



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS ANTIFÚNGICOS
DE *Bacillus* sp. IG1244 PARA EL CONTROL DE
Colletotrichum spp.**

Por:

Mayte Marlene Salas

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mayte Marlene Salas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



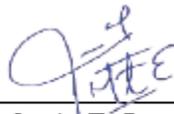
Dr. Ali Jesús Asaff Torres
Director de tesis



Dr. Francisco de la Torre González
Codirector de tesis



Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Integrante del comité de tesis



Dr. Martín E. Jara Marini
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización de Metabolitos Antifúngicos de *Bacillus* sp. IG1244 para el Control de *Colletotrichum* spp” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Mayte Marlene Salas, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), por la beca de maestría otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD), por permitirme alcanzar esta meta académica y profesional.

A la empresa Innovak Chihuahua por financiar el presente trabajo de investigación, abrirme sus puertas y brindarme el apoyo técnico necesario para la realización de mi trabajo experimental de tesis.

A mi director de Tesis, el Dr. Ali Asaff Torres por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por todo el conocimiento transmitido a lo largo de este periodo. Especialmente por todo el apoyo incondicional para la realización del trabajo de tesis.

A mi Co-director de Tesis, el Dr. Francisco de la Torre González por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y brindarme todo el apoyo necesario para el cumplimiento del trabajo y todos sus consejos y asesorías brindadas.

Al Dra. Elisa Valenzuela Soto y Dr. Martín Jara Marini, por todas las observaciones, consejos y el apoyo brindado durante mi estudio de maestría.

Al Dr. Víctor Contreras Jáquez, por todas las asesorías, concejos brindados y el apoyo incondicional durante mi estudio de mi estudio de maestría.

A los integrantes del grupo de Investigación de Innovak global, M. C. Alexandro Sustaita y Mario Gonzales, por su apoyo técnico en el laboratorio de central analítica y por la amistad brindada.

A la QBP Larissa Cordero, M. C. Marcos Orozco, Tec. Lizeth Valenzuela, Tec. Biridiana Flores y

al Ing. Ricardo García por el apoyo brindado en el laboratorio de bioprocesos y por la amistad brindada.

Al M. C. Hugo Barrera, por el apoyo en laboratorio de biología molecular, los conejos y la amistad brindada.

A la Ing. Sara Salas por su invaluable apoyo en toda mi estancia y por su valiosa amistad.

A mi mamá por apoyarme e impulsarme en mi carrera profesional y personal.

A mi novio y a mi pequeña gatita por acompañarme en este proceso, por todo el apoyo y el impulso que me han brindado.

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelita
Encarnación Salas, que impulso
a su linaje femenino a seguir
adelante y lograr sus sueños

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1. El Cultivo de Aguacate.....	19
2.1.1. Biología de la Planta de Aguacate	19
2.1.2. Factores que Influyen en el Cultivo de Aguacate	20
2.1.3. Impacto Económico del Cultivo de Aguacate	20
2.2. Antracnosis en Cultivos de Aguacate.....	21
2.2.1. <i>Colletotrichum</i> , Agente Causal de la Antracnosis	21
2.2.2. Nuevas Especies del Género <i>Colletotrichum</i> que Infechan Aguacate.....	22
2.2.3. Antifúngicos de Síntesis Química para Tratar Antracnosis.....	24
2.3. Microorganismos Antagonistas a Hongos Fitopatógenos: una Alternativa Sostenible Para el Control Biológico de Antracnosis.....	25
2.3.1. Mecanismo de Competencia Indirecta de Microorganismos con Potencial Antifúngico.....	26
2.3.2. Mecanismo de Competencia Directa de Microorganismos con Potencial Antifúngico.....	27
2.4. Principales Metabolitos Antifúngicos Producidos por <i>Bacillus</i> y su Papel en la Biotecnología Agrícola.....	29
2.4.1. Surfactinas	31
2.4.2. Iturinas	34
2.4.3. Fengicinas	36
2.5. <i>Bacillus velezensis</i> : Aplicación en la Biotecnología Agrícola	38
2.5.1. <i>Bacillus velezensis</i> : Generalidades	38
2.5.2. Diversos Usos de <i>Bacillus velezensis</i> en la Agricultura	41
2.5.3. Producción de Metabolitos por <i>B. velezensis</i> con Capacidad de Control Biológico Directo e Indirecto	42
3. HIPÓTESIS	47
4. OBJETIVOS	48

CONTENIDO (continuación)

4.1. Objetivo General.....	48
4.2. Objetivos Específicos	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
5.1. Comprobación de la Identidad de los Microorganismos de Estudio	49
5.1.1. <i>Bacillus</i> sp. IG1244.....	49
5.1.2. Determinación de la Huella Genómica de <i>Bacillus</i> sp. IG1244 Basada en BOX-PCR.....	50
5.1.3. <i>Colletotrichum</i> spp.....	51
5.2. Determinación de la Actividad Antifúngica de <i>Bacillus</i> sp. IG1244	52
5.3. Metabolitos Volátiles o No Volátiles con Actividad Antifúngica de <i>Bacillus</i> sp. IG1244	53
5.4. Búsqueda Biodirigida de Fracciones Bioactivas	54
5.4.1. Selección del Medio Cultivo.....	54
5.4.1.1. Pruebas de antibiosis.....	55
5.4.1.2. Análisis estadístico.....	55
5.4.2. Cinéticas de Crecimiento Microbiano y de Producción de Metabolitos Antifúngicos	56
5.4.2.1. Condiciones de cultivo sumergido para la cinética de crecimientomicrobiano y producción de metabolitos antifúngicos... ..	56
5.4.2.2. Medición del crecimiento bacteriano.....	56
5.4.2.3. Medición de la producción de metabolitos antifúngicos.. ..	56
5.4.2.4. Análisis estadístico para la obtención de parámetros cinéticos.. ..	56
5.4.3. Identificación de las Fracciones Bioactivas.....	57
5.4.3.1. Preparación del extracto de metabolitos antifúngicos de <i>Bacillus</i> sp. IG1244.....	57
5.4.3.2. Separación de fracciones mediante cromatografía en capa fina (TLC).. ..	58
5.4.3.3. Identificación de las fracciones bioactivas mediante la técnica de autobiografía.	58
5.5. Caracterización Química del (los) Metabolito(s) Contenidos en la(s) Fracción(es) Activa(s)	59
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
6.1. Identidad de los Microorganismos de Estudio	60
6.2. Antibiosis de <i>B. velezensis</i> IG1244 Frente a <i>Colletotrichum</i> spp.	67
6.3. Naturaleza de los Metabolitos Bioactivos Involucrados en el Control de <i>Colletotrichum</i> spp.	70
6.4. Selección del Medio de Cultivo Para la Producción de Metabolitos Antifúngicos.....	71
6.5. Crecimiento Microbiano y Producción de Metabolitos Antifúngicos de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244.....	73
6.6. Identificación de las Fracciones con Actividad Antifúngica del Extracto de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244.....	76

CONTENIDO (continuación)

6.7. Caracterización Química de las Fracciones Antifúngicas	78
6.7.1. Caracterización de las Fracciones Bioactivas Mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC)	78
6.7.2. Identificación de Lipopéptidos de la Fracción Bioactiva (Rf 0.1 a 0.2) a Través de ESI-MS	80
6.7.3. Identificación de la Fracción Antifúngica (Rf 0.3-0.4) por UPLC-ESI-MS	81
7. CONCLUSIONES	86
8. RECOMENDACIONES	87
9. BIBLIOGRAFÍA	88
10. ANEXOS	98
10.1. Espectro de la Fracción Rf 0.15.....	98
10.2. Espectros de la Fracción Rf 0.3 a 0.4 Ionización Modo Positivo.....	99
10.3. Espectros de la Fracción Rf 0.3 a 0.4 Ionización Modo Negativo	100
10.4. Enlaces de Acceso para la Identificación del Compuesto	101

LISTA DE FIGURAS

Figura		Páginas
1	Aguacate infectado con antracnosis. a) afecciones externas b) daño interno.....	22
2	Mecanismos de competencia de microorganismos con potencial antagonista contra fitopatógenos.....	26
3	Inducción a resistencia sistémica de plantas por lipopéptidos cíclicos (LPCs) de <i>Bacillus</i>	30
4	Diagrama de la estructura clásica de las surfactinas.....	32
5	Síntesis de surfactina.....	33
6	Diagrama de la estructura clásica de las iturinas.....	35
7	Homólogos de iturina-A.....	35
8	Diagrama de la estructura clásica de las fengicinas.....	37
9	Filogenia del complejo de especies de <i>Bacillus subtilis</i> basado en cepas representantes	39
10	Presencia y ausencia de grupos de genes biosintéticos de <i>Bacillus</i> mostrados en su árbol filogenético	41
11	Compuestos antimicrobianos sintetizados por <i>B. velezensis</i>	43
12	Ensayo para la determinación de la actividad antifúngica	53
13	Ensayo para la determinación de la naturaleza del metabolito antifúngico (volátil o no volátil)	54
14	Análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA de <i>Bacillus</i> sp IG1244 en relación con otras bacterias.....	61
15	Análisis filogenético basado en la concatenación de genes (<i>gyrA</i> , <i>rpoB</i> , <i>groEl</i> y <i>purH</i>) de <i>Bacillus</i> sp. IG1244 en relación con otras bacterias de su género.....	62
16	Huella genómica <i>Bacillus</i> sp. IG1244, en comparación con otros <i>Bacillus</i>	63
17	Análisis filogenético basado en el gen ITS de <i>Colletotrichum</i> spp.	65
18	Análisis filogenético basado en el gen β -tubulina de <i>Colletotrichum</i> spp.....	66
19	Antagonismo por confrontación <i>in vitro</i> de <i>B. velezensis</i> IG1244 contra especies del género <i>Colletotrichum</i>	67
20	Imágenes al microscopio del micelio de especies de <i>Colletotrichum</i> spp. enfrentadas y no enfrentados con <i>Bacillus velezensis</i> IG1244	68
21	Enfrentamiento en cajas de Petri divididas para la evaluación de la naturaleza (volátil o no volátil) de los metabolitos antifúngicos producidos por la cepa <i>B. velezensis</i> IG1244	71

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Páginas
22	Efecto del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos antifúngicos, cuantificado a través de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes obtenidos del cultivo de <i>B. velezensis</i> IG1244	72
23	Cinética de crecimiento microbiano y producción de metabolitos antifúngicos. Cinética de crecimiento de <i>B. velezensis</i> IG1244	74
24	Actividad antifúngica de las fracciones del extracto de metanol del sobrenadante de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244 a diferentes dosis	77
25	Cromatogramas del extracto metanólico del sobrenadante de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244	78
26	Perfil de compuestos de la fracción Rf 0.3 a 0.4 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo positivo.....	81
27	Perfil de compuestos de la fracción Rf 0.3 a 0.4 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo negativo.....	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Páginas
1	Secuencia peptídica de las isoformas de surfactinas	32
2	Secuencia peptídica de las isoformas de iturinas	35
3	Secuencia peptídica de las isoformas de fengicinas	37
4	Cebadores para la identificación de <i>Bacillus</i> sp. IG1244	50
5	Cebadores para la identificación de <i>Colletotrichum</i> spp	52
6	Medios de cultivo utilizados en el estudio	55
7	Pares de bases secuenciados para la región ITS y β -Tubulina correspondiente a los hongos de estudio <i>Colletotrichum</i>	65
8	Lipopéptidos de la fracción antifúngica (Rf 0.15) de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244 identificado por ESI-MS.....	81
9	Compuestos identificados de la fracción antifúngica (Rf 0.3-0.4) de <i>Bacillus velezensis</i> IG1244 por UPLC-ESI-MS	82

RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad fúngica que causa lesiones en los aguacates debido a hongos del género *Colletotrichum*. Recientemente, se han descubierto especies más virulentas de *Colletotrichum* en aguacate que dificultan su control. Para abordar este problema, el grupo de investigación aisló la bacteria *Bacillus* sp. IG1244, que mostró actividad antagonista contra *Colletotrichum* (datos no publicados). Sin embargo, se desconocían la identidad de la bacteria, sus mecanismos de acción y los metabolitos antifúngicos.

Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue caracterizar los metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* sp. IG1244, que posteriormente se identificó como *Bacillus velezensis* IG1244 mediante análisis multilocus y la técnica de BOX-PCR. Se descubrió que los metabolitos no volátiles (MNV) son los principales responsables del mecanismo de antibiosis, al distorsionar las hifas fúngicas y estimular la formación de estructuras de resistencia.

Además, se evaluó la producción de MNV en cuatro medios (nutritivo, Luria-Bertani, ISP2 y MOLP) y su efecto antifúngico contra *C. acutatum*, *C. kahawae* subsp *ciggaro* y *C. gloeosporioides*. En promedio, se observó una actividad antifúngica 1.35 veces mayor en el medio MOLP en comparación con los otros medios, lo que demuestra la influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos antifúngicos. También se establecieron las cinéticas de crecimiento bacteriano y producción de MNV antifúngicos de *B. velezensis* IG1244 en medio MOLP. Se encontró que los MNV antifúngicos son secundarios y su síntesis no está directamente relacionada con el crecimiento bacteriano, ya que comienza en la fase estacionaria.

