya maduras, se desprendieron del mismo colonizando otras drupelas, éstas se visualizaron como un polvo fino de color negro (figura 3.8 D). Los rizoides fueron difícilmente visibles, sin embargo, a las 48 h se mostraron rugosidades debajo de la cutícula de los drupelas en donde incidía un esporangióforo, algunos rizoides fueron observados fijos en la superficie de papel absorbente en donde se colocaron los frutos, a las 72 h se encontraron también en el micelio aéreo, en un corte transversal a las 48 h se visualizó un rizoide dentro de la pulpa en maceración de un drupela (figura 3.8 E). A lo largo de la infección se observaron estructuras completas en las cuales se hace la distinción fácilmente de que el aislado utilizado para dicha experimentación (aislado C) pertenece a la especie *Rhizopus stolonifer*, ya que mostraron esporangióforos erectos, rizoides complejos con afinidad a fijarse al fruto, esporangios redondos, globosos y esporas en color negro (figura 3.8 F).



**Figura 3.8.** Estructuras características encontradas en fruto de zarzamora al ser infectado por *R. stolonifer* (10X). A) Micelio aéreo característico del hongo; B) Esporangióforos erectos, algunos con ligeras curvaturas (flechas); C) Esporangios jóvenes, en maduración y maduros (flechas); D) Esporangiosporas (flecha); E) Rizoides complejos encontrados bajo la cutícula del fruto, sobre el papel absorbente de la cámara húmeda, en el micelio aéreo y dentro de una drupela (flechas); F) Estructura completa característica de *Rhizopus stolonifer*, observando esporangióforos unidos directamente al rizoide complejo, esporangios en las puntas de los esporangióforos y esporangiosporas cubriendo el esporangio.



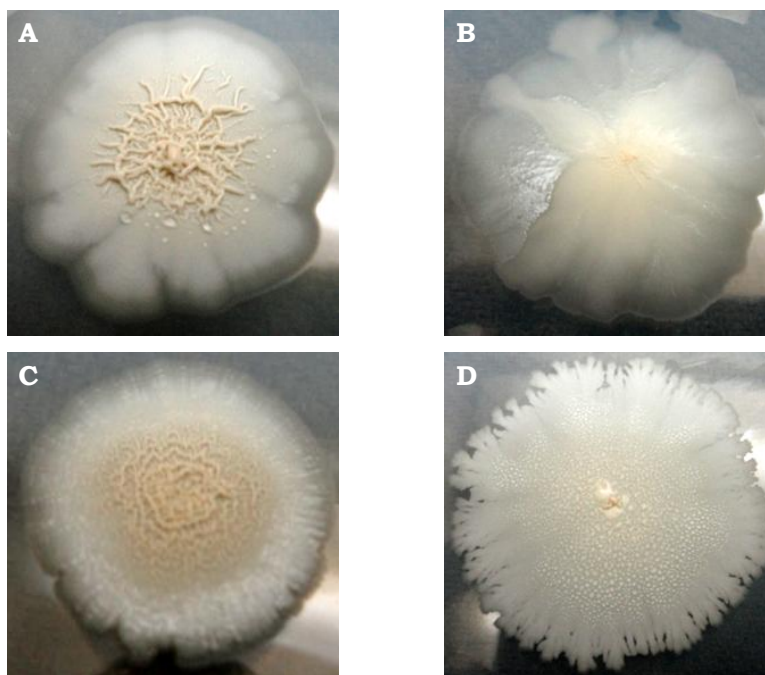


### 3.2 Identificación de agentes con poder antagónico

Se obtuvieron en total 113 aislados de microorganismos diferentes, de hojas (maduras y brotes), frutos (verdes, rojos y maduros), raíces (endofíticos) y de suelo (rizosféricos). Al confrontarse contra *R. stolonifer*, se obtuvieron 19 aislados con poder antagónico marcado, de las cuales se eligieron cuatro por mantener el antagonismo estable durante 5 días en tres réplicas. Estos aislados presentaron morfología colonial similar (figura 3.9) y fueron reconocidos como bacilos Gram positivos, se obtuvieron tres aislados del género *Bacillus* y uno del género *Leifsonia* (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Identificación de antagonistas por medio del kit BBL CRYSTAL™ para Gram positivas.

Sitio Aislamiento	Morfología Colonial	Coloración	Prueba				BBL Crystal
			Ryu (KOH)	Tincion Gram	Catalasa	BBL Crystal	
Hojas (Maduras)	Colonia mediana de forma irregular, con superficie umbilicada formando rugosidades y una protuberancia en el centro, con bordes ondulados.	Blanco cremoso.	+	+	Bacilos pequeños.	++	<i>Bacillus licheniformis</i>
Suelo Rizosferico	Colonia grande, de forma irregular y superficie plana presentando una pequeña protuberancia en el centro, con bordes ondulados.	Blanco cremoso.	+	+	Bacilos medianos.	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
Hojas (Maduras)	Colonia pequeña de forma irregular casi redondeada, de superficie umbilicada formando rugosidades en la mayor parte de la colonia, presentando bordes espiculados.	Centro amarillento, bordes blancos, opaca.	+	+	Bacilos medianos.	+	<i>Leifsonia aquatica</i>
Hojas (Brotes)	Colonia grande de forma irregular, de superficie plana con una protuberancia en el centro, de bordes lobulados.	Blanco opaco.	+	+	Bacilos grandes.	+++	<i>Bacillus subtilis</i>



**Figura 3.9.** Morfología de las colonias formadas por los agentes antagonistas en medio PDA a las 72 h de crecimiento. A) *Bacillus licheniformis* aislado de hojas maduras, con superficie umbilicada y bordes ondulados; B) *Bacillus subtilis* aislado de suelo rizosférico, con superficie plana y bordes ondulados; C) *Leifsonia aquatica* aislada de hojas maduras, de superficie umbilicada y bordes espiculados; D) *Bacillus subtilis* aislado de brotes de hojas, mostrando superficie plana y bordes lobulados.

### 3.3 Actividad antifúngica *in vitro*

En los bioensayos *in vitro* desarrollados sobre PDA (figuras 3.10 y 3.11), *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* de suelo fueron significativamente mejores controladores para el aislado A, con un índice antifúngico de 41.42% y 40.04% de inhibición respectivamente, los dos aislados mostraron estabilidad durante las 72 h del bioensayo (figura 3.10). En tanto que para el aislado C, *B. licheniformis*, *L. aquatica* y *B. subtilis* de suelo, presentaron un efecto controlador significativamente igual, pero mayor al aislado restante,

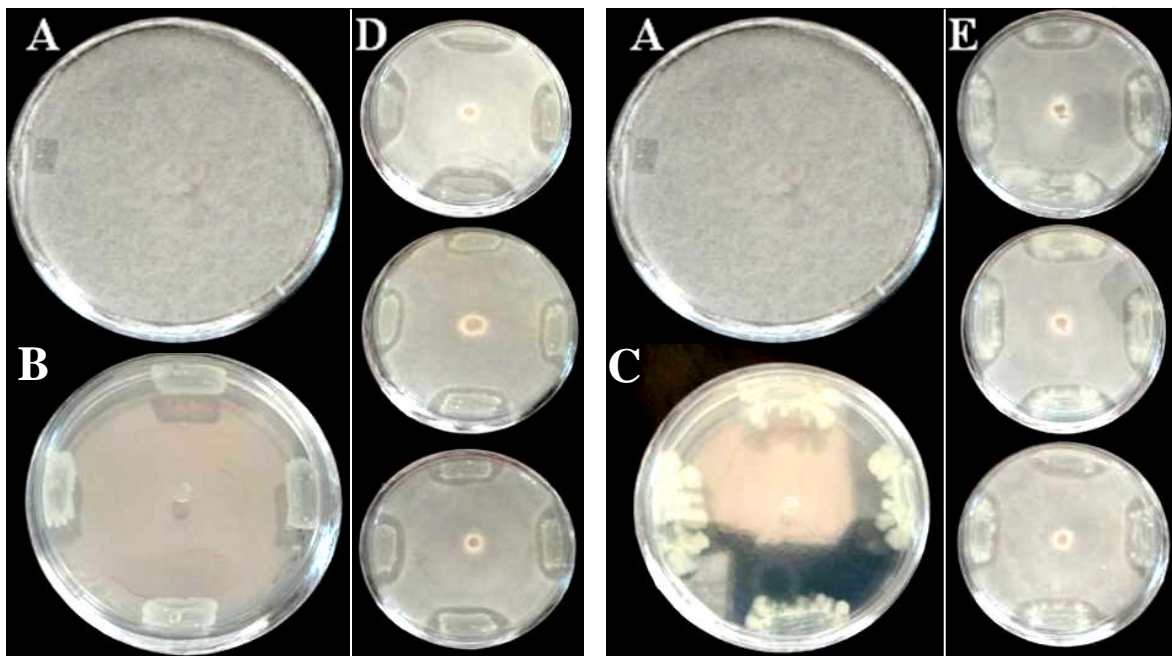


con un índice antifúngico de 42.78%, 41.87% y 41.46% respectivamente (tabla 3.4).

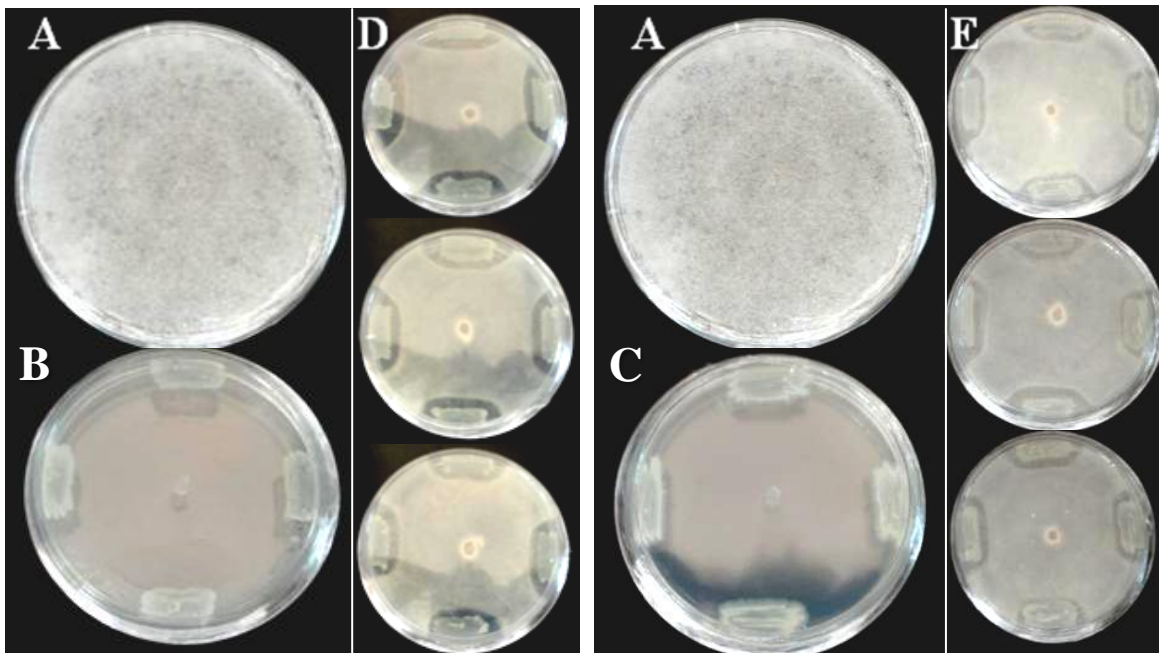
**Tabla 3.4.** Efecto inhibitorio *in vitro* de los agentes antagónicos asociados al cultivo de zarzamora versus los aislados de *R. stolonifer* nativos del agroecosistema.