Por otro lado, el análisis por cromatografía en capa fina (TLC) realizado sobre el extracto metanólico del sobrenadante, libre de células de *B. velezensis* IG1244, complementado con la técnica de bioautografía, permitió, identificar dos fracciones con actividad antifúngica. Para la primera fracción (con menor actividad antifúngica), se realizó un análisis de espectrometría de masas por ionización electrospray (ESI-MS) en el que se identificaron cuatro isoformas de fengicina A y tres isoformas de fengicina B. Por otro lado, para la segunda fracción (con mayor actividad antifúngica), se llevó a cabo un análisis de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) donde se identificó la presencia de surfactina, entre otras varias moléculas que no pudieron ser identificadas, presumiendo la presencia de nuevos

metabolitos antifúngicos no lipopeptídicos.

Palabras clave: Actividad antifúngica, metabolitos secundarios, antibiosis, antracnosis, *Bacillus velezensis*.

ABSTRACT

Anthrachnose is a fungal disease that causes lesions in avocados due to fungi of the genus *Colletotrichum*. Recently, more virulent species of *Colletotrichum* have been discovered in avocados, making disease control challenging. To address this problem, the research group isolated the bacterium *Bacillus* sp. IG1244, which exhibited antagonistic activity against *Colletotrichum* (unpublished data). However, the identity of the bacterium, its mechanisms of action, and the antifungal metabolites were unknown.

Therefore, the aim of this study was to characterize the antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IG1244, which was subsequently identified as *Bacillus velezensis* IG1244 through multilocus analysis and BOX-PCR genomic fingerprinting. It was found that the mechanism of antibiosis was primarily mediated by non-volatile metabolites (NVM) that distorted fungal hyphae and stimulated the formation of resistance structures.

Furthermore, the production of NVMs was evaluated in four media (nutrient, Luria-Bertani, ISP2, and MOLP), and their antifungal effect against *C. acutatum*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, and *C. gloeosporioides* was assessed. On average, the antifungal activity in the MOLP medium was 1.35 times higher compared to the other media, indicating the influence of the culture medium on the production of antifungal metabolites.

The growth kinetics of *B. velezensis* IG1244 and the production of antifungal NVMs were also established in the MOLP medium. It was observed that the antifungal MNVs were secondary metabolites, and there was no direct relationship between microbial growth and the production of antifungal NVMs, as their synthesis initiated in the stationary phase.

Moreover, thin-layer chromatography (TLC) analysis of the cell-free methanolic extract of *B. velezensis* IG1244 supernatant, coupled with bioautography, enabled the identification of two fractions with antifungal activity. For the first fraction (with lower antifungal activity), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis identified four isoforms of fengycin A and three isoforms of fengycin B. Additionally, for the second fraction (with higher antifungal activity), ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) analysis revealed the presence of surfactin and several unidentified molecules, suggesting the presence of new non-lipopeptide antifungal metabolites.

Keywords: Antifungal activity, secondary metabolites, antibiosis, anthracnose, *Bacillus velezensis*.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Colletotrichum* son los agentes causales de la antracnosis, enfermedad que ocasiona grandes pérdidas en la producción de aguacate (*Persea americana*) por las lesiones marrones de forma elipsoidal en el fruto, siendo estas, el motivo principal de rechazo del producto (Dean *et al.*, 2012). En las últimas décadas, la infección cruzada de antracnosis (de un cultivo a otro de diferente especie) ha dado lugar a la aparición de nuevas especies de *Colletotrichum* que infectan aguacate con un mayor número de factores de virulencia (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020). Por esta razón, dicha enfermedad se ha convertido en una amenaza para el comercio internacional de este fruto, principalmente para México, puesto que es el mayor productor y exportador de aguacate del mundo (Silva-Rojas *et al.*, 2011; Trinidad *et al.*, 2017).

De forma tradicional, este problema es solventado mediante el uso de fungicidas de síntesis química; sin embargo, cuando el fungicida es aplicado en la postcosecha, los periodos de “intervalo de seguridad” (antes de la comercialización) suelen ser largos. Por otro lado, cuando el fungicida es aplicado en los cultivos, causan un desequilibrio en el medio ambiente, principalmente en la microbiota del suelo (Abbey *et al.*, 2019). Como una alternativa de bajo riesgo para la salud humana y el medio ambiente, en los últimos años, se ha promovido el uso de biofungicidas basados en microorganismos, como bacterias del género *Bacillus*, los cuales producen metabolitos con actividad antifúngica que presentan mecanismos de antibiosis y/o de competencia (Naik *et al.*, 2019).

Las especies del género *Bacillus* se caracterizan por su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios, como los lipopéptidos cíclicos (surfactinas, iturinas, y fengicinas), los cuales muestran un mecanismo de antibiosis para el control biológico de antracnosis (Choub *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2020). Asimismo, pueden producir enzimas, péptidos y metabolitos volátiles con efecto antibiótico (Choub *et al.*, 2021). En busca de nuevas alternativas biotecnológicas, el grupo de investigación realizó un estudio (datos no publicados), donde aislaron de compostas de cascarillas agrícolas, 27 cepas bacterianas, de las cuales, la cepa identificada como *Bacillus* sp. IG1244 presentó un mayor nivel de control sobre *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum kahawae* (nuevas cepas aisladas de antracnosis en aguacate) y *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, la identidad de la cepa, sus principales mecanismos de acción, así como los posibles metabolitos que produce con actividad

antagónica contra *Colletotrichum* no estaban suficientemente descritos y/o caracterizados. Consecuentemente, el objetivo del presente trabajo fue realizar la identificación y caracterización de la cepa *Bacillus* sp. IG1244, así como de los metabolitos con actividad antibiótica contra las cepas patógenas de aguacate *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum kahawae* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Cultivo de Aguacate

2.1.1. Biología de la Planta de Aguacate

El árbol de aguacate o también conocido como aguacatero, es una planta perteneciente a la familia de las Lauráceas, denominada *Persea americana*. Es un árbol de hoja perenne que puede crecer hasta una altura de 20 metros, aunque a menudo se mantiene más pequeño para facilitar la cosecha de sus frutos (Bhore *et al.*, 2021). Dicho árbol, tiene un sistema de raíces fibrosas y poco profundas, además, las hojas son grandes, de forma ovalada, con una textura gruesa y coriácea, así mismo, las flores son pequeñas, de color amarillo verdoso y se producen en las axilas de las hojas. En cuanto a su reproducción, el aguacatero es bisexual, por lo que presenta flores masculinas y femeninas en el mismo árbol, aunque en diferentes épocas del año (Pliego-Alfaro *et al.*, 2020). Por otro lado, la polinización es necesaria para que se produzca la fructificación. En el aguacatero, ocurre la polinización cruzada, lo que significa que el polen de una flor debe ser transferido a la flor de otro árbol para que se produzca la fertilización. En el aguacatero la polinización se realiza principalmente a través de insectos, como abejas y abejorros, que buscan el néctar y polen de las flores (Ranade *et al.*, 2015). Es importante tener suficientes árboles de diferentes variedades y un buen manejo de los polinizadores para asegurar una polinización efectiva y una buena producción de frutos (Pliego-Alfaro *et al.*, 2020). Cabe añadir, que el fruto del aguacate es climatérico, lo que significa que continúa madurando después de ser cosechado. El tiempo que tarda el aguacate en madurar depende de la variedad, pero generalmente toma entre tres y siete días para que el aguacate esté listo para ser consumido (Bhore *et al.*, 2021). En resumen, la biología del aguacate incluye características únicas en cuanto a hojas, flores, frutos, polinización, propagación y crecimiento. Es una planta valiosa tanto por su fruto como por su importancia ecológica como fuente de alimento para los insectos polinizadores.

2.1.2. Factores que Influyen en el Cultivo de Aguacate

Existen varios factores que influyen en el cultivo de aguacate y deben ser tomados en cuenta para su manejo, ya que de esto depende la producción del fruto. Un factor importante es el clima, ya que el aguacate se adapta mejor a climas cálidos y húmedos, con una temperatura media de 20 a 25 °C. También el suelo debe ser bien drenado, con pH entre 5,5 y 7,5 (Pliego-Alfaro *et al.*, 2020). Por otro lado, el aguacatero requiere de riego constante, especialmente en épocas de sequía. Recomiendan regar con una frecuencia de 2 a 3 veces por semana durante los primeros años de crecimiento, y una vez por semana en plantas adultas (Bhore *et al.*, 2021). Asimismo, la poda del aguacate es importante para mantener la forma de la planta, eliminar ramas secas o enfermas para mejorar la calidad y cantidad de la fruta. Recomiendan realizarla anualmente durante la época de dormancia de la planta. Otro aspecto importante es el control de plagas y enfermedades, ya que el aguacate es susceptible a diversas plagas y enfermedades, como el barrenador del fruto, la antracnosis y la mancha foliar (Bhore *et al.*, 2021), por lo cual, se deben realizar medidas preventivas y de control para evitar pérdidas económicas.

2.1.3. Impacto Económico del Cultivo de Aguacate

El aguacate es una fruta que tiene una gran demanda a nivel mundial y su consumo ha aumentado significativamente en los últimos años, debido a sus propiedades nutricionales (contenido de ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos insaturados, potasio y vitaminas C, E y B₆), su versatilidad en la cocina y a sus aplicaciones industriales, como materia prima para la producción de aceite de aguacate (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015). Gracias al aumento en la demanda, en el 2015 la producción mundial de aguacate alcanzó los 5.3 millones de toneladas y en el año 2020, el valor del mercado global del aguacate se estimó en 16 mil millones de dólares estadounidenses. Los principales países productores de aguacate son México, Perú, Chile, Colombia, República Dominicana, Indonesia, Brasil, Kenia y Estados Unidos, entre otros, siendo México el mayor productor de aguacate a nivel mundial, con una producción anual que supera el millón de toneladas (Silva-Rojas *et al.*, 2011).

Solamente en 2018, México cosechó 1.18 millones de toneladas de aguacate, siendo el principal productor el estado de Michoacán, aportando un 76.6% de la producción nacional total. México exporta aguacate a varios países de Asia, como Japón y algunos países de Europa; sin embargo, el principal importador de aguacate mexicano es Estados Unidos (Herrera-González *et al.*, 2020). Esto puede deberse a que en las últimas dos décadas el consumo per cápita de aguacate en los EEUU ha aumentado un 443 % (Hiti-Bandaralage *et al.*, 2019).

Para la exportación de aguacate, el fruto debe cumplir estándares de calidad altos, además de pasar controles fitosanitarios rigurosos, siendo limitantes las plagas y enfermedades (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020). En México, la enfermedad conocida como antracnosis es uno de los problemas fitosanitarios más alarmantes en aguacate, debido a su amplia distribución en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Nayarit (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020), razón por la cual, sólo el 50% de los aguacates que se producen en el país se exportan (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). Además, se sabe que la antracnosis genera una pérdida de hasta el 20% del producto final (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020; Zakaria, 2021). Por tal motivo, es de gran importancia el control de antracnosis, tanto en la etapa de cosecha, como en la de post-cosecha, para evitar pérdidas del producto.

2.2. Antracnosis en Cultivos de Aguacate

2.2.1. *Colletotrichum*, Agente Causal de la Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad causada por hongos del género *Colletotrichum* que afecta principalmente a cultivos frutales como aguacate, fresa, mango, plátano, guayaba, entre otros (Zakaria, 2021). *Colletotrichum* se encuentra entre los 10 hongos con mayor relevancia científica y económica en agricultura debido a la magnitud de los daños que ocasiona, al ser capaz de infectar varias partes de la planta como hojas, tallos y frutos (Dean *et al.*, 2012). Además, *Colletotrichum* es un organismo que puede permanecer en un estado latente en los cultivos por mucho tiempo, siendo la condición climática, la detonante para iniciar la infección (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020).

Se encuentra inactivo durante la estación seca y a temperaturas menores a 18°C, mientras que a temperaturas entre 25 y 28 °C, y humedades relativas elevadas (>95%), se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo, principalmente en los frutos (Sharma *et al.*, 2015).

En el aguacate, las lesiones provocadas en el fruto por dicho patógeno son oscuras, de forma circular y de tamaño variable, tal como se muestra en la Figura 1. Finalmente, se forma un tejido necrótico hundido donde se producen masas conidiales, las cuales tienden a expandirse rápidamente en la piel de la fruta y también infectan la pulpa, causando pudrición (Dean *et al.*, 2012; Freeman *et al.*, 1998). En su mecanismo de acción, el patógeno primero produce un apresorio melanizado para establecer una interacción con el hospedero, dicho apresorio penetra la cutícula de la fruta. Después, se forman vesículas de infección e hifas primarias, etapa conocida como biotrófica. Luego, el hongo desarrolla hifas secundarias necrotróficas que se propagan hasta matar a la célula hospedera (Sharma *et al.*, 2015). Por otro lado, si bien la especie más común en la infección del aguacate es *Colletotrichum gloeosporioides* (Silva-Rojas *et al.*, 2011), en los últimos años han ido apareciendo un mayor número de especies de *Colletotrichum* de mayor virulencia que infectan al aguacate, lo que implica un nuevo problema para el control fitosanitario.

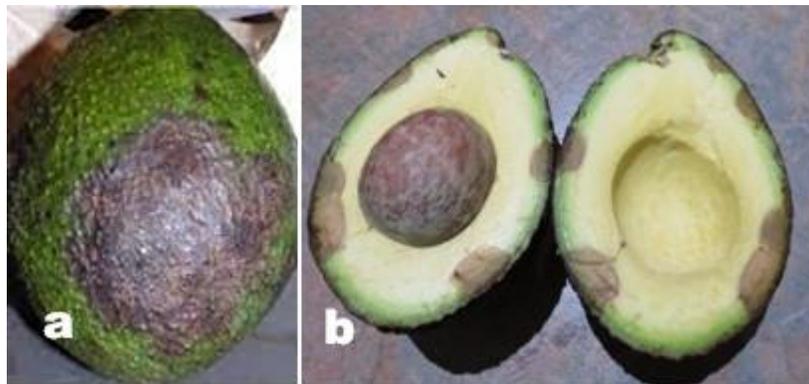


Figura 1 Aguacate infectado con antracnosis. a) afecciones externas b) daño interno. Fuente: Zakaria (2021)

2.2.2. Nuevas Especies del Género *Colletotrichum* que Infectan Aguacate

Es importante mencionar que algunas especies de *Colletotrichum* infectan hospederos específicos,

como *C. musae*, que infecta exclusivamente a cultivos de banano (*Musa* spp.) (Weir *et al.*, 2012); mientras que otras especies de *Colletotrichum* infectan múltiples hospederos, dando lugar a infecciones cruzadas; es decir, puede haber transmisión del hongo de un cultivo a otro muy diferente; como es el caso de *C. siamense*, aislado de café, el cual, pudo también infectar mango, papaya, manzana roja, chile y naranja (Freeman *et al.*, 1998; Phoulivong *et al.*, 2012). Cabe agregar que la antracnosis en cultivos de aguacate es causada por varias especies de hongos del género *Colletotrichum*.; agrupados por sus características genotípicas y fenotípicas en diferentes conjuntos de especies denominados “complejos”. En una primera instancia fueron reportados los complejos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, (Silva-Rojas *et al.*, 2011). Sin embargo, este escenario cambiaría tiempo después.

En los últimos años se han reportado nuevas especies de *Colletotrichum* en aguacate, lo que ha llevado a los investigadores a establecer un cuarto complejo denominado *C. magnun* (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020). Estas nuevas especies de *Colletotrichum* que infectan aguacate fueron reportadas en 12 países incluyendo Australia, Brasil, China, México, entre otros (Li *et al.*, 2022). Cabe resaltar, que en México se han reportado especies de *Colletotrichum* pertenecientes a los cuatro complejos antes mencionados (Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020). La aparición de nuevas especies de *Colletotrichum* que infectan aguacate se da por la “infección cruzada”, fenómeno antes mencionado, este sucede por la difusión de las esporas del patógeno por diferentes canales en su medio ambiente como agua, aire, insectos u otros animales y esta se ve favorecida a temperaturas que oscilan entre los 20 y 30°C (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020; Phoulivong *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015). Al ocurrir este fenómeno, el patógeno generalmente adquiere más factores de virulencia, debido a las adaptaciones que tuvo que sufrir para poder atacar eficazmente al hospedero (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020), aspecto que implica nuevos retos para el control de la enfermedad.

En ese sentido, el grupo de investigación aisló de aguacates infectados con antracnosis, dos nuevas cepas identificadas como *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae*, teniendo como particularidad su resistencia a biofungicidas orientados a controlar *C. gloeosporioides*. Como se mencionó anteriormente, Fuentes-Aragón *et al.* (2020) reportaron a *C. acutatum* como una especie que provoca antracnosis en aguacate. Por otro lado, en México no existen reportes previos sobre *C. kahawae* como patógeno del aguacate; sin embargo, Kwon *et al.* (2020) reportó por primera vez aguacates provenientes de exportación en un mercado en Corea del Sur, infectados con *C. kahawae*

subsp *ciggaro*. Acerca de *C. kahawae* se sabe que fue un patógeno exclusivo de café (*Coffea arabica*) pero por la infección cruzada fue cambiando de hospedero, por lo que en la actualidad se encuentra en varios hospederos. A este proceso se denomina especiación por cambio de hospedero, un caso particular de especiación ecológica, que es una de las principales rutas para la aparición de nuevos patógenos fúngicos (Silva *et al.*, 2012).

2.2.3. Antifúngicos de Síntesis Química para Tratar Antracnosis

En el caso de la antracnosis en aguacate, el uso de fungicidas de síntesis química ha sido amplio, pudiendo ser aplicados antes de la cosecha o en postcosecha. En el mercado existen una gran variedad de productos, como el Clorotalonil[®], (Fórmula: C₈Cl₄N₂; Grupo químico: benzonitrilo clorado), el cual produce inhibición en el crecimiento micelial e inhibe la germinación de esporas del patógeno. Esta molécula actúa bloqueando muchos procesos metabólicos del hongo, como la producción de ATP vía el ciclo de Krebs, debido a su acoplamiento con el agente reductor glutatión (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). No obstante, su acción es inespecífica al inhibir también el crecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR (plant growth promoting rhizobacteria por sus siglas en inglés), afectando a la microbiota del suelo cuando llega a él (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019). Igualmente puede afectar también la microbiota benéfica de otras especies, como las de la piel del anfibio *Lithobates vibicarius*, del bosque montano de Costa Rica que, al estar en contacto con dicho fungicida, resultaron inhibidas (Jiménez *et al.*, 2021).

Otro fungicida utilizado mayormente en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Colombia es el Procloraz[®] (Fórmula: C₁₅H₁₆Cl₃N₃O₂; Grupo químico: Imidazol clorado); cuyo principio activo afecta el crecimiento micelial del patógeno inhibiendo la síntesis de ergosterol, (un componente de la membrana celular del hongo) (Fonseca *et al.*, 2019; Kimaru *et al.*, 2020; Mora-Aguilera *et al.*, 2021). Sin embargo, el aguacate tratado con Procloraz[®] no puede ser comercializado de manera inmediata después de su aplicación, debiendo esperar al menos un periodo de 15 días (Fonseca *et al.*, 2019). El problema es que, en el periodo de espera, el fruto madura, llegando a los puntos de comercialización (mercados y supermercados), ya en etapa muy madura o incluso en etapa de descomposición.

También se utilizan los fungicidas DMI[®] (demethylation inhibitor por sus siglas en inglés), como metconazol, tebuconazol, flutriafol y fenbuconazol. Sin embargo, en los últimos años se han reportado cepas de *Colletotrichum*, como *Colletotrichum truncatum*, con resistencia inherente a fungicidas inhibidores de la 1,4- α desmetilación (DMI), esto debido a la sobreexpresión de los genes *CYP51A* y/o *CYP51B*; además, a la variación de cuatro aminoácidos (L208Y, H238R, S302A e I366L) en *CYP51A* que reducen la afinidad por los azoles y tres variaciones (H373 N, M376L y S511T) en *CYP51B* que cambian la conformación del bolsillo de unión a fungicidas DMI (Chen *et al.*, 2018). Por esta razón, es probable que algunas cepas del género *Colletotrichum* hayan generado resistencia a diversos tipos de fungicidas de síntesis química. Anudado a este problema, el hongo tiene una amplia gama de hospederos, lo que aumenta las posibilidades de una reinfección después de la aplicación de productos químicos en frutos (Kimaru *et al.*, 2020). En resumen, el uso de fungicidas de síntesis química trae consigo varias desventajas, desde la pérdida de la microbiota del suelo, periodos largos de intervalo de seguridad, resistencia inherente a fungicidas entre otras; por ende, las medidas a tomar antes de usar dichos productos deben ser rigurosamente controlados, o en efecto recurrir a otras opciones más sostenibles.

2.3. Microorganismos Antagonistas a Hongos Fitopatógenos: una Alternativa Sostenible Para el Control Biológico de Antracnosis

Los biofungicidas son formulaciones que ayudan a combatir enfermedades de origen fúngico en la agricultura, que emplean como principio activo a microorganismos antagonistas de los agentes causales (Naik *et al.*, 2019). En la naturaleza, los microorganismos compiten con sus vecinos por espacio y nutrientes utilizando diferentes mecanismos, creando una serie de interacciones en sus ecosistemas, las cuales vienen siendo aprovechadas por la biotecnología agrícola para combatir enfermedades en los cultivos (Hibbing *et al.*, 2010). El desarrollo de los biofungicidas fue impulsado en los últimos años gracias al aislamiento y caracterización de nuevos microorganismos capaces de controlar hongos fitopatógenos en condiciones de campo (Hofstein *et al.*, 1999). Su producción a gran escala fue impulsada por las nuevas tecnologías de fermentación y de estabilización, como las de encapsulación y liofilización (Hashem *et al.*, 2021),

Dentro de los microorganismos utilizados para tratar enfermedades de origen fúngico, encontramos a hongos del género *Trichoderma*, algunas actinobacterias, principalmente del género *Streptomyces*, bacterias del género *Bacillus* (Vejan *et al.*, 2016), entre otros. En general, los microorganismos antagonistas de hongos fitopatógenos compiten con ellos de forma directa e indirecta, (Hibbing *et al.*, 2010; Naik *et al.*, 2019; Ramakrishna *et al.*, 2019), tal como se observa en la Figura 2.

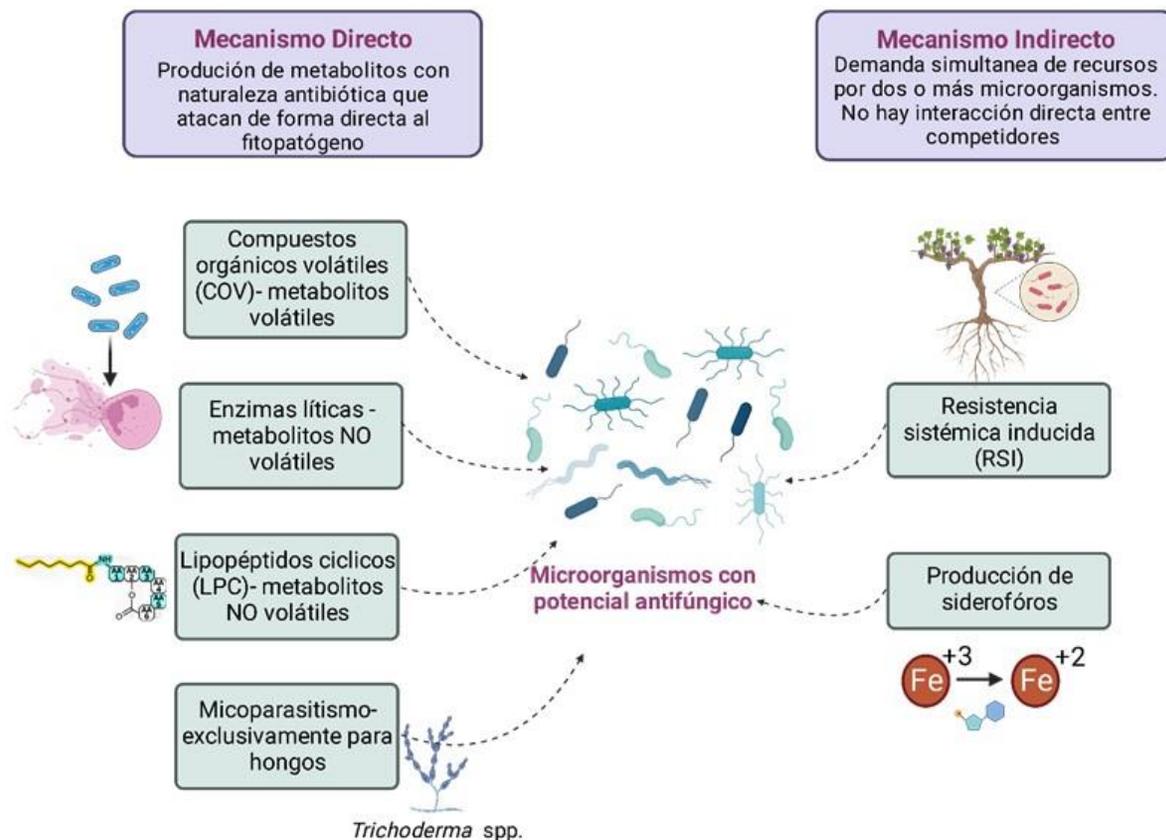


Figura 2 Mecanismos de competencia de microorganismos con potencial antagonista contra fitopatógenos

2.3.1. Mecanismo de Competencia Indirecta de Microorganismos con Potencial Antifúngico

La estrategia de competencia de tipo indirecto implica una lucha entre los competidores por un recurso limitante (nutrientes o espacio); es decir, hay una demanda simultánea de recursos por dos

o más microorganismos sin que exista una interacción directa entre los competidores (Figura 2) (Hibbing *et al.*, 2010). Dentro de este tipo de estrategia está la producción de sideróforos, que es un mecanismo donde el microorganismo antagonista produce metabolitos secundarios que actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar el hierro del suelo en forma Fe^{+3} (no asimilable para plantas) y reducirlo a Fe^{+2} para que pueda ser aprovechado por las plantas y limitar al fitopatógeno de este nutriente (Aguado-Santa Cruz *et al.*, 2012). Este mecanismo cumple doble función, de defensa contra fitopatógenos y de nutrición de la planta (Ramakrishna *et al.*, 2019). Otra estrategia de competencia de tipo indirecto es la resistencia sistémica inducida; mecanismo por el cual los microorganismos antagonistas, al detectar al fitopatógeno, liberan metabolitos secundarios que actúan como señales que inducen un aumento de los sistemas de defensa de la planta contra el ataque del fitopatógeno (Naik *et al.*, 2019). En síntesis, este tipo de mecanismo da a la planta protección y como consecuencia una mejora en su crecimiento.