Agente antagónico	Índice Antifúngico %	
	<i>R. stolonifer</i> A	<i>R. stolonifer</i> C
<i>Bacillus licheniformis</i>	41.42 B	42.78 B
<i>Bacillus subtilis</i> (S)	40.04 B	41.46 B
<i>Leifsonia aquatica</i>	36.64 C	41.87 B
<i>Bacillus subtilis</i> (H)	37.56 C	36.18 C
Control -	0.00 D	0.00 D
Control +	100 A	100 A

Las letras muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$ , según la prueba de diferenciación de medias de Tukey, con una  $n=9$ .



**Figura 3.10.** Antagonismo de *B. licheniformis* y *B. subtilis* aislado de suelo versus el aislado A de *R. stolonifer*, presentando un índice antifúngico de 41.42% y 40.04% respectivamente. A) Control positivo aislado A; B) Control negativo *B. licheniformis*; C) Control negativo *B. subtilis* aislado de suelo; D) Bioensayo de antagonismo *B. licheniformis* versus *R. stolonifer* A; E) Bioensayo de antagonismo *B. subtilis* de suelo y *R. stolonifer* A.



**Figura 3.11.** Antagonismo de *B. licheniformis* y *L. aquatica* versus aislado C de *R. stolonifer*, con inhibición de 42.78% y 41.87% respectivamente. A) Control positivo aislado C; B) Control negativo *B. licheniformis*; C) Control negativo *L. aquatica*; D) Bioensayo de antagonismo *B. licheniformis* versus *R. stolonifer* C; E) Bioensayo de antagonismo *L. aquatica* y *R. stolonifer* C.

### 3.4 Producción de Sideróforos

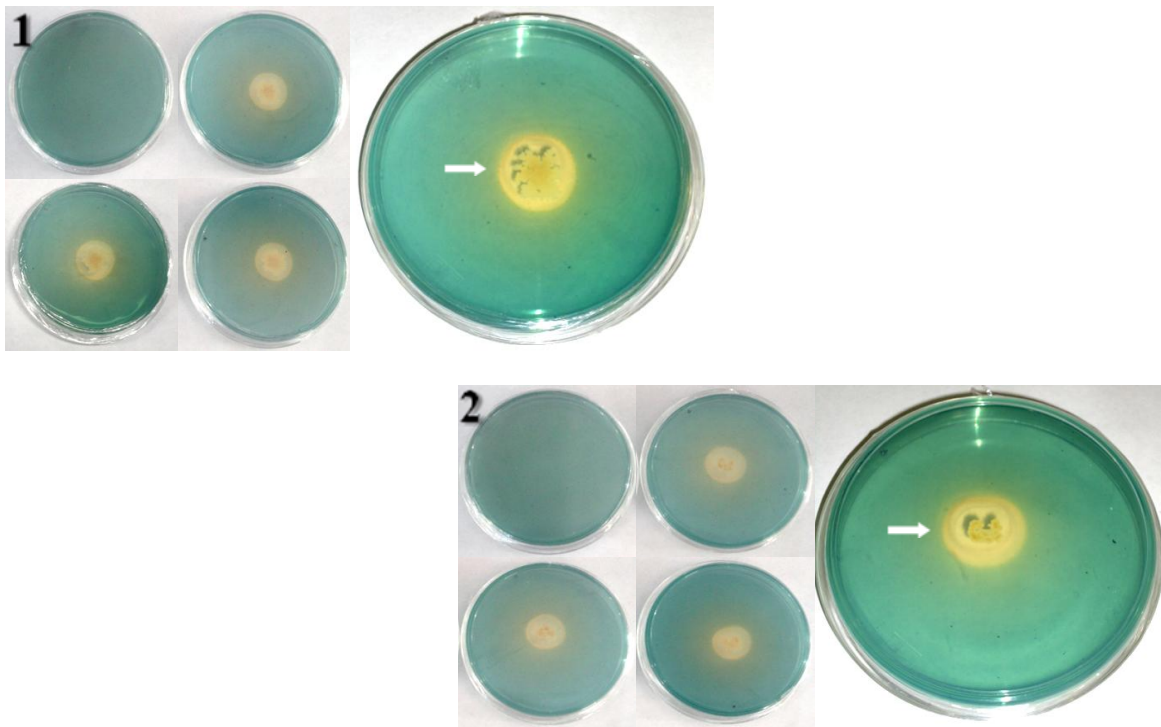
De los aislados bacterianos, *B. subtilis* de suelo fue significativamente el mejor productor de sideróforos, alcanzando un halo indicador de  $21.6 \pm 1$  mm en un periodo de 72 h, por su parte *B. subtilis* aislado de hojas (figura 3.12) y *B. licheniformis* presentaron similitudes significativas con halos de  $20.2 \pm 1$  mm y  $18.1 \pm 1$  mm en el mismo periodo de tiempo. De los fitopatógenos únicamente *R. stolonifer* C (figura 3.13) fue generador de sideróforos presentando una media significativamente mayor a la de las bacterias alcanzando un halo indicador de  $37.0 \pm 1$  mm (tabla 3.5).



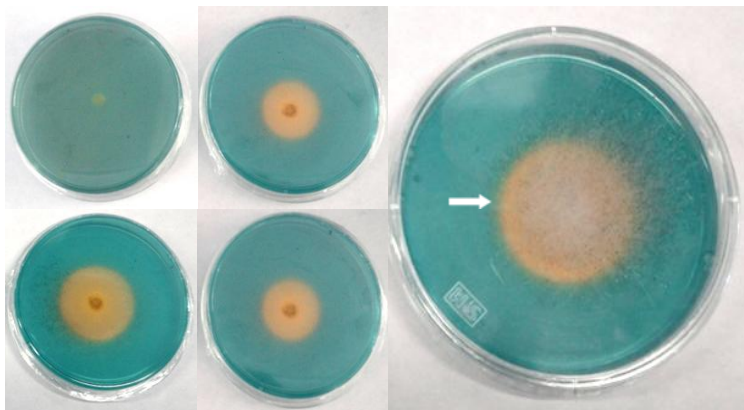
**Tabla 3.5.** Valoración de la producción de sideróforos en un rango de 72 h, en medio Casaminoácido con CAS como solución indicadora (MCAS).

Microorganismo	*Halo indicador mm
<i>Bacillus licheniformis</i>	18.1 B,C
<i>Bacillus subtilis</i> (S)	21.6 B
<i>Leifsonia aquatica</i>	17.8 C
<i>Bacillus subtilis</i> (H)	20.2 B,C
<i>Rhizopus stolonifer</i> A	0.0 D
<i>Rhizopus stolonifer</i> C	37.0 A
Control	0.0 D

Las letras muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$ , según la prueba de diferenciación de medias de Tukey, con una  $n=6$ . \*Datos sujetos a un  $CV = \pm 1$  mm



**Figura 3.12** Producción de sideróforos por aislados bacterianas en MCAS. 1) *B. subtilis* aislado de suelo ( $21.6 \pm 1$  mm); 2) *B. subtilis* aislado de hojas ( $20.2 \pm 1$  mm). En cada imagen se muestra una caja control, tres réplicas y una muestra representativa del bioensayo en donde se puede apreciar el halo amarillo indicador de la producción de sideróforos marcado con una flecha.



**Figura 3.13.** Producción de sideróforos por *R. stolonifer* aislado C en MCAS como solución indicadora. Se muestra una caja control, tres réplicas y una muestra representativa del bioensayo en donde se puede apreciar el halo amarillo indicador de la producción de sideróforos marcado con una flecha.

### 3.5 Actividad antifúngica en presencia de Hierro

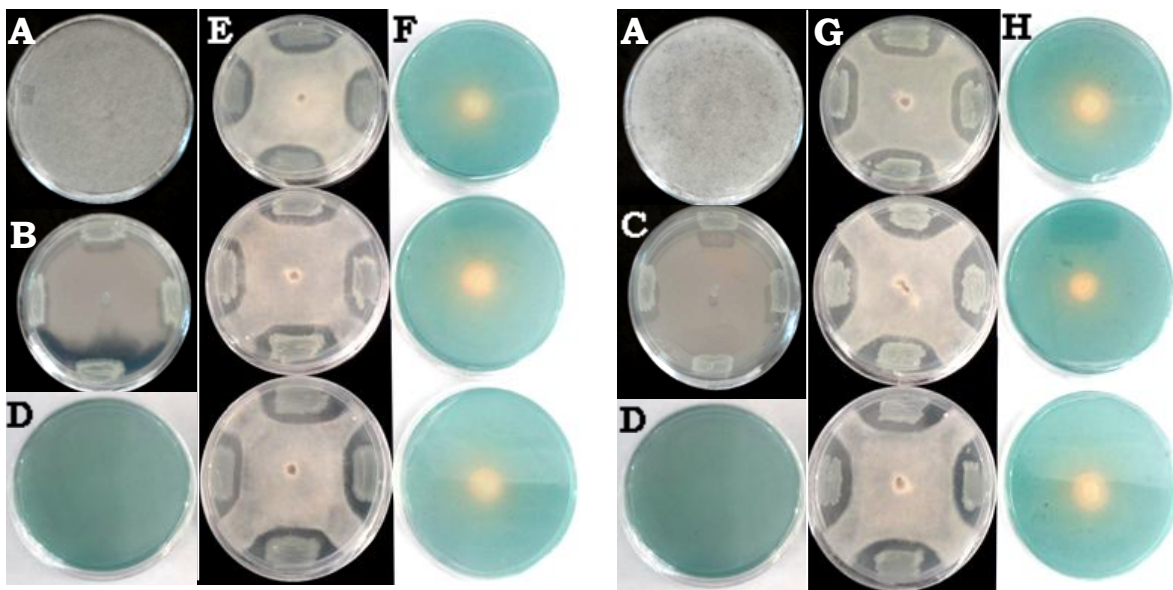
Los resultados del bioensayo llevado a cabo sobre PDA adicionado con  $\text{FeCl}_3$  (tabla 3.6) mostraron que *L. aquatica* presentó un control significativamente mayor al confrontarse con *R. stolonifer* aislado A ejerciendo un índice antifúngico de 48.64%, sin embargo fue significativamente la menor productora de sideróforos con un halo indicador de  $17.8 \pm 1$  mm, seguida por *B. licheniformis* el cual efectuó un control de 46.11% en el medio enriquecido siendo el segundo menor productor de sideróforos con un halo indicador de  $18.1 \pm 1$  mm (figura 3.14). Por otra parte, para *R. stolonifer* aislado C, *B. licheniformis* fue significativamente el mejor controlador produciendo un antagonismo de 48.32%, seguido por *L. aquatica*, la cual presentó un 47.03% de inhibición hacia dicho aislado del fitopatógeno (figura 3.15).