2.3.2. Mecanismo de Competencia Directa de Microorganismos con Potencial Antifúngico

Por otra parte, en la estrategia de competencia de tipo directo, los microorganismos antagonistas producen metabolitos secundarios de naturaleza antibiótica que atacan de forma directa al fitopatógeno, controlando su población (Figura 2) (Naik *et al.*, 2019). Estos metabolitos pueden ser de naturaleza volátil y no volátil presentando diferentes modos de acción que van desde la alteración de la estructura de las membranas celulares hasta la inhibición de la síntesis de otros constituyentes celulares (Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015).

Los metabolitos volátiles (COV) son moléculas pequeñas (típicamente menos de 300 Da), caracterizadas por una baja solubilidad en agua y una alta presión de vapor que los hace disponibles en estado gaseoso en condiciones ambientales normales (1 atm de presión y 25°C) (Tilocca *et al.*, 2020). Su mecanismo de acción varía según a los COVs que pueda sintetizar el microorganismo. Por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis* SPS-41 es capaz de sintetizar una mezcla de COVs antibióticos como el 3-metil-1-butanol, el alcohol feniletílico y el 2-metil-1-butanol, entre otros. Esta mezcla provoca un cambio morfológico en las hifas del hongo *Ceratocystis fimbriata*, la destrucción de su membrana celular, induce un estrés oxidativo e interfiere con su metabolismo energético, disminuyendo la producción de acetil-CoA y piruvato, además, de disminuir el

potencial de la membrana mitocondrial y la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales provocando una disfunción de este organelo (Zhang *et al.*, 2021). Cabe añadir, que los COVs son efectivos a concentraciones muy bajas, así mismo, al ser volátiles se pueden difundir entre las partículas del suelo y propagarse en la atmósfera a grandes distancias desde su punto de generación, pudiendo ejercer su actividad inhibitoria sin requerir un contacto físico directo entre el microorganismo productor de COVs y el patógeno objetivo (Tilocca *et al.*, 2020).

También, están los metabolitos de naturaleza no volátil, como las enzimas líticas (quitinasas, proteasas, glucanasas, entre otras) que provocan la degradación directa del material de la pared celular del fitopatógeno; por ejemplo, la producción de quitinasa por *Serratia plymuthica* que inhibe la germinación de esporas y el alargamiento del tubo germinativo en *Botrytis cinérea*, mientras que la β -1,3-glucanasa sintetizada por *Paenibacillus* spp. y *Streptomyces* spp puede lisar las paredes celulares fúngicas de *Fusarium oxysporum* (Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015).

De igual modo, otros metabolitos no volátiles son los lipopéptidos cíclicos (LPCs), agrupados en tres familias representativas (surfactinas, fengicinas e iturinas), que consisten en una cadena de ácido graso unida a un anillo peptídico. Su mecanismo, generalmente se centra en afectar directamente la membrana celular de los agentes fitopatógenos, provocando la formación de poros. Este tipo de metabolitos usualmente son producidos por bacterias del género *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. velezensis*, entre otros (Falardeau *et al.*, 2013). El género *Bacillus*, también se caracteriza por producir otro tipo de metabolitos antifúngicos, como los policétidos. Es necesario subrayar que es posible que los antibióticos actúen como antimicrobianos y como moléculas señalizadoras que induzcan resistencia sistémica inducida (RSI) en plantas, ya que cualquiera de estas funciones podría beneficiar a la planta (Hibbing *et al.*, 2010). Por otro lado, la especificidad de los antibióticos producidos por diferentes microorganismos varía ampliamente, desde compuestos altamente específicos que se dirigen solo a determinadas cepas de la misma especie de fitopatógenos, hasta compuestos generalmente tóxicos que son inhibidores de una amplia gama de patógenos. La especificidad de los antibióticos sintetizados por un microorganismo en particular, se correlaciona con la gama de hábitats y la diversidad de las otras especies que estén dentro de su nicho ecológico (Hibbing *et al.*, 2010).

En ese mismo sentido, el micoparasitismo necrotrófico es un mecanismo de tipo directo y lo poseen solo hongos antagonistas a fitopatógenos, el principal representante es *Trichoderma*, el cual, al recibir señales del patógeno, empieza a crecer hacia él por quimiotropismo. Una vez en contacto con el patógeno, *Trichoderma* se enrolla alrededor y a lo largo de sus hifas y forma estructuras en

forma de gancho (apresorios) que ayudan a penetrar la pared celular del patógeno; además, libera metabolitos secundarios (enzimas líticas) que ayudan a la degradación de la pared celular (Viterbo *et al.*, 2010); por consiguiente, el daño ocasionado es mecánico y químico.

Es importante destacar que varios investigadores en la rama de biotecnología agrícola se han dedicado a estudiar microorganismos antagonistas a hongos del género *Colletotrichum*. (causantes de antracnosis), como bacterias del género *Bacillus*, hongos del género *Trichoderma*, y actinobacterias del género *Streptomyces* spp. entre otros. En ese sentido, se han desarrollado biofungicidas para tratar antracnosis como “Fungi free” (Galindo *et al.*, 2013) o “Botrybel” (Fernández *et al.*, 2004) que tratan dicha enfermedad en diversos frutos como papaya, mango, aguacate, cítricos, entre otros. Sin embargo, existen patógenos que resisten el ataque de antagonistas, como los que se encuentran en los biofungicidas comerciales. Este fenómeno podría deberse a que cada microorganismo antagonista compite de manera selectiva sólo con determinados fitopatógenos, debido a mecanismos específicos de acción del microorganismo (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

2.4. Principales Metabolitos Antifúngicos Producidos por *Bacillus* y su Papel en la Biotecnología Agrícola

La producción de estos metabolitos antifúngicos por *Bacillus* ha sido ampliamente estudiada debido a que es una alternativa sostenible para el control de enfermedades. Es preciso señalar que el género *Bacillus* es el más explotado en la biotecnología agrícola, con un 85% del total de los productos bacterianos destinados como biofungicidas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Además, cabe mencionar que de acuerdo a la FDA (Administración de drogas y alimentos de los EE.UU), dichos microorganismos, como *Bacillus subtilis*, son reconocidos como organismos GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Devi *et al.*, 2019); es decir, no representan ningún riesgo para la salud humana. Varias cepas del género *Bacillus* pueden sintetizar metabolitos antifúngicos de naturaleza no volátil y volátil; sin embargo, entre los principales metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* se encuentran los lipopéptidos cíclicos (LPCs). Por esta razón, a continuación, se presentan con mayor detalle, las características químicas y biológicas de este tipo de compuestos.

Los lipopéptidos cíclicos (LPCs) son metabolitos secundarios sintetizados por bacterias de diferentes géneros, como *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, y *Pseudomonas* (Schneider *et al.*, 2014). El género *Bacillus* sintetiza tres familias de LPCs, conocidas como surfactinas, iturinas y fengicinas; cuyos miembros, debido a su estructura, poseen una naturaleza anfifílica, lo que les confiere la capacidad de interferir con estructuras de membranas biológicas de diversos organismos (Zhao *et al.*, 2017), una propiedad clave para el control biológico (Penha *et al.*, 2020).

En este sentido, se sabe que las moléculas de las tres familias de LPCs, a altas concentraciones, pueden provocar la formación de poros en la membrana celular, mientras que a bajas concentraciones pueden inducir la apoptosis (Zhao *et al.*, 2017). Por otra parte, los LPCs también sirven de señal para el reconocimiento de patógenos y la activación de defensas por parte de la planta; es decir, promueven la resistencia sistémica inducida (RSI) (Zhao *et al.*, 2017). Los LPCs funcionan como elicitores (Figura 3) desencadenando la resistencia sistémica en la planta al activar una respuesta por la vía del ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (vía 1). Sin embargo, algunas especies pueden desencadenar la vía de señalización dependiente de ácido salicílico (vía 2), como resultado, la planta produce compuestos defensivos (Penha *et al.*, 2020)

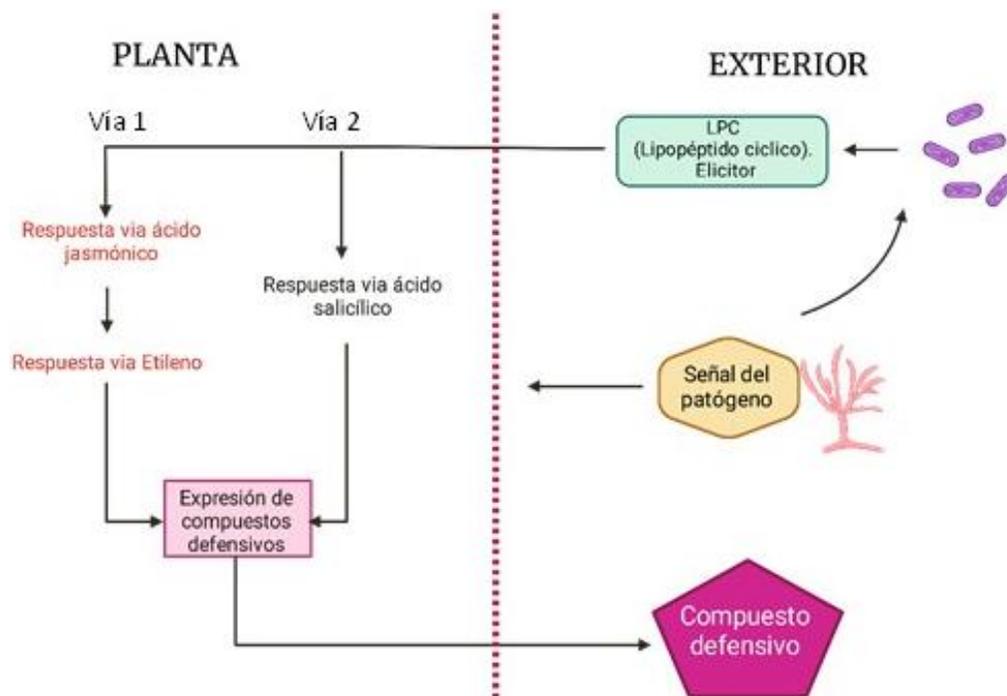


Figura 3. Inducción a resistencia sistémica de plantas por lipopéptidos cíclicos (LPCs) de *Bacillus*. Los LPCs pueden activar vías reguladas por el ácido jasmónico/etileno o por el ácido salicílico, provocando que la planta sintetice compuestos de defensa. Fuente: Penha *et al.* (2020)

Los LPCs están compuestos por una cola lipídica unida a un oligopéptido corto que se cicla para formar un anillo de lactona entre dos aminoácidos en la cadena peptídica o entre un aminoácido y un grupo amino o hidroxilo que contiene un resto de ácido graso. La diversidad estructural surge principalmente de la composición del resto de ácido graso, como la longitud de la cadena de carbono (C₆-C₁₈) y la configuración (dextrógiro y levógiro) de los aminoácidos en la porción peptídica (Schneider *et al.*, 2014); por lo cual, las isoformas de LPCs varían mucho según la cepa (Lang, 2002). Cabe agregar, que los LPCs son surfactantes que se sintetizan de forma no ribosomal mediante grandes complejos enzimáticos multifuncionales denominados péptidos sintetetasas no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés) (Chen *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2017).

Los NRPS poseen al menos cuatro dominios críticos esenciales para dirigir la síntesis no ribosomal de péptidos. El dominio de adenilación (A), que es el primer dominio catalítico que activa aminoácidos específicos; el dominio de tiolación (T), necesario para la unión de aminoácidos; el dominio de condensación (C), que ayuda en la formación de enlaces peptídicos; y finalmente, el dominio tioesterasa (TE), que contribuye en el alargamiento de la cadena y la liberación del péptido cíclico (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020).

2.4.1. Surfactinas

Las surfactinas son LPCs que tienen características tensioactivas muy potentes y su estructura típica contiene un heptapéptido que corresponde a la secuencia de aminoácidos: [L-Glu, L-Leu, D-Leu, L-Val, L-Asp, D-Leu, L-Leu]; además, el péptido se une mediante un enlace de lactona a un ácido graso β-hidroxi de 13 a 15 átomos de carbono (Figura 4) (Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017). Así mismo, dicha familia se clasifica según las variaciones en la secuencia de aminoácidos, en tres isoformas distintas (surfactinas A, B y C) (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017) (Cuadro 1). En ese sentido, se sabe que son moléculas con una parte polar, constituida principalmente por los dos residuos de aminoácidos cargados negativamente (Glu y Asp en la surfactina nativa) y un dominio apolar, formado por los grupos laterales de residuos de aminoácidos alifáticos (principalmente Leu) y la cadena de ácidos grasos. Esta estructura anfifílica es la responsable de sus propiedades físico-químicas, así como de sus actividades biológicas diversas (Théâtre *et al.*, 2021)

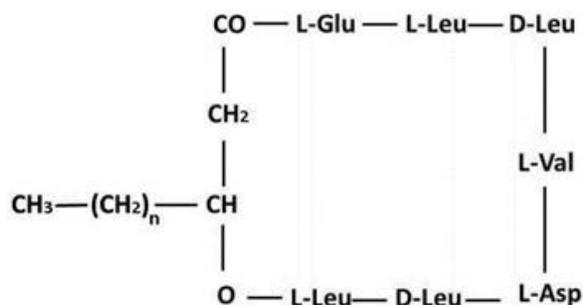


Figura 4. Diagrama de la estructura clásica de las surfactinas. Fuente: Penha *et al.* (2020)

Cuadro 1: Secuencia peptídica de las isoformas de surfactinas

Isoformas	Secuencia peptídica						
	L1	L2	D3	L4	L5	D6	L7
Surfactina A	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu
Surfactina B	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Val
Surfactina C	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile

Fuente: (Zhao *et al.*, 2017)

La síntesis de las surfactinas se realiza en dos partes, la primera es la síntesis de la fracción peptídica, etapa en la cual participan el complejo enzimático “Péptido sintetasa no ribosomal” (NRPS, por sus siglas en inglés), que son codificadas por el operón *srfA*, que consta de cuatro marcos de lectura: [*srfAA*, *srfAB*, *srfAC* y *srfAD*] (Figura.5a). Los marcos *srfAA*, *srfAB* y *srfAC* codifican para enzimas modulares responsables de integrar los siete aminoácidos en el anillo peptídico, mientras que *srfAD* codifica para una enzima reparadora de un dominio tioesterasa/aciltransferasa que regula el inicio de la biosíntesis de surfactinas (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020; Théatre *et al.*, 2021). Además, de la síntesis de la surfactinas, participa un gen regulador denominado *comS* que interviene, por un lado, en la regulación positiva de la competencia genética de la célula y por otro, forma parte del sistema de detección de quórum sensing (QS) que, a su vez, regula la producción de surfactinas (Théatre *et al.*, 2021) por lo que su biosíntesis depende de la densidad celular (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020).

La segunda parte para la producción de surfactinas es la síntesis de la cadena de ácidos grasos (Figura 5b) que procede en dos etapas: iniciación y elongación cíclica iterativa.

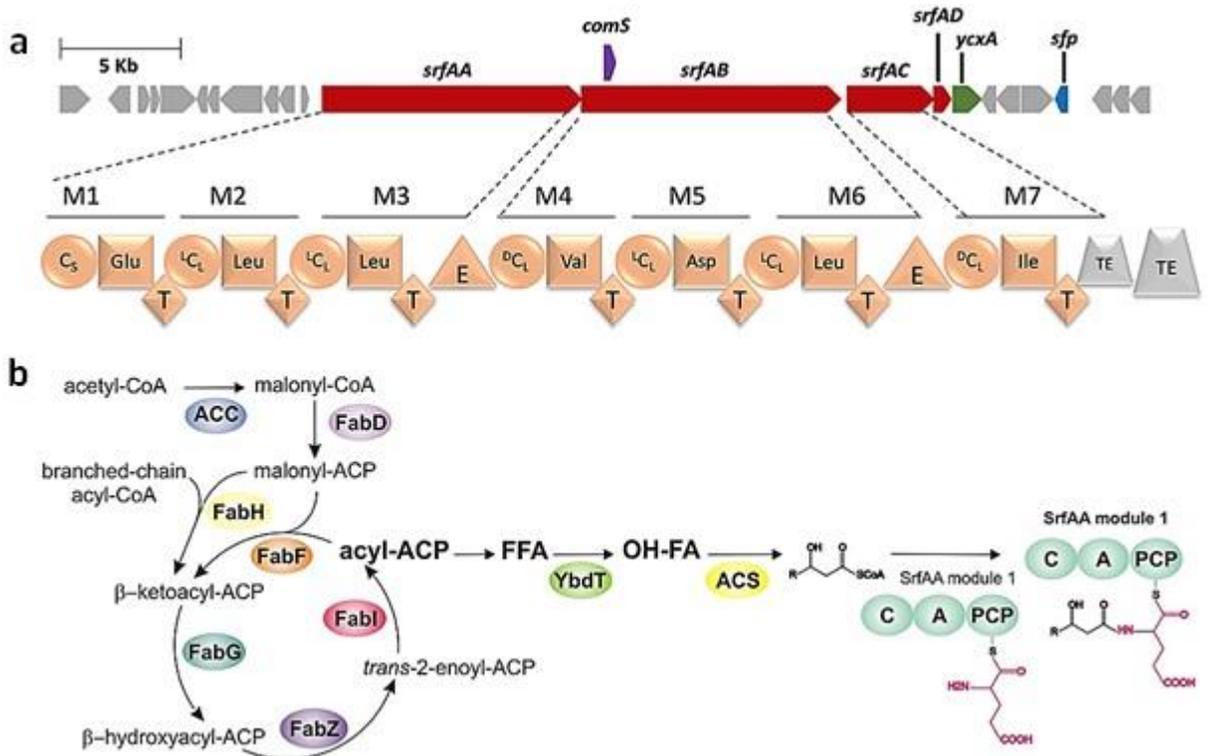


Figura 5. Síntesis de surfactina. a) Síntesis de la fracción peptídica (Adaptada de Fazle-Rabbee *et al.* (2020). b) Síntesis de la cadena de ácidos grasos (Adaptada de Théatre *et al.* (2021).

La etapa de iniciación utiliza como sustrato acetil-CoA, la cual se carboxila y se convierte en malonil-CoA, gracias al complejo enzimático acetil-CoA carboxilasa (ACC), posteriormente, el grupo malonato de la malonil-CoA se transfiere a la proteína transportadora de acilo (ACP) para producir malonil-ACP, catalizado por la enzima transacilasa, (FadD). Después se forma la primera reacción para la síntesis de la cadena de carbono naciente, la cual comprende la condensación de malonil-ACP con una acil-CoA de cadena corta (C2-C5), catalizada por una proteína transportadora de 3-ceto-acil sintasa III (FabH). A continuación, el producto de la condensación (β -cetoacil-ACP), entra en la etapa de elongación/reducción de ácidos grasos, donde la β -cetoacil-ACP se reduce para la formación de β -hidroxi-acil-ACP catalizada por la FabG reductasa. Luego, este compuesto se deshidrata, dando lugar a una trans -2-enoil-ACP, mediante la acción catalítica de la 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabZ). Por último, el ciclo se completa con una enoil-ACP reductasa, que reduce el doble enlace de la trans -2-enoil-ACP para formar acil-ACP. Una vez que se sintetizan los ácidos grasos de cadena larga, los siguientes pasos necesarios para la biosíntesis de surfactinas es la hidroxilación de los precursores de ácidos grasos, mediante una enzima del

citocromo P450 (YbdT), para su posterior incorporación a la vía biosintética de lipopéptidos. El derivado de los ácidos grasos hidroxilados y activado por la acetil-CoA sintetasa (ACS), se transfiere finalmente a la línea de ensamblaje de surfactina sintetasa, en una reacción realizada por el dominio de condensación (C) del complejo enzimático NPRS, mencionado anteriormente (Théatre *et al.*, 2021).

Las surfactinas presentan actividad antifúngica, especialmente en sinergia con fengicinas y/o iturinas (Kim *et al.*, 2010). Su mecanismo de acción consiste en insertarse en las bicapas lipídicas del fitopatógeno, solubilizando la fase fluida de fosfolípidos y modificando la permeabilidad de la membrana mediante la formación de canales, con un mecanismo similar al de los detergentes (Zhao *et al.*, 2017). Además, se ha reportado en *Bacillus velezensis* que la formación de biopelículas y una mejor colonización de la rizósfera depende de la producción de surfactinas (Al-Ali *et al.*, 2018).

2.4.2. Iturinas

Las iturinas, al igual que las surfactinas, son lipoheptapéptidos, con una secuencia de aminoácidos que correspondiente a: [L-Asn; D-Tyr; D-Asn; L-Gln; L-Pro; D-Asn; L-Ser]. La serina de la séptima posición está unida a un residuo β -aminoácido, y este a su vez unido a una cadena de ácidos grasos de 14 a 17 átomos de carbono (Figura 6) (Zhao *et al.*, 2017). Dentro de la familia de las iturinas existen diferentes isoformas u homólogos, los cuales se especifican en el Cuadro 2. Las iturinas, además de tener diferencias en la cadena peptídica, tienen diferentes cadenas de ácidos grasos. De esta familia, la molécula más representativa es la iturina A, la cual tiene 8 isoformas (Figura 7), todas con actividad antifúngica (Wan *et al.*, 2021). Así mismo, dentro de la familia de iturinas también están la bacilomicina D, F y L, así como la bacilopeptina y micosubtilina (Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017).

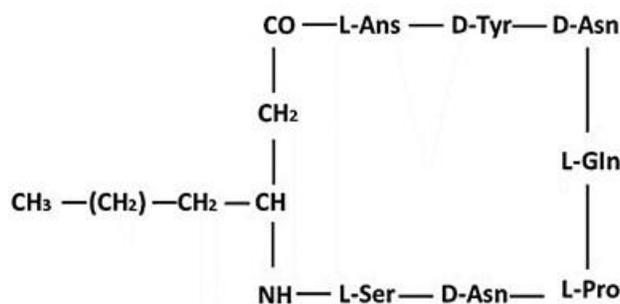


Figura 6. Diagrama de la estructura clásica de las iturinas. Fuente: Penha *et al.* (2020)

Cuadro 2. Secuencia peptídica de las isoformas de iturinas

Isoformas	Secuencia peptídica						
	L1	D2	D3	L4	L5	D6	L7
Iturina A	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser
Iturina C	Asp	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser
Iturina D	Asp	Tyr	Asp	Gln	Pro	Asn	Ser
Bacilomicina D	Asp	Tyr	Gln	Pro	Glu	Ser	Thr
Bacilopeptina	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Ser	Thr
Micosubtilina	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Ser	Asn

Fuente: Zhao *et al.* (2017)

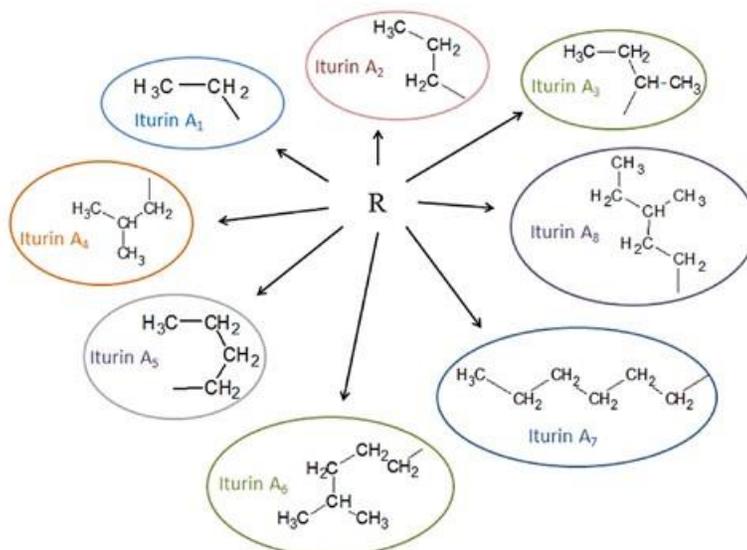


Figura 7. Homólogos de iturina-A. (R, significa la estructura peptídica). Fuente: Wan *et al.* (2021)

Respecto a la biosíntesis de estas moléculas, al igual que las surfactinas, también se realizan mediante los complejos enzimáticos NPRS (Wan *et al.*, 2021). Por ejemplo, la síntesis de bacilomicina se basa en el operón *bmy* que comprende cuatro genes: (*bmyD*, *bmyA*, *bmyB* y *bmyC*). A su vez, la regulación positiva para la activación transcripcional del promotor *bmy* está regulada por: DegU, DegQ, ComA y dos factores sigma (σ_B y σ_H) (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020). En cuanto al mecanismo de acción antifúngica, en general actúan de un modo similar a las surfactinas. Por ejemplo, la iturina A, cambia la permeabilidad de la membrana celular fúngica al interactuar con los esteroides provocando daño celular. Otra molécula antifúngica es la bacilomicina D que causa alteraciones morfológicas en las membranas citoplasmáticas y las paredes celulares de las hifas y conidios, según se observaron en los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018; Rabbee *et al.*, 2019). Además, la bacilomicina D provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en última instancia, desencadena la lisis celular (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020). También, se ha reportado que induce la resistencia sistémica inducida en plantas (Jin *et al.*, 2020). Por su parte, la bacilomicina L también tiene una fuerte actividad antifúngica y actúa principalmente alterando la membrana fúngica del patógeno, además que interactúa con organelos intracelulares (Zhao *et al.*, 2017). Sin embargo, se sabe que no todas las bacilomicinas tienen la misma actividad antifúngica, si no que varía en función de la longitud de la cadena lateral de ácidos grasos (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018). Así mismo, la micosubtilina también tiene actividad antifúngica contra levaduras y hongos sensibles, inhibiendo la síntesis de ergosterol presente en sus membranas celulares (Wan *et al.*, 2021).