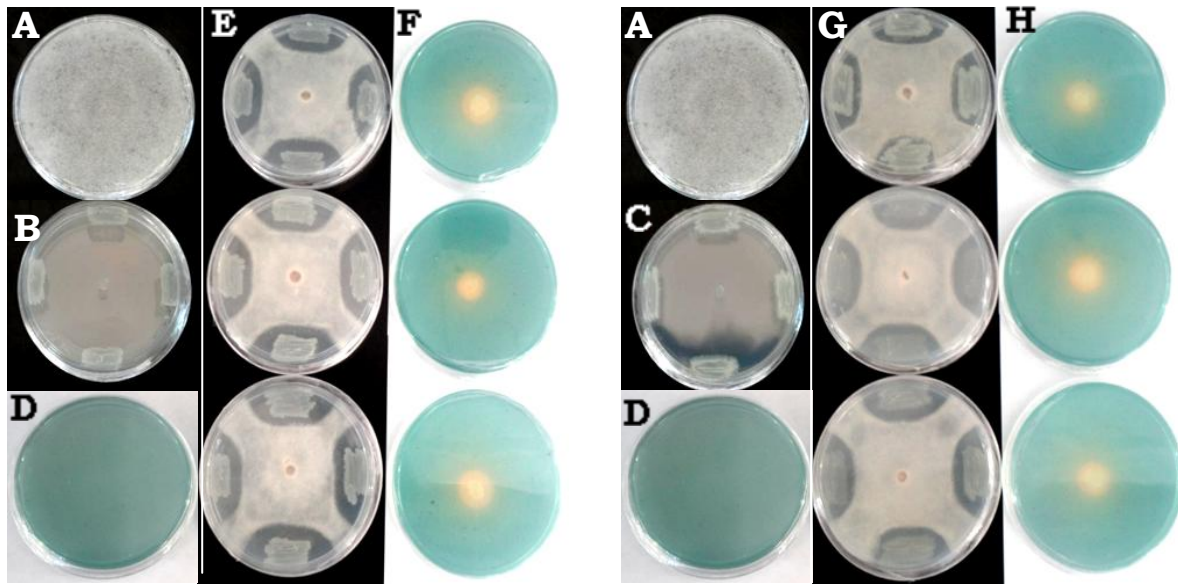
**Tabla 3.6.** Evaluación del antagonismo entre aislados bacterianos asociados al cultivo de zarzamora versus los aislados de *R. stolonifer* nativos del agroecosistema, en un medio enriquecido con FeCl<sub>3</sub>.

Agente antagónico	Índice Antifúngico %	
	<i>R. stolonifer</i> A	<i>R. stolonifer</i> C
<i>Bacillus licheniformis</i>	46.11 C	48.32 B
<i>Bacillus subtilis</i> (S)	42.71 D	43.09 D
<i>Leifsonia aquatica</i>	48.64 B	47.03 C
<i>Bacillus subtilis</i> (H)	38.76 E	41.26 E
Control -	0.00 F	0.00 F
Control +	100 A	100 A

Las letras muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$ , según la prueba de diferenciación de medias de Tukey, con una  $n=9$ .



**Figura 3.14.** Actividad antifúngica de *L. aquatica* y *B. licheniformis* hacia *R. stolonifer* aislado A, en presencia de hierro, presentando un 48.64% y 46.11% de índice antifúngico respectivamente. A) Control positivo aislado A; B) Control negativo *L. aquatica*; C) Control negativo *B. Licheniformis*; D) Control MCAS; E) Bioensayo de antagonismo entre *R. stolonifer* aislado A versus *L. aquatica*; F) Producción de sideróforos por *L. aquatica*; G) Bioensayo de antagonismo entre *R. stolonifer* aislado A versus *B. licheniformis*; H) Producción de sideróforos por *B. licheniformis*.



**Figura 3.15.** Actividad antifúngica de *B. licheniformis* (derecha) y *L. aquatica* (izquierda) hacia *R. stolonifer* aislado C, en presencia de hierro, con índices antifúngicos de 48.32% y 47.03% respectivamente. A) Control positivo aislado C; B) Control negativo *B. licheniformis*; C) Control negativo *L. aquatica*; D) Control MCAS; E) Bioensayo de antagonismo entre *R. stolonifer* aislado C versus *B. licheniformis*; F) Producción de sideróforos por *B. licheniformis*; G) Bioensayo de antagonismo entre *R. stolonifer* aislado C versus *L. aquatica*; H) Producción de sideróforos por *L. aquatica*.

### 3.6 Antagonismo *in situ* y grado de severidad

En las confrontaciones antagónicas *in situ*, los aislados A y C de *R. stolonifer* generaron daños con medias significativas de 4.25 y 4.90 grados de severidad sobre los frutos tomados como control positivo, según la escala de severidad descrita en la tabla 2.1, lo cual equivale para cada una a un 0% de inhibición. El control negativo, mantuvo los frutos en grado 1 ya que no se generaron daños de ningún tipo, sin embargo, los frutos no conservaron la turgencia original. Por su parte, los frutos tratados con suspensión celular de *B. subtilis* de suelo presentaron un índice de severidad con una media significativa de 2.30, inhibiendo al fitopatógeno en un 45.88%, los frutos



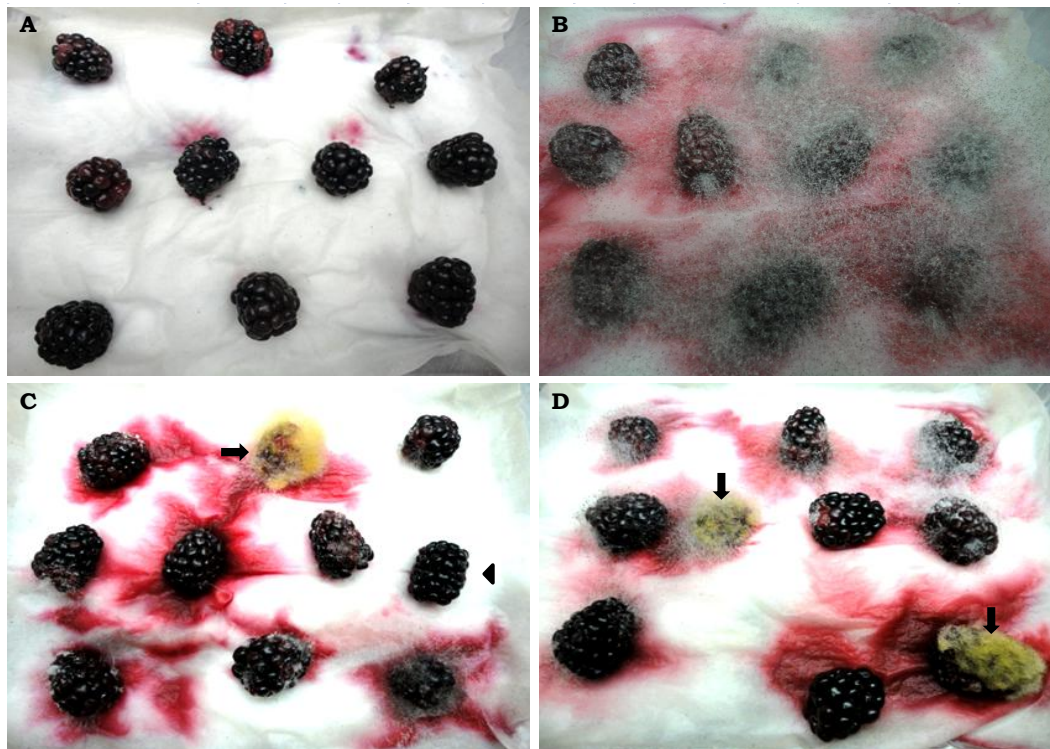


mostraron una incidencia de la enfermedad de un 15%, observándose frutos completamente sanos, sin desarrollar micelio y conservando la turgencia original del fruto, por otra parte, los frutos tratados con extracto libre de células de *L. aquatica* presentaron un índice de severidad con una media significativa de 2.56 en donde solo el 25% de los frutos desarrollaron enfermedad, evitando así un daño mayor causado por el aislado A de *R. stolonifer* el cual se vio inhibido en un 39.76% (figura 3.16). En cuanto al aislado C, se observó significativamente más inhibido por el extracto libre de células de *B. subtilis* de suelo (47.76%), incidiendo en enfermedad en un 22%, mostrando frutos sanos, turgentes y con un índice de severidad significativo de 2.56, a su vez *L. aquatica* versus el aislado C, mostró frutos con un índice de severidad de 2.85 y una inhibición de 41.84%, la enfermedad incidió en 32% en estos frutos (tabla 3.7). Algunos de los frutos bajo los tratamientos reconocidos como significativamente más eficaces desarrollaron indicios de la enfermedad, sin embargo, esta no fue tan severa como en los controles, la mayoría de los frutos se vieron afectados con micelio o con exudados aunque no se haya desarrollado la enfermedad (figura 3.17). Se observó también en los bioensayo tanto con aislado A como en el C de *R. stolonifer*, que en algunos frutos se produjo micelio diferente al encontrado en los aislados *in vitro* o en las pruebas de antagonismo, el cual presentó una estructura mayormente espesa al micelio normal y con coloración amarilla, este fue aislado en PDA para descartar la posibilidad de contaminación en los bioensayos. Este se incubó durante 72 h a temperatura ambiente mostrando un crecimiento normal correspondiente al del aislado inoculado previamente. En los frutos tratados con *B. subtilis* se produjo un fruto por bioensayo con estas características, mientras que los tratados con *L. aquatica* produjeron dos frutos por bioensayos presentando este tipo de micelio (figuras 3.16 y 3.17).

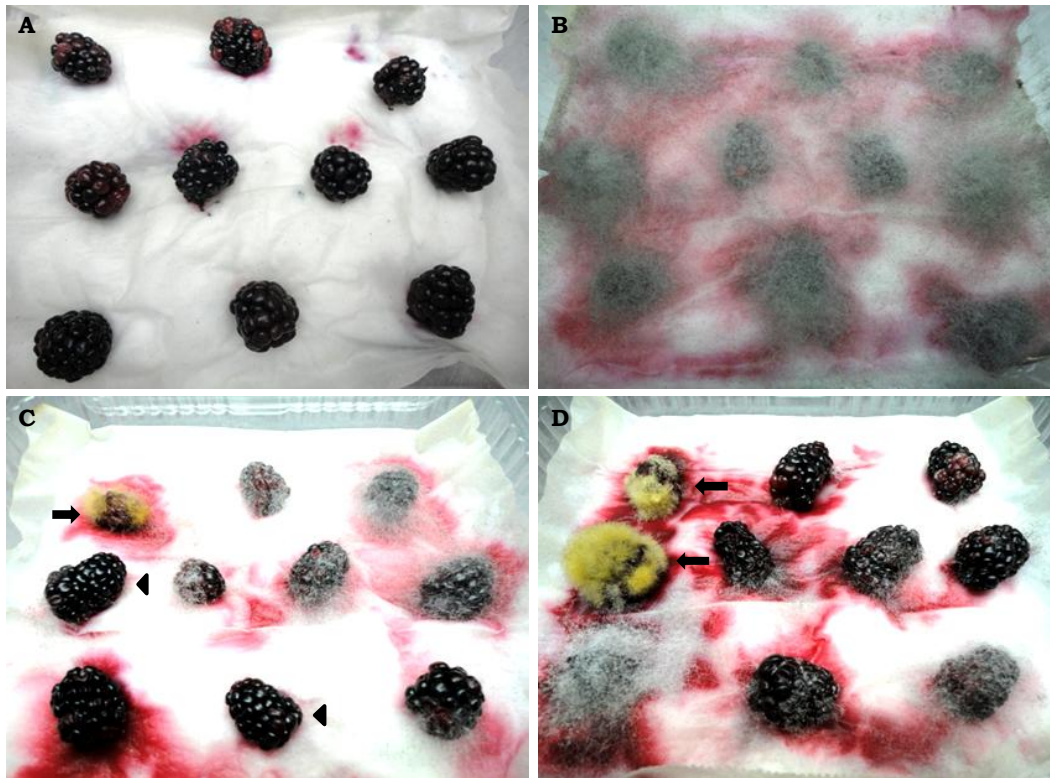
**Tabla 3.7.** Evaluación del antagonismo entre los agentes antagonísticos asociados al cultivo de zarzamora vs. los aislados de *R. stolonifer* nativos del agroecosistema, en fruto de zarzamora.

Trat.	Agente antagonístico	Aislados del Género <i>Rhizopus</i>					
		Indice de Severidad* <sup>a</sup>		% de Inhibición** <sup>a</sup>		% Incidencia de Enfermedad <sup>a</sup>	
		A	C	A	C	A	C
Extracto libre de células	<i>B. licheniformis</i>	3.45 D	3.65 E	18.82 D	25.51 E	58.67 F,G	73.67 F
	<i>B. subtilis</i> (S)	3.40 D,C	<b>2.56</b> B	20.00 D,C	<b>47.76</b> B	32.67 C,D	<b>22.00</b> B
	<i>L. aquatica</i>	<b>2.56</b> B	<b>2.85</b> B,C	<b>39.76</b> B	<b>41.84</b> B,C	<b>25.00</b> B,C	<b>32.00</b> B,C
	<i>B. subtilis</i> (H)	3.30 D,C	3.45 D,E	22.35 D,C	29.59 D,E	43.33 D,E	60.00 D,E,F
Suspensión celular	<i>B. licheniformis</i>	3.05 C	3.05 C,D	28.24 C	37.36 C,D	65.00 G	62.00 D,E,F
	<i>B. subtilis</i> (S)	<b>2.30</b> B	3.40 D,E	<b>45.88</b> B	30.61 D,E	<b>15.00</b> B	45.00 C,D
	<i>L. aquatica</i>	3.10 D,C	3.25 C,D,E	27.06 D,C	33.67 C,D,E	45.00 D,E,F	65.00 E,F
	<i>B. subtilis</i> (H)	3.30 D,C	3.25 C,D,E	22.35 D,C	33.67 C,D,E	51.67 E,F,G	48.67 C,D,E
	Control -	1.00 A	1.00 A	100.00 E	100.00 F	0.00 A	0.00 A
Control +	4.25 E	4.90 F	0.00 A	0.00 A	100.00 H	100.00 G	

\* Expresados en grados de severidad, según la escala presentada en la tabla 2.1. \*\*Calculados en referencia a los grados de severidad expresados en la tabla 2.1. Las letras muestran las diferencias significativas con una  $p < 0.05$ , según la prueba de diferenciación de medias de Tukey, con una  $n=30$ . a) Las medias con mayor impacto significativo en el bioensayo fueron marcadas con la letra 'A', por lo que en orden alfabético consecutivo el impacto disminuye.



**Figura 3.15.** Bioensayos de antagonismo *in situ* hacia *R. stolonifer* aislado A. A) Control negativo; B) Control positivo aislado A; C) Bioensayo antagonístico con frutos tratados con suspensión celular de *B. subtilis* aislado de suelo versus aislado A; D) Bioensayo con frutos tratados con extracto libre de células de *L. aquatica* versus aislado A. Las flechas muestran los frutos con producción de micelio diferente, las puntas de flecha muestran frutos completamente sanos que conservaron turgencia original después de las 72 h del bioensayo.



**Figura 3.16.** Bioensayos de antagonismo *in situ* hacia *R. stolonifer* aislado C. A) Control negativo; B) Control positivo aislado A; C) Bioensayo antagonístico con frutos tratados con extracto libre de células de *B. subtilis* aislado de suelo versus aislado C; D) Bioensayo con frutos tratados con extracto libre de células de *L. aquatica* versus aislado C. Las flechas muestran los frutos con producción de micelio diferente, las puntas de flecha muestran frutos completamente sanos que conservaron turgencia original después de las 72 h del bioensayo.



# Capítulo IV. Discusión y Conclusiones

## 4.1 Discusión

La mayoría de los trabajos de control biológico en etapas postcosecha han tomado como modelo experimental frutos de cutícula cerosa y gruesa, y que cuentan con una anatomía natural que los hace compactos, tal es el caso de los estudios realizados con mango (*Manguifera indica*), cítricos como naranja (*Citrus siensis*) y mandarina (*Citrus reticulata*), jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), papaya (*Carica papaya* L.) y durazno (*Prunus pérsica* Batsch.), entre otros (Govender et al., 2005; Kefialew y Ayalew, 2008; Hernández-Lauzardo et al., 2009; Arrevola et al., 2010). Estos frutos resultan de fácil manipulación debido a que su cutícula gruesa les confiere cierto grado de protección hacia el medio exterior y turgencia al tacto, permitiendo así, usar diferentes tipos de tratamientos como aplicación de ceras con compuestos activos, inmersión en baños de agua caliente o soluciones salinas (Obagwu y Korsten, 2003; Meng y Tiang, 2009). En el caso de la zarzamora, la aplicación de dichas estrategias resulta de mayor complejidad ya que se trata de una polidrupa (Berg, 2008) cuya morfología hace que sea frágil y susceptible al daño (Chávez-Franco et al., 2000; Strik et al., 2007). Debido a su anatomía natural, la zarzamora tiende a tener espacios entre las drupelas que la conforman, siendo propicios para almacenar humedad y esporas de microorganismos. Lo anterior permite suponer que dichos espacios ofrecen un microambiente óptimo para que *Rhizopus stolonifer* se desarrolle y sea posible conseguir infecciones exitosas. Los autores anteriormente mencionados como Govender et al. (2005), Kefialew y Ayalew (2008), Hernández-Lauzardo et al. (2009) y Arrevola et al. (2010), reportan



haber hecho incisiones en los frutos de entre 3 a 5 mm de profundidad y/o longitud para generar infecciones exitosas en los bioensayos. Sin embargo, en el bioensayo para determinar la patogenicidad de los aislados del género *Rhizopus*, se corroboró que el fitopatógeno puede colonizar e infectar los frutos exitosamente sin haber hecho heridas previas, debiéndose posiblemente a la anatomía natural del fruto o bien a que la maquinaria enzimática de éste resulte efectiva para degradar la superficie de las drupelas, la cutícula de los espacios entre estas o de la zona de abscisión.

En el presente trabajo se demuestra la efectividad de los aislados del agroecosistema de la zarzamora como agentes antagonistas hacia *R. stolonifer*, obteniendo datos similares a los de otros trabajos clásicos de control biológico. En este sentido, Arrebola *et al.* (2010), reportaron la eficiencia de aislados del género *Bacillus* para controlar a *Penicillium crustosum*, con un 33% de inhibición *in vitro* del patógeno a las 72 h de haber realizado el bioensayo. Cabe señalar que en este caso, el biocontrol fue resultado de la liberación de hasta 21 compuestos volátiles diferentes por parte de especies como *Bacillus subtilis*. Dicho porcentaje de inhibición fue menor al presentado por las cepas de *B. subtilis* aisladas de suelo y hojas en el presente trabajo, cuyos índices antifúngicos fueron de 41.46% y 37.56% respectivamente, y un aislado de *B. licheniformis* con un índice antifúngico de 41.78%. En contraste, Leelasuphakul *et al.* (2008), reportaron porcentajes de inhibición del micelio de *Penicillium digitatum* que fueron de 42% hasta 76% por producción de volátiles, y desde 84% hasta 99% al usar los extractos libres de células de *B. subtilis* después de 72 h de incubación, esto de manera *in vitro*. Se propone que el uso de los extractos permitió el control gracias a la producción de antibióticos. Cabe resaltar que a diferencia de este último estudio, en este trabajo se usaron células viables con madurez de 24 h para la confrontación *in vitro*, las cuales se inocularon al mismo tiempo que el patógeno en la placa Petri con PDA, y no extractos de 72 h, los cuales tal



vez pudieron favorecer la acumulación de metabolitos con potencial para el control del crecimiento del patógeno.