2.4.3. Fengicinas

Las fengicinas son otro tipo de moléculas del complejo lipopeptídico, que se componen de una cadena peptídica de diez aminoácidos [L-Glu; D-Orn; L-Tyr; D-Thr; L-Glu; D-Ala; L-Pro; L-Gln; L-Tyr; L-Ile], de los cuales, la Tyr en la posición 3, está unida a la Ile de la posición 10 para formar un péptido cíclico a través de un enlace tipo lactona. A este, se le une una cadena de ácido graso β -hidroxi que puede ser saturado o insaturado (Figura 8) (Penha *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2017).

fluidifica la monocapa interactuando parcialmente con las moléculas presentes. En una mayor concentración, la fengicina puede disolver completamente los lípidos, provocando necrosis (Lu *et al.*, 2021). Así mismo, la fengicina promueve la condensación de cromatina, la acumulación de ROS, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial y rupturas en la cadena de ADN (Zhao *et al.*, 2017).

Por otro lado, los hallazgos de la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) sugirieron que el tratamiento de las células hifales con fengicina condujo a la destrucción ultraestructural de las hifas patógenas y la pérdida del citoplasma, la membrana plasmática o la integridad de la membrana celular, lo que eventualmente resultó en la lisis celular (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020). Finalmente, al igual que otros LPCs, se ha reportado que las fengicinas también actúan como elicitores de la resistencia sistémica inducida en plantas (Sur *et al.*, 2018).

2.5. *Bacillus velezensis*: Aplicación en la Biotecnología Agrícola

2.5.1. *Bacillus velezensis*: Generalidades

Bacillus velezensis es una bacteria esporulante, aerobia, gram positiva, de morfología bacilar, con un crecimiento óptimo a pH neutro y a temperaturas entre los 30 y 45 °C (especie mesófila). (Rabbee *et al.*, 2019; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Fue descrita por primera vez por Ruiz-García *et al.* (2005), como una bacteria productora de tensoactivos; aislada en el río Vélez en Málaga, al sur de España (a la cual atribuye el nombre). Las pruebas fenotípicas y de análisis filogenético determinaron que dicha bacteria estaba relacionada con *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Con la hibridación ADN-ADN demostraron que la nueva cepa poseía menos del 20% de similitud con otras especies de *Bacillus*: por lo tanto, la clasificaron como una nueva especie.

Asimismo, en una revisión sobre análisis filogenéticos de *B. velezensis*, se muestra que se encuentra dentro el conjunto de especies denominado “complejo *B. subtilis*”, que incluye 20 especies estrechamente relacionadas (Mullins *et al.*, 2020). Este complejo a su vez se divide en cuatro

grupos monofiléticos (clados): el clado I, nombrado “*B. subtilis*”, clado II denominado “*B. amyloliquefaciens*”, clado III “*Bacillus licheniformis*”, y el clado IV “*Bacillus pumilus*” (Fan *et al.*, 2017; Mullins *et al.*, 2020). Hay que resaltar que el clado II comprende tres especies estrechamente relacionadas: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* y *Bacillus siamensis* (Figura 9). (Fan *et al.*, 2017; Mullins *et al.*, 2020). Esto implica que la diferenciación e identificación molecular entre estas especies es complicada, por lo que las técnicas de biología molecular convencionales que se utilizan para este fin no son eficaces.

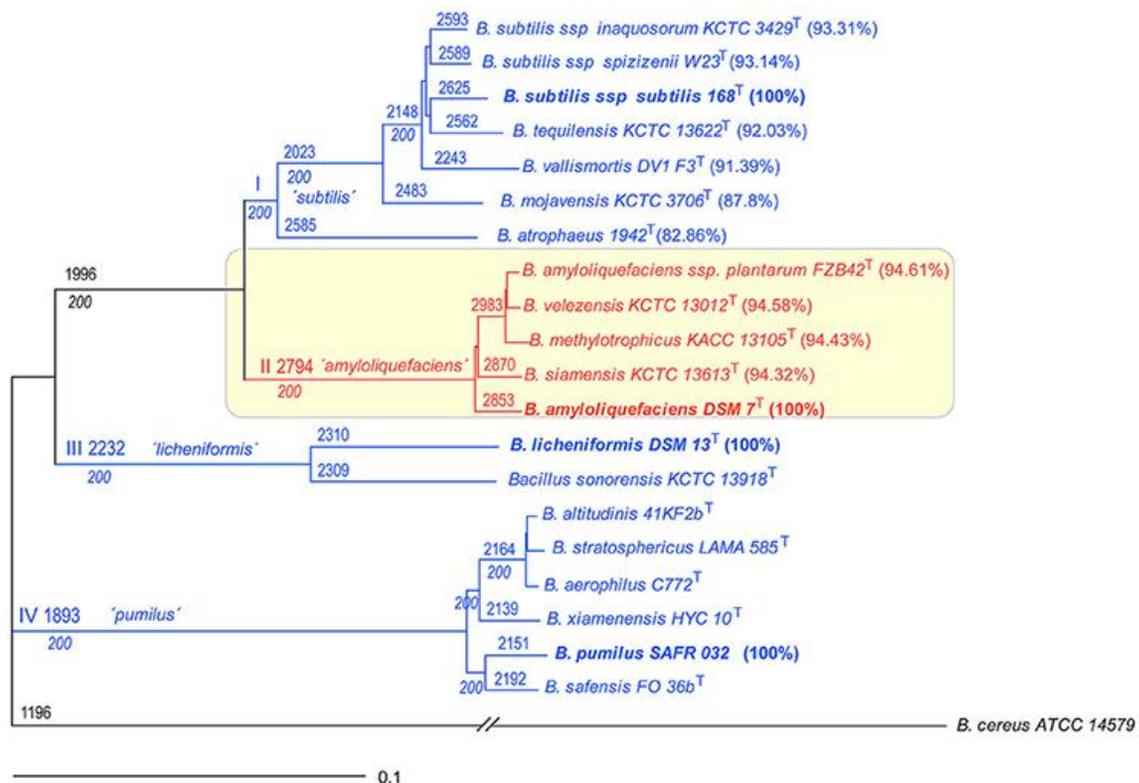


Figura 9. Filogenia del complejo de especies de *Bacillus subtilis* basado en cepas representantes. Fuente: Fan *et al.* (2017). Las letras romanas en los puntos de ramificación designan los cuatro clados.

En ese sentido, Chun *et al.* (2019) realizaron comparaciones de los genomas de *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis* y *B. velezensis*, encontrando que las características genómicas y metabólicas eran similares; sin embargo, también lograron encontrar características específicas de cada especie. Determinaron que los genes relacionados con el metabolismo energético están más

enriquecidos en *B. amyloliquefaciens*, mientras que los genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios de defensa están más enriquecidos en *B. velezensis*. A pesar de la gran similitud genómica de las especies del clado II, se sabe que *B. amyloliquefaciens* y *B. siamensis* no asociadas a plantas contribuyen solo entre el 4% y el 5% de la capacidad del genoma para la síntesis de compuestos antimicrobianos; sin embargo, *B. velezensis* dedica el 10% de su genoma a la síntesis de moléculas antimicrobianas (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020). De igual manera, Devi *et al.* (2019) analizaron treinta y un genomas de diferentes especies de *Bacillus* (Figura 10), observando que *B. velezensis* posee una cantidad mayor de genes que codifican para metabolitos antimicrobianos, en comparación con las otras especies de *Bacillus*, cualidad que le confiere un potencial biotecnológico elevado.

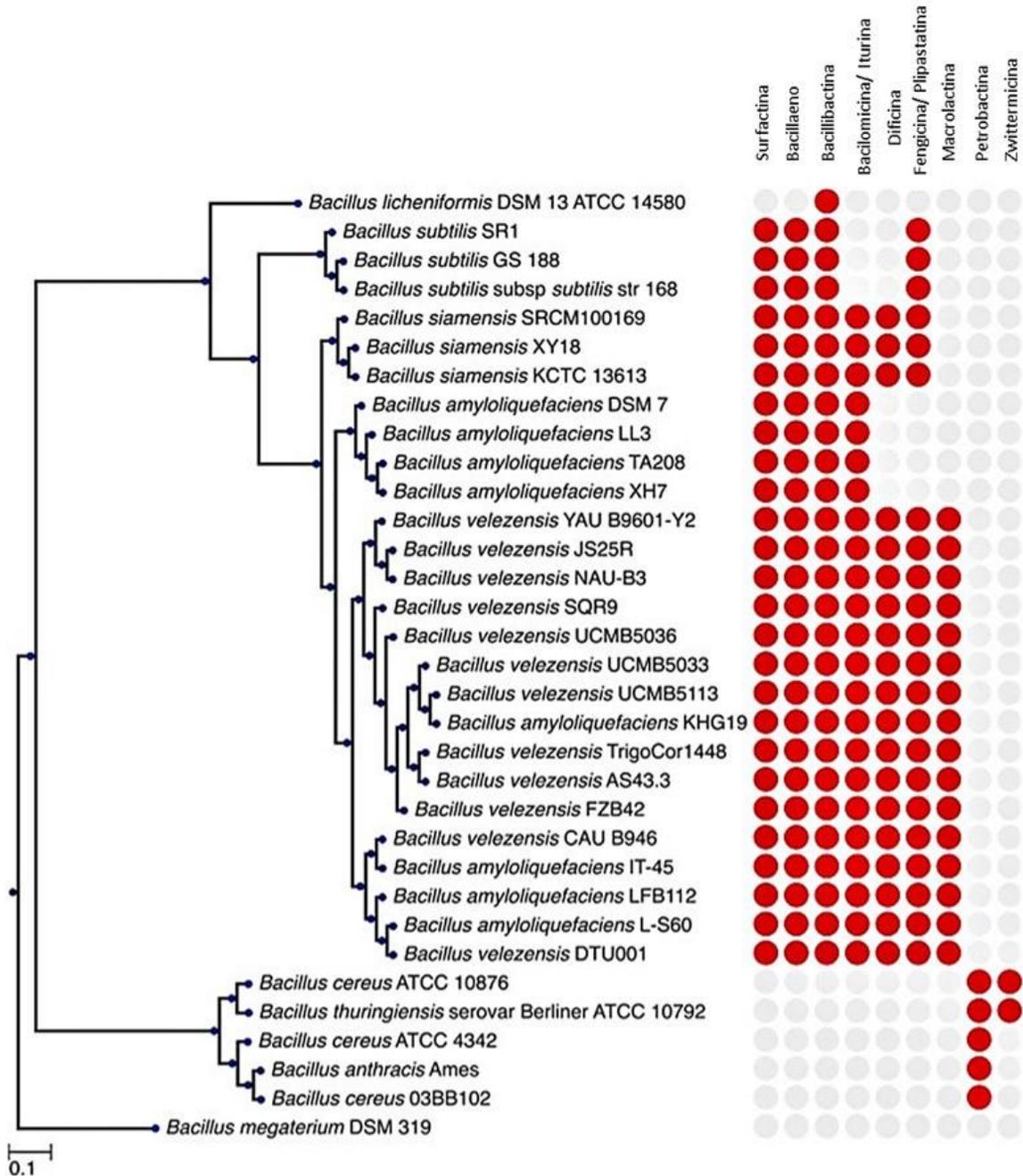


Figura 10 Presencia y ausencia de grupos de genes biosintéticos de *Bacillus* mostrados en su árbol filogenético Fuente: Devi *et al.* (2019)

2.5.2. Diversos Usos de *Bacillus velezensis* en la Agricultura

Bacillus velezensis tiene diversos usos en la agricultura, siendo el principal el de control biológico

de enfermedades. Esta bacteria se ha utilizado para tratar diferentes cultivos, como tomate, pepino, pimiento, fresa, entre otros. Además, se ha demostrado su eficacia en el control de diversas enfermedades como la pudrición de la raíz, la podredumbre del tallo, la mancha bacteriana, la antracnosis, entre otras (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020). Además de su uso en el control de enfermedades, *Bacillus velezensis* también puede promover el crecimiento de las plantas, aumentando su resistencia y mejorando la calidad del cultivo, debido a ciertos metabolitos que sintetiza, y que las plantas aprovechan para su desarrollo (Ali *et al.*, 2022). *Bacillus velezensis* tiene cada vez un uso dentro la biotecnología agrícola, derivado de su gran versatilidad metabólica que le permite llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos. (Rabbee *et al.*, 2019).