Por otra parte, la incidencia de la enfermedad se vio reducida en los bioensayos *in vivo*, obteniendo una reducción de 15% a 22% de incidencia de la enfermedad en los frutos al usar un cultivo celular de *B. subtilis* de suelo y el extracto crudo del mismo respectivamente. Diversos trabajos de control biológico respaldan el hecho de que *B. subtilis* es un agente antagónico asociado a las plantas, el cual ha podido ser aislado de raíces, suelo, de forma endofítica, en tallos, hojas y superficies de los frutos. Se ha reportado que dicha especie ha logrado reducir hasta un 25% de la enfermedad producida por *Penicillium crustosum* en frutos de naranja al usar los compuestos volátiles producidos para modificar atmósferas en empaques (Arrebola *et al.*, 2010), también en cítricos como la mandarina, se ha logrado reducir la incidencia de *P. digitatum* hasta 40% al aplicar esporas de *B. subtilis* a los frutos y 25% al sumergirlos en extractos crudos de la misma cepa, retrasando la enfermedad hasta los 7 y 9 días respectivamente (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

Por su parte, en el bioensayo *in situ*, se observa que la aplicación de extracto libre de células de *B. licheniformis* reduce hasta un 41% la incidencia en la enfermedad. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Govender *et al.* (2005), quienes usaron *B. licheniformis* para controlar infecciones por *Coletotrichum gleosporoides* y *Botryosphaeria* spp., y muestran un control en la incidencia de dichas enfermedades de 40% y 30% respectivamente al aplicar el microorganismo con agua caliente, se observa que los resultados obtenidos en el presente estudio son similares. Sin embargo, los mismos autores encontraron una disminución mucho mayor al aplicar el mismo microorganismo en conjunto con percholarz (N-popil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxiacético) etil] imidazol-1-carboxamida) y agua caliente (20% y 10% de incidencia respectivamente).



No solo las especies del género *Bacillus* reportan actividad antagonica hacia hongos fitopatógenos en los trabajos clásicos de control biológico postcosecha, se han empleado también especies fúngicas de los géneros *Trichoderma* y *Trichosporon*, bacterias promotoras de crecimiento vegetal de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia*, levaduras asociadas a las superficies de hojas y frutos como los géneros *Pichia* y *Candida*, incluso se han utilizado especies de géneros no asociados a los agroecosistemas como *Enterobacter cloacae* usada para controlar infecciones por *Rhizopus stolonifer* en duraznos (Wilson *et al.*, 1987; Compant *et al.*, 2005; Dorby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Babalola, 2010). En este sentido, cabe señalar que en el presente trabajo se encontró entre los mejores antagonistas a una bacteria no reportada como controlador biológico e identificada como *Leifsonia aquatica*, la cual generó resultados comparables a los reportados en los trabajos mencionados.

El control biológico postcosecha debe ser entendido como un proceso (Dorby *et al.*, 2009) en el cual se ven inmiscuidos diversos factores entre los que figuran las condiciones del medio de almacenamiento como la temperatura, humedad relativa, las condiciones de madurez e integridad de los frutos, el tipo de empaque, sustancias usadas como ceras o gases para modificar la atmósfera y los microorganismos presentes, estos últimos pueden ser de diferente índole: 1) ya sean asociados, 2) antagonicos agregados, 3) fitopatógenos u 4) otros infiltrados de alguna manera al sistema. La sumatoria de dichos factores influenciará directamente sobre el triángulo interactivo fruto-antagonista-patógeno el cual llevará a cabo los procesos biológicos que favorecerán la preservación o decaimiento de los frutos. De tal manera, dichos procesos biológicos generan respuestas en cada uno de los vértices mencionados en este triángulo interactivo, en donde la primicia del control biológico es que la acción del antagonista en el fruto, aminore la acción deletérea del fitopatógeno en el sistema. Algunos de los trabajos donde se ejemplifican algunos de los mecanismos usados por los microorganismos



antagonistas se presentan a continuación: Zhang *et al.* (2010) reportaron que el modo de acción de *Aureobasidium pullulans* contra *Monillinia laxa*, *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum* en duraznos, manzanas (*Malus x domestica* Borkh.) y ciruelas (*Pururus domestica* L.) se basa en el uso de enzimas líticas como  $\beta$ 1-3 glucanasas (GLC) y quitinasas (CHI), pero sin fijación de las hifas de *A. pullulans* a las de ninguno de los fitopatógenos, por lo que argumenta se trata de competencia directa por espacio y nutrientes. Las enzimas GLC y CHI se encuentran estrechamente ligadas en el proceso de microparasitismo llevado a cabo por varios hongos de géneros como *Trichoderma* y *Aspergillus* (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008). De igual manera, se ha reportado que algunas especies del género *Bacillus* producen estas enzimas (Leelasphuakul *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha comprobado que *R. stolonifer* es un patógeno exitoso que evita el microparasitismo por parte de organismos conformados por células individuales como las de las levaduras *Pichia membranefaciens* y hongos como *Cryptococcus albidus* los cuales fueron efectivos controladores de los patógenos como *Monillinia frutícola* y *P. expansum* respectivamente (Chan y Tian, 2005).

El hecho de que *R. stolonifer* evita el microparasitismo descarta la posibilidad de que el mecanismo de biocontrol usado por los aislados del género *Bacillus* obtenidos en este trabajo hayan sido por esta vía, sin embargo, es bien conocido que las especies del género *Bacillus* son capaces de producir diferentes tipos de compuestos volátiles, entre los cuales se incluyen cetonas, ácidos orgánicos, alcoholes, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados, y ésteres (Arrebola *et al.*, 2010), como también lipopolipéptidos cíclicos anfífilos (surfactantes) con actividad antibiótica como la surfactina, iturina A y amicoumacina A (Pinchuk *et al.*, 2002; Govender *et al.*, 2005; Leelasphakul *et al.*, 2008). Por lo anterior, es posible que el mecanismo de acción usado por estas cepas pudiera ser la antibiosis, no obstante falta hacer bioensayos para verificarlo.





Además de producir enzimas, surfactantes y antibióticos, los microorganismos pueden inducir respuestas biológicas en los frutos, reportando casos exitosos como el de *Pseudomonas putida*, en donde se observó que el antagonista indujo resistencia en el fruto de papaya inhibiendo la producción de etileno, por lo que retardó la maduración y mantuvo la firmeza, incrementó la actividad de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO), siendo enzimas clave en la ruta de los fenilpropanoides el cual da paso a la síntesis de fenoles, fitoalexinas y ligninas asociados con la resistencia local, e incrementó la actividad de enzimas detoxificadoras como súper oxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD), las cuales actúan directamente sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) evitando la oxidación del sistema (Shi *et al.*, 2011). La inducción de resistencia como mecanismo de acción ha sido reportado como efectivo en el control de *Rhizopus nigricans* (sinónimo de *R. stolonifer* (Shipper, 1984)) por medio del uso de antagonistas como la levadura *Pichia guilliermondii*, la cual indujo resistencia en jitomate cherry (*Lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*) al incrementar la actividad de enzimas como PPO, POD, CAT, SOD, PAL, CHI y GLC en el fruto reduciendo significativamente la incidencia de la enfermedad hasta 24% (Zhao *et al.*, 2008). La maquinaria enzimática reportada en dichos trabajos es propia de los frutos, siendo activada por los microorganismos antagonistas, estas enzimas intervienen directamente en la recuperación de las heridas en los frutos, además de que algunas pueden lisar la pared celular de patógenos fúngicos.

Por otra parte, se ha observado en éstos trabajos que los antagonistas aplicados en heridas tienden a producir mayores cantidades de mucílago extracelular alrededor de las paredes celulares, el cual contiene elicitores químicos activos que sirven como cascadas de señalización teniendo como respuesta la activación del mecanismo de defensa del fruto. Se ha comprobado que otros elicitores pueden ser oligosacáridos que forman parte



de la pared celular del antagonista, moléculas secretadas para la captación de nutrientes como los sideróforos, o moléculas de otras índoles como antibióticos, surfactantes, flagelina o bien, moléculas que intervienen en el proceso conocido como *quorum sensing*, tales como las acil-homoserina-lactonas en gram negativas o pequeños oligopéptidos en gram positivas (Lyon, 2007; Champigny and Cameron, 2009; Sharma *et al.*, 2009). De acuerdo a lo mencionado, se puede argumentar que las bacterias usadas en el presente estudio fueron teñidas como Gram positivas, por lo que utilizan oligopéptidos para llevar a cabo las señalizaciones que les permiten iniciar procesos metabólicos secundarios para la producción de sustancias antibióticas o quelantes para su protección y nutrición, por lo que puede suponerse que estas tienen la capacidad de inducir resistencia por medio de la señalización generada a partir de que el fruto reconoce tales moléculas, sin embargo, falta hacer uso de técnicas de proteómica y/o biología molecular para afirmarlo.

Varios autores mencionan que los sideróforos han sido responsables de generar resistencia sistémica inducida en plantas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006), argumentando que los antagonistas al liberar sideróforos privan a las células de hierro, por lo que como respuesta se activa el ciclo de la metionina, el cual da paso a la producción de este aminoácido que es un productor de etileno y este a su vez se encuentra relacionado con la inducción de resistencia (De Vleeschauwer y Höfte, 2009). Dicha hipótesis no se encuentra bien corroborada, si bien, no se sabe si los sideróforos son capaces de inducir resistencia en frutos, estos están relacionados con la ineffectividad de las cepas de patógenos fúngicos ya que son usados para secuestrar el hierro al lisar las células. En el presente trabajo se observó que el aislado de *R. stolonifer* C, el cual mostró mayor patogenicidad de los 5 aislados obtenidos, fue el que produjo mayor cantidad de sideróforos, incluso en comparación con los aislados bacterianos. Tomando en cuenta lo antes mencionado, proponemos que aunque los aislados bacterianos con actividad



antagónica usados en este trabajo no produjeron sideróforos en cantidad suficiente para causar daño al fruto, estos pudieron ser reconocidos por el mismo como moléculas señal que generaran una respuesta para la inducción de resistencia.

Otra de las bacterias con efecto biocontrolador hacia *Rhizopus stolonifer* fue perteneciente al género *Leifsonia*. Aunque esté género no ha sido muy estudiado, se conoce que son bacterias que producen biopelículas para adherirse a superficies, las cuales se argumenta, podrían ser usadas para circular diferentes tipos de sustancias que ayudan a su supervivencia cumpliendo fines de alimentación y protección, mientras que no se ha investigado a cerca de su índole y sus propiedades (Rickard *et al.*, 2003), no obstante, se conoce que al asociarse a plantas, algunas especies son capaces de producir fitohormonas y 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (acdS), la cual es una enzima capaz de hidrolizar el ACC, mismo que es un intermediario del etileno en las plantas, por lo que disminuye sus efectos y promueve el crecimiento vegetal, de igual manera se ha comprobado que son capaces de generar resistencia sistémica inducida (ISR) (Mdhaiyan, *et al.*, 2010; Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2010).

Recapitulando lo antes mencionado, en los bioensayos de antagonismo *in vitro* sobre medio PDA, el control biológico por parte de los tres aislados del género *Bacillus* pudiera deberse a la producción de sustancias con actividad antibiótica, las cuales probablemente limitaron el crecimiento del fitopatógeno. Otro de los posibles mecanismos de control exhibido por las cepas antagonistas evaluadas en este trabajo pudiera ser la producción de compuestos volátiles los cuales no permitieron generar micelio aéreo sobre el espacio cercano a la bacteria. No puede asegurarse que *in vitro* hayan intervenido las enzimas líticas (GLC y CHI) producidas por las bacterias, ya que no hay contacto entre las células de las bacterias y las hifas del hongo, aunado al hecho de que no se observó micelio degradado. En cuanto a la



acción de los sideróforos, se puede argumentar que el medio PDA sobre el cual se llevaron a cabo los bioensayos, es un medio que suministra una fuente de carbono a los organismos pero pobre en minerales y otros micronutrientes por lo que consideramos que los sideróforos formaron parte de los mecanismos de acción en las confrontaciones hacia el aislado de *R. stolonifer* A. No obstante se observó que el aislado C, fue buen productor de sideróforos, lo cual supone que es una cepa con facilidad de adaptarse a los medios restringidos en nutrimentos teniendo la capacidad de obtenerlos y limitarlos para otros organismos, hecho que pudiera estar relacionado con la patogenicidad del aislado y con el suceso de que *B. subtilis* aislado de suelo muestre poca actividad antagónica *in vitro*, pero que sea el mejor controlador *in situ*.

En cuanto a los bioensayos *in vitro* llevados a cabo sobre medio PDA adicionado con  $\text{FeCl}_3$ , se supuso que el efecto fue inhibir la producción de sideróforos para observar el antagonismo sin la intervención de este factor, lo que resultó en un incremento significativo en el antagonismo por parte de de todos los aislados, observándose mayor aumento en los aislados de *B. licheniformis* y *L. aquatica*. Autores como Sharma *et al.* (2009) y Köhl *et al.* (2011), sustentan este comportamiento al comentar que diversos antagonistas suelen presentar mayor capacidad antagónica al encontrarse en presencia de minerales u otros nutrientes especiales, por lo que debe evaluarse si es factible el uso de dichos organismos a nivel comercial en una relación costo-beneficio. Al comparar los resultados de los bioensayos en medio PDA y en  $\text{PDA}+\text{FeCl}_3$ , podemos deducir que posiblemente el antagonismo incrementa debido a que al verse bloqueada la ruta metabólica de producción de sideróforos, las bacterias hayan canalizado dicha energía y precursores para la elaboración de otro tipo de compuestos. Por otra parte, para el aislado de *R. stolonifer* C, se vio bloqueada una de las estrategias por medio de las cuales restringía la captación de nutrimentos por parte de las



bacterias, por lo que se puede suponer que por esta razón se incrementó el antagonismo en este medio para este aislado.

En los bioensayos *in situ*, se observó que *B. subtilis* aislado de suelo muestra una mejor actividad que en los ensayos *in vitro*, lo anterior pudiera explicarse como resultado de una mejor interacción de esta cepa con el fruto, debido que según los reportes mencionados, ésta cuenta con mayores mecanismos de acción al estar en contacto con el fruto, entre los que figuran:

- a) Surfactantes con actividad antibiótica para restringir la actividad biológica del patógeno.
- b) Enzimas líticas (GLC y CHI) que diseminadas en el fruto se ven en contacto directo con el patógeno.
- c) Compuestos volátiles que afectan al micelio aéreo (hasta 21 tipos diferentes).
- d) Inducción de resistencia por medio de oligopéptidos, surfactantes y sideróforos en donde se incrementa la actividad de enzimas como PAL, PPO, SOD, CAT, GLC y CHI.
- e) Mayor producción de sideróforos en comparación a las otras especies que limitan la disponibilidad de hierro e intervienen en la inducción de resistencia.

En cuanto a *Leifsonia aquatica*, poco se sabe sobre la actividad metabólica de dicho microorganismo, sin embargo, se ha demostrado en el presente estudio su capacidad para ser un agente de control biológico. Por lo anteriormente discutido sobre dicho agente, se puede deducir que *in vitro*, la producción de sustancias implicadas en la formación de biopelículas pueden estar relacionadas con su mecanismo de acción, podemos suponer por una parte que está implicada la producción de compuestos volátiles ya que no permite la formación de micelio aéreo sobre esta, así como también la producción de compuestos con actividad antibiótica, en donde los segundos pueden ser difundidos en el medio al generar un margen después del cual no se observó



crecimiento de micelio del patógeno. En cuanto a los bioensayos *in situ*, se descarta la competencia por espacio ya que los mejores resultados fueron vistos en el ensayo con extractos de este aislado, por lo que es posible que el control sea dado por metabolitos liberados tales como antibióticos o algún otro vinculado con la inducción de resistencia en el fruto. De igual manera no se descarta la participación de fitohormonas y la enzima *acdS* que produce.

## 4.2 Conclusiones

El análisis de los datos obtenidos en el presente estudio y la discusión de los mismos hace posible concluir lo siguiente:

- 1) Fue posible el aislamiento de diversas especies nativas del género *Rhizopus* las cuales se encontraron asociadas a suelo, hojas y frutos de la planta de zarzamora.
- 2) Solo los aislados identificados como pertenecientes a la especie *Rhizopus stolonifer* fueron capaces de generar infecciones y provocar podredumbre blanda en los frutos con o sin haberse herido previamente.
- 3) Los aislados identificados como pertenecientes a las especies *R. oryzae* y *R. microsporus*, no fueron capaces de provocar podredumbre blanda, sin embargo, desarrollaron micelio sobre la superficie dañando la calidad visual del fruto.
- 4) Fue posible el aislamiento de los agentes biológicos con actividad antagónica asociados a las plantas del agroecosistema del cultivo comercial de zarzamora en Atapan Michoacán, los cuales fueron capaces de reducir el crecimiento del hongo *in vitro* y reducir la incidencia de la enfermedad en fruto.



- 5) El tratamiento con suspensión celular de *B. subtilis* fue mayormente efectivo hacia el aislado de *R. stolonifer* A, en tanto que para el aislado de *R. stolonifer* C, el tratamiento con extracto crudo fue el más efectivo.
- 6) *Leifsonia aquatica* presenta potencial para ser usada como agente de control biológico, sin embargo, se desconoce sobre su relación con los agroecosistemas, su inocuidad hacia el ser humano y sus mecanismos de acción.
- 7) Los frutos tratados con exudados de *Leifsonia aquatica* presentaron una mayor reducción en la incidencia de enfermedad en los bioensayos *in situ* en comparación con los tratados con suspensión celular del mismo.



## Capítulo V. Perspectivas

Resulta de gran importancia continuar con la búsqueda de agentes microbianos con potencial antagonico propios de los agroecosistemas, los cuales puedan brindar la posibilidad de controlar efectivamente las enfermedades de los cultivos tanto en etapas anteriores como en postcosecha.

De igual manera, es necesario el estudio profundo de los mecanismos de acción de dichos agentes antagonicos con la finalidad de identificar metabolitos secundarios de interés que podrían ser utilizados como fungicidas biodegradables naturales, así como la inocuidad de estos con relación a la salud humana.

Es conveniente la utilización de técnicas de proteómica y biología molecular para conocer las interacciones a nivel molecular entre fruto-patógeno, fruto-antagonista y antagonista-patógeno, las cuales permitan comprender mejor los procesos biológicos que surgen del sistema para así detallar los puntos clave por medio de los cuales se ejerce el control biológico hacia un patógeno o patógenos determinados, y poder desarrollar tecnologías que aplicadas a nivel comercial permitan un mayor acercamiento a la producción sustentable de productos hortofrutícolas al reemplazar poco a poco los fungicidas sintéticos que son usados hoy en día, reduciendo así los riesgos a la salud humana, al medio ambiente y posiblemente a un menor costo.





## Literatura citada

- Abdel-Mallek, A.; Hemida, S.K. y M.M. Bagy. 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathology*. 130:109-116pp.
- Adaskaveg, J.E.; Fröster, H., y N.F. Sommer. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. *In: Postharvest Technology of horticultural crops*. A. Kader Editor. 163-195pp.
- Agrios, G.N. 2002. Fitopatología. Segunda Edición Limusa. México, D.F. 809p.
- Ahmad, F.; Ahmad, I.; Aqil, F.; Saghir-Khan, M. y S. Hayat. 2008. Diversity and Potential of Nonsymbiotic Diazotrophic Bacteria in Promoting Plant Growth. *In: Plant-Bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahmad, I.; Pichtel, J. y S. Hayat Editores. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. 81-110pp.
- An, S.Y.; Xiao, T. y A. Yokota. 2009. *Leifsonia lichenia* sp. nov., isolated from lichen in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 55:339-343pp.
- Anderson, A.J.; Blee, K.A. y K.Y. Yang. 2006. Commercialization of Plant Systemic Defense Activation: Theory, Problems and Success. *In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Tuzun, S. y E. Bent, Editores. Springer. E.U.A. 386-414pp.
- Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 8:191-198pp.
- Arrevola, E.; Sivakumar, D. y L. Korsten. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*. 53:122-128pp.
- Azevedo, E.C.; Rios, E.M.; Fukushima, K. y G.M. Campos-Takaki. 1993. Bacitracin production of a new strain of *Bacillus subtilis*: Extraction, purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 42:1-7pp.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacterial of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32:1559-1570pp.
- Barkai-Golan, R.; Padova, R.; Ross, I.; Lapidot, M.; Davidson, H. y A. Copel. 1993. Combined hot water and radiation treatments to control decay of tomato fruits. *Scientia Horticulturae*. 56:101p.
- Barriuso, J.; Ramos-Solano, B.; Lucas, J.A.; Probanza-Lobo, A.; Garcia-Villaraco, A. y F.J. Gutiérrez-Mañero. 2008. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *In: Plant-Bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahmad, I.; Pichtel, J. y S. Hayat Editores. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. 1-18pp.