En ese sentido, se han reportado cepas de *B. velezensis* que permiten tratar la antracnosis tales como: *B. velezensis*: AK-0 (Kim *et al.*, 2021), NSB-1 (Nam *et al.*, 2012), TS3B-45 (Reyes-Estebanez *et al.*, 2020), HN-2 (Jin *et al.*, 2020) y CE-100 (Choub *et al.*, 2021), las cuales demostraron mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* en manzana, fresa, mango y nueces, respectivamente, que son antagonistas a *C. gloeosporioides*, con un alto porcentaje de inhibición en campo. En general, *Bacillus velezensis* es una herramienta valiosa en la agricultura y el control biológico de enfermedades, ya que es eficaz y respetuosa con el medio ambiente.

2.5.3. Producción de Metabolitos por *B. velezensis* con Capacidad de Control Biológico Directo e Indirecto

Se ha reportado que *B. velezensis* puede presentar varios mecanismos de competencia, además producen diferentes metabolitos (Rabbee *et al.*, 2019). *Bacillus velezensis* posee en su genoma genes que codifican para una gran variedad de compuestos antimicrobianos; sin embargo, los que mayormente se han reportado se observan en la Figura 11:

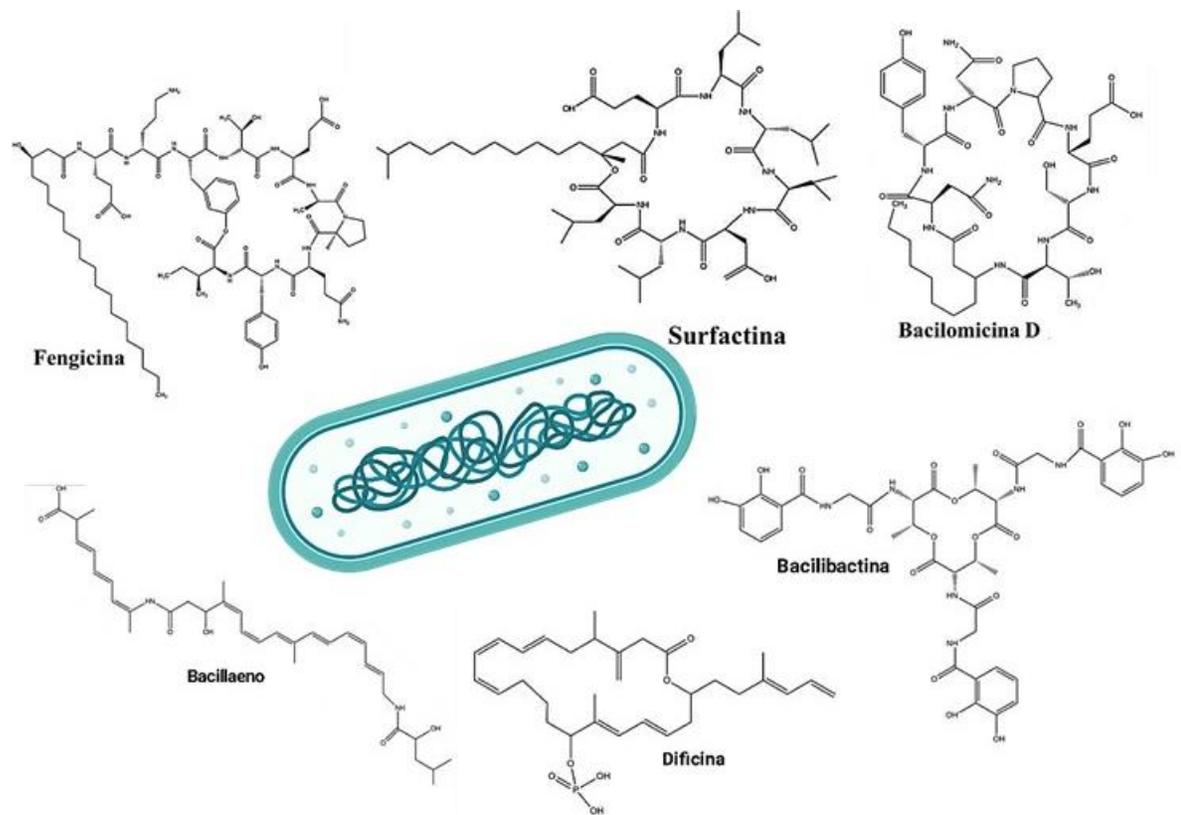


Figura 11 Compuestos antimicrobianos sintetizados por *B. velezensis*. Fuente: (Fazle-Rabbee *et al.*, 2020; Rabbee *et al.*, 2019)

Por ejemplo, la cepa HN-2 de *B. velezensis*, antagonista a *C. gloeosporioides*, es capaz de sintetizar bacilomicina D, un péptido cíclico que provoca la perforación de la membrana celular del hongo debido a los grupos hidrófobos de la molécula que interfieren con los fosfolípidos y colesterol de la membrana; además de provocar cambios estructurales en conidios e hifas (Jin *et al.*, 2020). También se ha reportado que las cepas 11-5 (antagonista a *Magnaporthe oryzae*), WRB-ZX-001 y WRB-ZX-002 (antagonistas a *Aspergillus fumigatus*) sintetizan iturinas A-C14 y C15 que provocan la inhibición de conidios y de la formación del apresorio (Xiong *et al.*, 2022; Zongwang *et al.*, 2020). Por su parte, Park *et al.* (2019) en su estudio de la cepa GH1-13, antagonista a varios hongos fitopatógenos como *F. fujikuroi*, *B. oryzae* y *C. gloeosporioides*, identificaron surfactinas con diferentes longitudes de cadenas lipídicas que provocan crecimiento anormal del micelio y formación de protuberancias del fitopatógeno. También, Jumpathong *et al.* (2022) reportaron a la cepa de *B. velezensis* PW192, como productora de fengicina A y fengicina B que pueden unirse a las capas lipídicas y alterar la estructura y la permeabilidad de las membranas celulares de *C.*

gloeosporioides y *C. musae*.

Asimismo, se han reportado cepas de *B. velezensis*, capaces de sintetizar diferentes lipopéptidos como iturinas y fengicinas, tal el caso de la cepas KLP2016 y BA-26, productoras de iturina A y 23 isoformas de fengicinas, que funcionan de manera sinérgica, aumentando su potencial antifúngico (Meena *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). Por otra parte, la cepa XT1 CECT 8661, capaz de sintetizar fengicina A y surfactina C, los cuales provocaron alteraciones morfológicas llamativas en las estructuras de resistencia en *Botrytis cinérea* (Toral *et al.*, 2018). De igual forma, se han reportado cepas de *B. velezensis* capaces de sintetizar compuestos pertenecientes a las tres familias de lipopéptidos cíclicos (LPC) surfactinas, iturinas y fengicinas, tal el caso de las cepas DTU001 y HC6 (Devi *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). Por otro lado, se reportó que la cepa KRF-001 es capaz de producir seis diferentes tipos de iturina A, fengicinas A-B y surfactinas (Kim *et al.*, 2020). La cepa FZ06 también sintetiza dos isoformas de surfactina, dos de iturinas y dos fengicinas (Li *et al.*, 2020). Los estudios mencionados coinciden en que la presencia de las tres familias de lipopéptidos ejercen sinergia, para mejorar la actividad antifúngica.

Por otro lado, se ha reportado que la cepa AR1 de *B. velezensis* sintetiza metabolitos antifúngicos no volátiles atípicos, como el succinato de metilo que ejerce antibiosis contra *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinérea*, además, sintetiza 5- N-tirosinilornitina, otro antifúngico capaz de controlar a *Monilinia fructicola* y *Colletotricum gloeosporioides* (Regassa *et al.*, 2020, 2021). No obstante, se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos antifúngicos y sus efectos en la salud humana y el medio ambiente.

De la misma forma, se ha reportado que la cepa CE-100 de *B. velezensis*, antagonista de *C. gloeosporioides*, sintetiza enzimas líticas (quitinasa, proteasa y β -1,3-glucanasa) y un tetrapéptido cíclico con actividad antifúngica identificado como ciclo-(prolil-valil-alanil-isoleucilo) que causan la degradación de la pared celular de las hifas, inhibición de la germinación de esporas e inhibición de la elongación del tubo germinativo y de la formación de apresorios (Choub *et al.*, 2021; Choub *et al.*, 2021). La misma cepa, también, es capaz de sintetizar un dipéptido cíclico antifúngico identificado como ciclo-(D-fenilalanil-D-prolilo) que provoca una deformación grave y superficies arrugadas en las hifas y conidios de *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*, 2022). Cabe agregar, que la cepa CE 100 es capaz de sintetizar dos metabolitos volátiles antifúngicos volátiles (COVs), identificados como 5-nonilamina y ácido 3-metilbutanoico; sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción (Choub *et al.*, 2022). Otra cepa atípica es la G341, antagonista de *Botrytis*.

cinerea, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae* y *Phytophthora capsici*, que es capaz de sintetizar lipopéptidos cíclicos como bacilomicina L y fengicina A, además de COVs antifúngicos, como el dimetilsulfóxido, 1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), todos estos metabolitos de naturaleza antibiótica (Lim *et al.*, 2017).

Otras cepas capaces de producir COVs, tales como el diacetilo, benzaldehído, 2-heptanona y alcohol isoamílico con capacidad antibiótica contra *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Penicillium italicum* y *Botrytis cinérea* son las cepas BUZ -14 e I3 (Calvo *et al.*, 2020). Asimismo se reportó que la cepa ZSY-1, antagonista de *Alternaria solani*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum f. sp. capsicum* y *Colletotrichum lindemuthianum*, tiene la capacidad de sintetizar 29 COVs antifúngicos, de los cuales los más potentes fueron la pirazina (2,5-dimetil), el benzotiazol, el fenol (4-cloro-3-metil) y el fenol-2,4-bis (1,1-dimeteleto) (Gao *et al.*, 2017). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de la mayoría de estos compuestos.

Dentro del tipo de competencia indirecta, se sabe que algunas cepas de *B. velezensis* cumplen con la producción de sideróforos y el cebado (priming) del sistema de resistencia sistémica inducida. Por ejemplo, la cepa Bvel1 antagonista a *Botrytis cinerea*, además de sintetizar varios lipopéptidos como iturina A2, surfactina -C13 y -C15, también produce oxidificina o dificina, L-dihidroanticapsina, ácido azelaico (antifúngico el cual se desconoce el mecanismo de acción) y bacilibactina que es un metabolito que actúa como sideróforo (Nifakos *et al.*, 2021). Otra cepa de *B. velezensis* denominada FKM10, antagonista de *Fusarium verticillioides*, fue reportada como productora de sideróforos y enzimas líticas de pared celular de hongos, como, la proteasa extracelular *aprE*, la peptidasa de *Bacillus bpr* y una β -glucanasa. Además, esta cepa fue capaz de mejorar el crecimiento de *Malus hupehensis* (Manzano silvestre de Hupeh), por lo cual es considerada como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2020).

Al secuenciar el genoma de esta bacteria se detectaron genes que codifican para la síntesis de bacilisina, amilociclina, dificidadina, fengicina, bacilomicina, bacilano, macrolactina, lantibiótico y surfactina; sin embargo, la bacteria no logra expresar todos los genes al no observar producción de dificidadina, macrolactina, surfactina y fengicina (Wang *et al.*, 2020). Al igual que la anterior, la cepa de *B. velezensis* NKG-2, produce sideróforos, útiles para para el crecimiento de las plantas en condiciones de limitación de hierro. Asimismo, Myo *et al.*, (2019), reportaron que esta misma cepa produce ácido indol acético (AIA), una fitohormona que favorece la formación de raíces laterales

en las plantas y COVs, concluyendo que la promoción del crecimiento de las plantas probablemente esté impulsada por la producción de COVs, AIA, así como de sideróforos (Myo *et al.*, 2019).

Por su parte, Dhouib *et al.* (2019), reportaron que la cepa C2 de *B. velezensis*, antagonista de *Verticillium dahliae*, produce enzimas líticas (proteasa, quitinasa y β -glucanasa), COVs (tetradecano, ácido bencenoacético, benzaldehído, 1-deceno y alcohol feniletílico), un sideróforo y ácido indol-3-acético (AIA) que estimula el crecimiento de raíces laterales y la actividad de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato en el suelo, lo que a su vez puede aumentar la disponibilidad de fosfato para las plantas. Por lo tanto, el AIA puede tener un efecto indirecto en la solubilización de fosfatos en la naturaleza.