- Bautista-Baños, S.; Velázquez-del Valle M.; Hernández-Luzardo, A.N. y E. Ait Barka. 2008. The *Rhizopus stolonifer* tomato interaction. *Plant-Microbe Interactions*. 37/661(2):210-289pp.
- Bazza Zinab, E.; Farrag-Hala, A.; Fouly Mohie, E. y Y. Tablawy-Seham. 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production of fungi. *Radiation Physics and Chemistry*. 60:181-189pp.
- Beattie, G.A. 2006. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: *Plant-Associated Bacteria*, Gnanamanickam, S.S. Editor, Springer. Netherlands. 1-56pp.
- Benavides, H. y O. Segura. 2006. El Sector Frutícola Centroamericano. [www.iica.int](http://www.iica.int). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Junio de 2010.
- Berg, L. 2008. CHAPTER 9: Flowers, Fruits and Seeds. In: *Introductory Botany: Plants, People and the Environment (2nda Edición)*. Thomson-Brooks/Cole Editores. 174-197pp. E.U.A.
- Cajuste B.J.; López. L.L.; Rodríguez A.J y M.I. Reyes. 2000. Caracterización físicoquímica de tres cultivares introducidos de zarzamora erecta (*Rubus* sp.). *Fruticultura*. Colegio de Postgraduados. U. A. Chapingo. México.
- Calderón-Zavala, G. 2006. Producción forzada de zarzamora en México. *III Simpósio nacional do morango, II Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul*. Luis Eduardo Correa Antunes y Maria do Carmo Bassols Raseira, Editores. 67-78pp.
- Champigny, M.J. y R.K. Cameron. 2009. Action at a Distance: Long-Distance signals in Induced Resistance. In: *Advances in Botanical Research: Plant innate immunity Volume 51*. L.C. Van-Loon Editor. 124-173pp.
- Chan, Z. y S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*. 36:215-223pp.
- Chávez-Franco, S.H.; Vázquez-García, E. y C. Saucedo-Veloz. 2000. Propiedades biomecánicas de frutos de zarzamora. *Agrociencia*. 34(003):329-335pp.
- Clark, J.R. 2006. Blackberry: World production and perspectives. *III Simpósio nacional do morango, II Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul*. Ed. Luis Eduardo Correa Antunes y Maria do Carmo Bassols Raseira. 11-16pp.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C. y E. Ait-Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9):4951-4959pp.
- Das, A.; Prasad, R.; Srivastava, A.; Houg-Giang, P.; Bhatnagar, K. y A. Varma. 2007. Fungal Siderophores: Structure, Functions and Regulation. In: *Soil Biology: Microbial Siderophores*. Varma, A. y S. Chincholkar Editores. 1-35pp.



- De la Rosa, M.C.; Mosso, M.A. y C. Ullán. 2002. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*. 5:375-402pp.
- De-Vleeschauwer, D. y M. Höfte. 2009. Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. In: *Advances in Botanical Research: Plant Innate Immunity*, Volumen 51. Van-Loon, L.C.; Kader, J.C. y M. Delseny, Editores. ELSEVIER. Países Bajos. 224-282pp.
- Diallo, S.; Crépin, A.; Barbey, C.; Orange, N.; Burini, J.F. y X. Latour. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 75:351-364pp.
- Dorby, S. 2006. Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae*. 709:45-51pp.
- Dorby, S.; Hofstein, R.; Wilson, C.L.; Wisniewski, M.; Fridlender, B.; Cohen, L.; Wiss, B.; Daus, A.; Timar, D. y E. Chalutz. 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent for postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control*. 3:47-52pp.
- Dorby, S.; Wisniewski, M.; Macarasin, D. y C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol researches: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52:137-145pp.
- Edris, A. y E. Farrag. 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic from the vapor phase. *Nahrung/Food*. 2:117-121pp.
- Egamberdiyeva, D. y K.R. Islam. 2008. Salt-Tolerant Rhizobacteria: Plant Growth Promoting Traits and Physiological Characterization Within Ecologically Stressed Environments. In: *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahmad, I.; Pichtel, J. y S. Hayat Editores. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. 257-252pp.
- Egounlety, M. y O.C. Aworh. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*. 56:249-254pp.
- El Ghaouth, A.; Arul, J.; Asselin, A. y N. Benhamou. 1992. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*. 96:769-779pp.
- Evtushenko, L.I.; Dorofeeva, L.V., Subbotin, S.A.; Cole, J.R. y J.M. Tiedje. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corinebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov.



- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:371-380pp.
- Ezziyyani, M.; Pérez-Sánchez, C.; Requena, M.E.; Sid-Ahmed, A. y M.E. Candela. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26:61-68pp.
- Förster, H.; Driever, G.; Thompson, D. y J. Adaskaveg. 2007. Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reducing-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*. 91:209-215pp.
- Gabler F.; Mansour, M.; Smilanick, J. y B. Mackey. 2004. Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 96:1345-1360pp.
- García-Rincon, J. 2008. Efecto del Quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopus stolonifer*. Tesis de Maestría, Centro de Desarrollo de Productos Bioticos, 61pp.
- Gou, Z.; Chen, R.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C. y P. Li. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*. 341:351-354pp.
- Govender, V.; Korsten, L. y D. Sivakumar. 2005. Semi-comercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology*. 38:57-65pp.
- Guerra-Sánchez, M.G.; Vega-Pérez, J.; Velázquez-del Valle, M.G. y A.N. Hernández-Lauzardo. 2008. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1-5pp.
- Gutiérrez-Galeano, D.F.; Valdés-Ramírez, M. y A. Méndez-Tenorio. 2010. Búsqueda *in-silico* del gen 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato Desaminasa (acdS) en genomas secuenciados de *Frankia* sp. Y diseño de oligonucleótidos para su detección y amplificación. XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Acapulco Guerrero, México, 2010.
- Hai-Liu, R. 2007. The potential health benefits of phytochemicals in berries for protecting against cancer and coronary heart disease. In: *Berry fruit, Value-Added Products for Health Promotion*. Yanyun, Z. Editor. 187-203pp.
- Halvorsen, B.L.; Carlsen, M.H.; Phillips, K.M.; Bøhn, S.K.; Holte, K.; Jacobs, D.R. y R. Blomhoff. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Chemical Nutrition*. 84:95-135 pp.
- Hernández-Lauzardo, A.N.; Bautista-Baños, S.; Velázquez-del Valle, M.G. y J.L Trejo-Espino. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:



- Fr.) Vuill., causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24:65-69pp.
- Hernández-Lauzardo, A.N.; Bautista-Baños, S.; Velázquez-del Valle, M.G.; Méndez-Montealvo, M.G.; Sánchez-Rivera, M.M. y L.A. Bello-Pérez. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*. 73:541-547pp.
- Hernández-Lauzardo, A.N.; Hernández-Martínez, M.; Velázquez-Del Valle, M.G.; Guerra-Sánchez, G. y G.E. Melo-Giorgana. 2007. Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:FR.) Vuill y *Mucor* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(002):109-113pp.
- Hernández-Lauzardo, A.N.; Velázquez-del Valle, M.G.; Vernanza-Castelán, L.; Melo-Giorgana, G.E. y M.G. Guerra-Sánchez. 2009. Effect of chitosan on three isolates of *Rhizopus stolonifer* obtained from peach, papaya and tomato. *Fruits*. 65:245-253pp.
- Hernández-Rodríguez, A.; Heydrich-Pérez, M.; Velázquez-del Valle, M.G. y A.N. Hernández-Lauzardo. 2006. Perspectivas del empleo de Rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24:42-49pp.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1998. El reino de los hongos micología básica y aplicada. Editoriales UNAM y Fondo de cultura económica. México, D.F.
- INEGI. 2005. Censo de población y vivienda. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consultado en Junio del 2010. <http://www.losreyesmichoacan.gob.mx/infoportal/poblacion/ubicaciongeografica.pdf>
- Janisiewicz, W.J. y L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review of Phytopathology*. 40:411-441pp.
- Janisiewicz, W.J. y S.N. Jeffers. 1997. Efficacy of commercial formulations of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*. 16:629-633pp.
- Jasso de Rodríguez, D.; Hernández-Castillo, D.; Rodríguez-García, R.; y J.L. Angulo- Snachez. 2005. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 21:81-87pp.
- Kafkas, E.; Kosar, M.; Turemis, N.; y K.H.C. Baser. 2006. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*. 97:732p.
- Kefialew, Y. y A. Ayalew. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Manguifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*. 50:8-11pp.
- Köhl, J.; Postma, J.; Nicot, P.; Ruocco, M. y B. Blum. 2011. Stepwise screening of microorganisms for comercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*. 57:1-12pp.



- Korsten, L.; de-Villiers, E.E.; Wehner, F.C. y J.M. Kotzen. 1997. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruits and diseases of avocado in South Africa. *Plant Diseases*. 81:455-459pp.
- Kostern, L. y F.C. Wehner. 2003. Fungi. In: *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Bartz, J. y J. Brecht Editores. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc. New York, Usa. 485-518pp.
- Lagunas-Lagunas, J.; Zavaleta-Mejia, E.; Osada-Kawasoe, S.; Aranda-Ocampo, S.; Luna-Romero, I. y H. Vaquera-Huerta. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phitophtora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 10(1):57-65pp.
- Latour, X., Delorme, S.; Mirleau, P. y P. Lemanceau. 2009. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy base don population and model strains studies. In: *Sustainable Agriculture, Vol. 1*. Lichtfouse, E.; Navarrete, M.; Debaeke, P., Véronique, S. y C. Alebrola, Editores. Springer, Berlin. 285-296pp.
- Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P. y S. Chuenchitt. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 48:113-121pp.
- Llamas, J.M. 2010. La exhibición en el piso de venta. In: *Frutas, Verduras y Legumbres*. ANTAD Editor. 41-46pp. México, D.F.
- Logeshwaran, P.; Thangaraju, M. y K. Rajasundari. 2009. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 3(4):3564-3567pp.
- Lyon, G. 2007. Agents that can elicit induced resistance. In: *Induced resistant for plant defence: A sustainable approach to corp protection*. Walters, D.; Newton, A. y G. Lyon, Editores. 9-30pp.
- Macagnan, D.; Romeiro, R.S.; Pomella, A.W.V. y J.T. de-Souza. 2008. Productions of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control*. 47. 309-314pp.
- Machuca, A. y A.M.F. Milagres. 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*. 36:177-181pp.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Lee, J.S.; Senthilkumar, M.; Lee, K.C. y S. Sundaram. 2010. Leifsonia soil sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 6:1322-1327pp.
- Mari, M. y M. Gouzzardi. 1998. The postharvest phase: Emerging Technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica*. 26:59-66pp.



- Mari, M.; Gregori, R. e I. Donati. 2004. Postharvest control of *Maonilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid. *Postharvest Biology and Technology*. 33:319-325pp.
- McLaughlin, R.J.; Wilson, C.L.; Chalutz, E.; Kurtzman, W.F. y S.F. Osman. 1990. Characterization and reclassification of yeast used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:3583-3586pp.
- Melo, L.L.M.M.; Pastore, G.M. y G.A. Macedo. 2005. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus sp.* *Process Biochemistry*. 40:3181-3185pp.
- Meng, X. y S. Tian. 2009. Effects of preharvest application of antagonistic yeast combined with chitosan on decay and quality of harvested table fruit. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 89(11):1838-1842.
- Mercier, J. y C.L. Wilson. 1994. Colonization of Apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control*. 4:138-144pp.
- Meyer, J.M. y M.A. Abdallah. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology*. 107:319-328pp.
- Mitcham, E.J.; Crisoto, C.H. y A.A. Kader. 2007. Bayas (Berries): Zarcamora (Mora), Arándano Azul, Arándano Rojo, Frambuesa. Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha. Youssefi, F. Traductor. Department of Pomology, University of California, Davis. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Bayas.shtml>. Consultado en Octubre, 2009.
- Moroginski, L.; Sansberro, P. y E. Flaschland. 2004. Establecimiento de cultivos vegetales. In: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hoppy, E. y L. Moroginski Editores. Argenbio, Argentina. 16-25pp.
- Müller, U. 2002. Chemical crop protection research. Methods and challenges. *Pure Applied Chemistry*. 74:2241-2246pp.
- Muñoz, M. y M. Juárez. 1995. Importancia Económica y social. In: *El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora*. Universidad Autónoma de Chapingo, ASERCA y CIESTAAM, Editores. 7pp. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Nenwani, V.; Doshi, P.; Saha, T. y S. Rajkumar. 2009. Isolation and characterization of a fungal isolate for phosphate solubilization and plant growth promoting activity. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 1(1):9-14pp.
- Northover, J., y T. Zhou. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fluoxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24:144-153pp.
- Núñez, C.; Usall, J.; Teixido, N.; Ochoa, X. e I. Viñas. 2001. Control of post-harvest decay of apples by pre-harvest and post-harvest application of amoniun molybdate. *Pest Management Science*. 57:1093-1099pp.



- Obagwu, J. y L. Korsten. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*. 28:187-194pp.
- Piexoto, S.C.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F. y M.L.T.M. Polizeli. 2003. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *International Microbiology*. 6:260-273pp.
- Pérez, M.N.; Flores, P.J.; García, V.L. y V.C. Lozano. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 13:1-9pp.
- Pérez-Miranda, S.; Cabirol, N.; George-Téllez, R.; Zamudio-Rivera, L.S. y F.J. Fernández. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. 70:127-131pp.
- Perkins-Veazie, P.; Clarck, J.R.; Huber, D.J.; y E.A., Baldwin. 2000. Ripening physiology in 'Navaho' thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening and composition changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 125:357pp.
- Pinchuk, I.V.; Bressollier, P.; Sorokulova, I.B.; Verneuil, B. y M.C. Urdaci. 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research in Microbiology*. 153:269-276pp.
- Plotto, A.; Roberts, D. y R. Roberts. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esulentum* L.). *Acta Horticulture*. 628:737-745pp.
- Pusey, P.L. y C.L. Wilson. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Diseases*. 68:753-756pp.
- Qadir, A. y F. Hashinaga. 2001. Inhibition of postharvest decay of fruits by nitrous oxide. *Postharvest biology and technology*. 22:279-283pp.
- Quin, G.; Shiping, T. y Y. Xu. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest biology and technology*. 31:51-58pp.
- Quing, F.; Shiping, T.; Haibo, L. y X. Yong. 2002. Production of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase of two biocontrol agents and their possible modes of action. *Chinese Science Bulletin*. 47:4. 292-296pp.
- Quiroz-Sarmientoo, V.F.; Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. y M.E. Lara-Herrera. 2008. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*. 26:27-34pp.
- Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C. y Y. Moënnelocoz. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*. 321: 341-361pp.
- Rachid, D. y B. Ahmed. 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*. 4:(7)697-702pp.





- Rancés, J.; Bonaterra, A.; Moreno, M.; Cabrefiga, J.; Badosa, E. y E. Montesinos. 2006. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39:299-307pp.
- Reyes-Carmona, J.; Yousef, G.G.; Martinez-Peniche, R.A. y M.A. Lila. 2005. Antioxidant capacity of fruits extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*. 70:497p.
- Rickard, A.H.; McBain, A.J.; Ledder, R.G.; Handley, P.S. y P. Gilbert. 2003. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiology Letters*. 220:133-140pp.
- Romanazzi, G.; Nigro, F. y A. Ippolito. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*. 29:78-80pp.
- Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A. y M. Salesmo. 2001. Effect of short hypobaric treatments on postharvest rots of sweet cherries, strawberries and table grape. *Postharvest Biology and Technology*. 22:1-6pp.
- Sarig, P.; Zahavit, T.; Zutkhi, Y.; Yannai, S.; Lisker, N. y R. Ben-Arie. 1996. Ozone for control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and molecular plant pathology*. 48:403-415pp.
- Schwyn, B. y J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160:46-56pp.
- SEDRU. 2010. Michoacán el principal productor y exportador de zarzamora en México. Secretaría de Desarrollo Rural. [http://www.michoacan.gob.mx/SEDRU/Michoacan\\_principal\\_productor\\_y\\_exportador\\_nacional\\_de\\_zarzamora](http://www.michoacan.gob.mx/SEDRU/Michoacan_principal_productor_y_exportador_nacional_de_zarzamora). Junio de 2010.
- Sharma, A. 2008. Rhamnolipid-Producing PGPR and Their Role in Damping-Off Disease Suppression. In: *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. Ahmad, I.; Pichtel, J. y S. Hayat Editores. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. 213-234pp.
- Sharma, R.R.; Singh, D. y R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50:205-221pp.
- Shi, J.; Liu, A.; Li, X.; Feng, S. y W. Chen. 2011. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. *Biological Control*. 56:2-8pp.
- Shipper, M.A. 1984. A Revisión of the genus *Rhizopus*. Studies in Mycology. Serie No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baar. The Netherlands. 34p.
- Smilanick, J.L.; Denis-Arrue, R.; Bosch J.R.; Gpmzales, A.R.; Henson D.J. and W.J. Janisiewics. 1993. Biocontrol of postharvest brown rot of



- nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Protection* 2:513-520pp.
- Soccol, C.R.; Marin, B.; Raimbault, M. y J.M. Lebeault. 1994. Potential of solid state fermentation of production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:286-290pp.
- Stanford, P. 1989. Chitosan: Commercial uses and potential applications. In: *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical properties and applications*. Skjak-Braek, G.; Anthosen, T. y P. Standford Editores. Elsevier Applied Science. New York, E.U.A. 835p.
- Stevens, C.; Khan, A.; Lu, J.; Wilson, C.; Pusey, P.; Igwegbe, C.; Kabwe, K.; Malofo, Y.; Liu, J.; Chalutz, E. y S. Dorby. 2004. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*. 23:551-554pp.
- Stevens, C.; Khan, A.; Lu, J.; Wilson, C.; Pusey, P.; Igwegbe, C.; Kabwe, K.; Malofo, Y.; Liu, J.; Chalutz, E. y S. Dorby. 1997. Integration of UV light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control*. 10:98-103pp.
- Strik, B.C.; Clark, J.R.; Finn, C.E. y M.P. Bañados. 2007. Worldwide Blackberry Production. *HorTechnology*. 17:2. 205-213pp.
- Talcott, S.T. 2007. Chemical components of berry fruits. In: *Berry fruit, Value-Added Products for Health Promotion*. Yanyun, Z. Editor. 51-72pp.
- Teixeira-Lacava, P.; Silva-Stenico, M.E.; Luiz-Araújo, W.; Colnaghi-Simionato, A.V.; Carrilho, E.; Mui-Tsai, S. y J. Lúcio-Azevedo. 2008. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methilobacterium spp.* associated with *Xylella fastidiosa subsp. pauca*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 43(4)521-528pp.
- Tripathi, P., y N. Dubey. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology*. 32:235-245pp.
- Tronsmo, A. y C. Denis. 1977. Te use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 83:449-455pp.
- USDA. 2011. Clasification of kindom *Plantae*. Natural Resource Conservation Service. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=RUF80>. Consultado en: Septiembre, 2011.
- Velázquez-del Valle, M.G.; Bautista-Baños, S. y A.N. Hernández-Lauzardo. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha de productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26(001):49-55pp.
- Velázquez-Gurrola, A.; Angulo-Escalante, M.; García-Estrada, R.; Carrillo-Fasio, J. y C. Guerrero-Ontiveros. 2005. Extractos de semilla de *Moringa oleifera* Lam. para el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(2):81-87pp.



- Wada, L. and B. Ou. 2002. Antioxidant Activity and Phenolic content of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 3495-3500 pp.
- Wilson, C.L.; Franklin, J.D. y P.L. Pusey. 1987. Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopatology*. 77:303-305pp.
- Wisniewski, M.E.; Dorby, S.; Chalutz, E. y Y. Eilam. 1995. Effect of  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  on *Botritis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophilla*. *Plant Pathology*. 44:1016-1024pp.
- Xuan, T.; Yuichi, O.; Yunko, C.; Eiji, T.; Hiroyuki, T.; Mitsuhiro, M.; Khanh, T., y N. Huu-Hong. 2003. Dava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. *Crop Protection*. 22:873-881pp.
- Yildiz, Ö. and S. Peral-Eyduran. 2009. Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. *African Journal of Agricultural Research*. 4(5): 422-426pp.
- Zhang, D.; Spadaro, D.; Garibaldi, A. y M. Lodovica-Gullino. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*. 54:172-180pp.
- Zhang-Fengying, Y.B. 2007. Isolation and identification of predominant fungi from traditional sake koji of Zhaoqing Guangdong. *Journal of China Institute of Food Science and Technology*. 1:21-30pp.
- Zhao, Y.; Tu, K.; Shao, X.; Jing, W. y Z. Su. 2008. Effect of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 49:113-120pp.
- Zoffoli, J.; Latorre, B.; Daire, N. y S. Viertel. 2005. Effectiveness of chlorine dioxide as influenced by concentration, pH, and exposure time on spore germination of *Botritis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*. *Latinoamerican Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 32:127-196pp.