Hasta este punto de la investigación, el principal mecanismo de competencia y los metabolitos antifúngicos de la cepa de estudio *Bacillus* sp. IG1244 permanecían desconocidos. Sin embargo, comprender estos aspectos resulta crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de control de enfermedades en cultivos. Investigaciones centradas en la identificación y caracterización de los mecanismos de antagonismo y los metabolitos producidos por *Bacillus* sp. IG1244 podrían proporcionar información valiosa para el diseño de biofungicidas y la implementación de prácticas de manejo integrado de plagas. Estos avances contribuirán a fortalecer las estrategias de control biológico y reducir la dependencia de biofungicidas de síntesis química, promoviendo así la sustentabilidad y la salud de los sistemas agrícolas.

3. HIPÓTESIS

La cepa de *Bacillus* sp. IG1244 produce varias isoformas de las familias de fengicinas e iturinas, las cuales actúan como antibióticos para controlar el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae*, causantes de antracnosis en aguacate.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar los metabolitos producidos por la cepa de *Bacillus* sp. IG1244 implicados en el mecanismo de antibiosis para el control biológico de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae*, causantes de antracnosis en aguacate.

4.2. Objetivos Específicos

- Validar la identidad de los microorganismos empleados por técnicas moleculares.
- Evaluar el efecto antifúngico de *Bacillus* sp. IG1244 frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae*.
- Identificar el tipo de metabolitos (volátiles o no volátiles) con actividad antifúngica para *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae* producidos por *Bacillus* sp. IG1244.
- Aislar la(s) fracción(es) bioactiva(s) (antifúngica) a partir de una búsqueda biodirigida a partir de los caldos de cultivo de *Bacillus* sp. IG1244.
- Establecer las características fisicoquímicas del (los) metabolito(s) secundarios contenidos en la(s) fracción(es) activa(s) obtenidas a partir de caldos de cultivo de *Bacillus* sp. IG1244.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Comprobación de la Identidad de los Microorganismos de Estudio

5.1.1. *Bacillus* sp. IG1244

La cepa de *Bacillus* IG1244 se reactivó y se cultivó por estriado en medio agar Luria Bertani (LB) (Bioxon), después las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para su identificación molecular, se extrajo su ADN mediante el kit DNeasy PowerSoil Pro-Kit (Qiagen). Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR de las regiones: 16SrRNA (gen universal), subunidad α de la ADN girasa (*gyrA*), subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*), subunidad larga de la chaperonina (*groEl*) y la fosforribosil-aminoimidazol-carboxamida formiltransferasa (*purH*). La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de cada una de las subunidades se detalla en el Cuadro 4. Las condiciones estándar para la amplificación por PCR fueron: 1) fase inicial, un ciclo a 95°C por 5 min; 2) desnaturalización a 95°C por 40 s, alineamiento a 55°C por 1min, y extensión a 72°C por 2min (35 ciclos); 3) elongación final, un ciclo a 72°C por 4 min (Ben-Gharsa *et al.*, 2021; Rooney *et al.*, 2009). La amplificación se realizó en un termociclador QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific). El volumen final de la reacción fue de 33 μ l con 15 μ l de Taq polimerasa SYBR Green Supermix (Bio Rad), 3 μ l del cebador (f), 3 μ l del cebador (r), 6 μ l de agua destilada estéril y 6 μ l de ADN. Luego los amplicones resultantes de PCR fueron secuenciados por la empresa MACROGEN USA.

Posteriormente se realizó un análisis multilocus, con el objetivo de estudiar en conjunto las cuatro regiones genéticas antes mencionadas y poder caracterizar la especie con mayor precisión, para lo cual, se utilizaron las secuencias en formato FASTA, se eliminaron los gaps y se obtuvo la secuencia consenso para cada región, utilizando el programa BioEdit 7.0. A continuación, se realizó un análisis comparativo con la base de datos del NCBI mediante el uso de la herramienta BLAST, lo que permitió identificar la similitud de cada secuencia con otras secuencias disponibles en la base de datos. Después, se procedió a alinear secuencias de cada región utilizando la

herramienta ClustalW, lo que permitió comparar y evaluar la similitud entre las secuencias. Con todas las secuencias de cada región alineadas, se realizó una concatenación en Bioedit 7.0, lo que permitió obtener una única secuencia que contenía la información de todas las secuencias alineadas. Finalmente, utilizando la secuencia concatenada, se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA 11.0 mediante el método de Neighbor-Joining. Este árbol filogenético representó la relación evolutiva entre las secuencias de cada región y permitió realizar comparaciones y análisis adicionales.

Cuadro 4 Cebadores para la identificación de *Bacillus* sp. IG1244

Región	Primer	Secuencia del primer	Referencia
16S rRNA	27F	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Rooney <i>et al.</i> (2009); Sherzad <i>et al.</i> (2020)
	1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT	
gyrA	gyrA-42f	5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	Ben-Gharsa <i>et al.</i> (2021);
	gyrA-1066r	5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT	
rpoB	rpoB-2292f	5'- GACGTGGGATGGCTACAAC	Rooney <i>et al.</i> (2009)
	rpoB-3354r	5'- ATTGTCGCCTTTAACGATGG	
groEL	groEL-550f	5'- GAGCTTGAAGTKGTTGAAGG	
	groEL-1497r	5'- TGAGCGTGTWACTTTTGTWG	
purH	purH-70f	5'- ACAGAGCTTGGCGTTGAAGT	
	purH-1013r	5'- GCTTCTTGGCTGAATGAAGG	

5.1.2. Determinación de la Huella Genómica de *Bacillus* sp. IG1244 Basada en BOX-PCR

Para determinar la huella genómica de *Bacillus* sp. IG1244, se realizó un análisis de PCR basado en secuencias de elementos repetitivos (BOX-PCR) mediante la metodología descrita por Versalovic *et al.* (1994) con las siguientes modificaciones. Se utilizaron 5 bacterias identificadas molecularmente como *B. velezensis* I; *B. velezensis* II; *B. subtilis* C5; *B. subtilis* I6; y *B. amyloliquefaciens* IG1201. A todas las bacterias mencionadas se les realizó una extracción de ADN mediante el kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Posteriormente se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos BOX, con el cebador BOXA1R, correspondiente a la secuencia CATACGGCAAGGCGACGCT, bajo siguientes condiciones: 1) fase inicial, un ciclo a 95 °C por

5 min; 2) desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 51 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 3 min (35 ciclos); 3) elongación final, un ciclo a 72 °C por 10 min y 4) un último ciclo a 10 °C por 5 min (López *et al.*, 2020; Versalovic *et al.*, 1994) en un termociclador QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific). El volumen final de la reacción fue de 24 µl con 10 µl de Taq polimerasa SYBR Green Supermix (Bio Rad), 2 µl del cebador, 6 µl de agua destilada estéril y 6 µl de ADN. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en tampón TAE 1X durante 3,5 h a 65 V, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Al término de la corrida, el gel se visualizó en un fotodocumentador.

Para el análisis filogenético se seleccionaron todas las bandas claramente identificables, seguido de una matriz de agrupamiento con el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean), utilizando el paquete de software VisionWorksLS Analysis Software.

5.1.3. *Colletotrichum* spp.

Las cepas de estudio del género *Colletotrichum* fueron aisladas por el grupo de investigación de Innovak Global, a partir de aguacates (*Persea americana*) infectados con antracnosis. Las cepas fueron reactivadas y cultivadas en medio agar papa dextrosa (PDA) (Bioxon) a 28 °C. Para verificar su identidad, se llevó a cabo la extracción de ADN mediante el kit DNeasy PowerSoil Pro-Kit (Qiagen). Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR de las regiones ITS (gen universal) y β-tubulina (gen específico para identificar especies de *Colletotrichum*) (la secuencia de los cebadores se detalla en el Cuadro 5). Se siguieron las condiciones de los ciclos de amplificación descritas en el estudio de Noor *et al.* (2018), con las siguientes modificaciones: 1) fase inicial, un ciclo a 96 °C por 3 min; 2) desnaturalización a 96 °C por 30 s, alineamiento a 57 °C por 45 s, y extensión a 72 °C por 45 s (40 ciclos); 3) elongación final, un ciclo a 72 °C por 7 min y 4) un último ciclo a 10 °C por 5 min.

La amplificación se realizó en un termociclador QuantStudio™ 3. (Thermo Fisher Scientific). El volumen final de la mezcla fue de 36 µl con 15 µl de Taq polimerasa SYBR Green Supermix (Bio Rad), 3 µl del cebador (f), 3 µl del cebador (r), 6 µl de agua destilada estéril y 9 µl de ADN. La secuenciación de los fragmentos de la PCR fue realizada por la empresa MACROGEN USA.

Finalmente, la asignación de identidad se realizó mediante un análisis comparativo de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST, además, se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA 11 mediante el método de Neighbor-Joining. Este árbol filogenético representó la relación evolutiva y permitió realizar comparaciones.

Cuadro 5 Cebadores para la identificación de *Colletotrichum* spp.

Región	Primer	Secuencia del primer	Referencia
ITS	ITS1f	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4r	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC	
β- tubulina	Bt2af	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass <i>et al.</i> (1995)
	Bt2br	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	

5.2. Determinación de la Actividad Antifúngica de *Bacillus* sp. IG1244

Para establecer la actividad antifúngica se realizó un enfrentamiento de *Bacillus* sp. IG1244 con cada uno de los hongos fitopatógenos del estudio (*C. gloeosporioides*, *C. kahawae* y *C. acutatum*). En el ensayo se utilizaron cajas Petri normales con agar PDA (Bioxon) preparado a 39 g/L y esterilizado a 121°C por 20 min. En un extremo de la caja se hizo un estriado con *Bacillus* sp. IG1244, y en el otro, se colocó un botón del hongo de 5mm de diámetro que se cortó con un sacabocados de un cultivo en caja de Petri del hongo a evaluar (Figura 12). Se realizaron cultivos controles de *Bacillus* sp. IG1244 y de los hongos fitopatógenos solos. Cabe agregar, que se hicieron dos réplicas biológicas, cada una con tres repeticiones técnicas. Los cultivos con *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae* se incubaron por 8, 28 y 14 días respectivamente a una temperatura de 28°C. Al terminar el periodo de incubación se observó el micelio de los hongos enfrentados y no enfrentados en un microscopio invertido VE-403 (Motic), con tinción de azul de lactofenol.

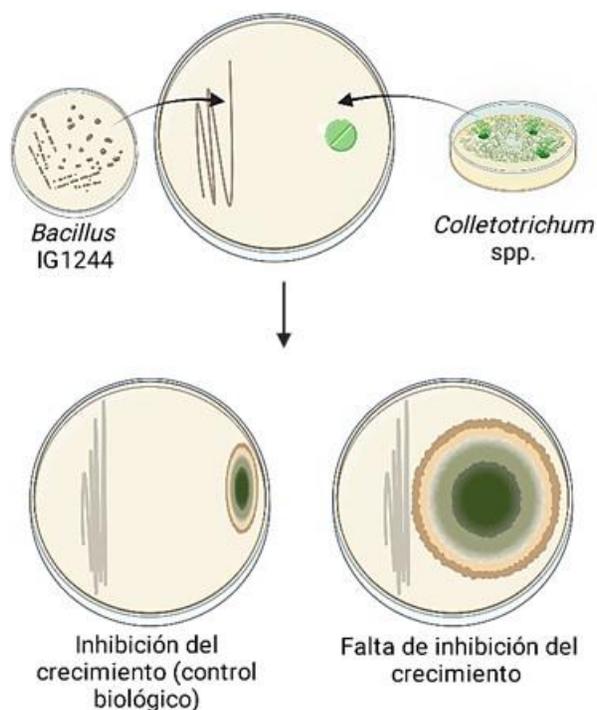


Figura 12 Ensayo para la determinación de la actividad antifúngica

5.3. Metabolitos Volátiles o No Volátiles con Actividad Antifúngica de *Bacillus* sp. IG1244

La evaluación de la naturaleza volátil o no volátil de los metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* IG1244, se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Pozo *et al.* (2004), con las modificaciones que se indican a continuación. El ensayo se basó en un enfrentamiento de *Bacillus* sp. IG1244 con cada uno de los hongos fitopatógenos del estudio (*C. gloeosporoides*, *C. kahawae* y *C. acutatum*) en cajas Petri con división doble, conteniendo agar PDA (Bioxon) (39 g/L). En un sector de la caja se realizó un estriado de *Bacillus* sp. IG1244 y en el otro, se colocó un botón del hongo de 5mm de diámetro que se cortó con un sacabocados de un cultivo en la caja de Petri del hongo a evaluar (Figura 13). Además, se realizaron cultivos control de *Bacillus* sp. IG1244 y de los hongos fitopatógenos. Se hicieron dos réplicas biológicas, con tres repeticiones técnicas cada una. Los cultivos con *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae* se incubaron por 8, 28 y 14 días, respectivamente, a una temperatura de 28°C. Una posible inhibición del crecimiento del hongo se consideró como respuesta positiva para metabolitos volátiles.

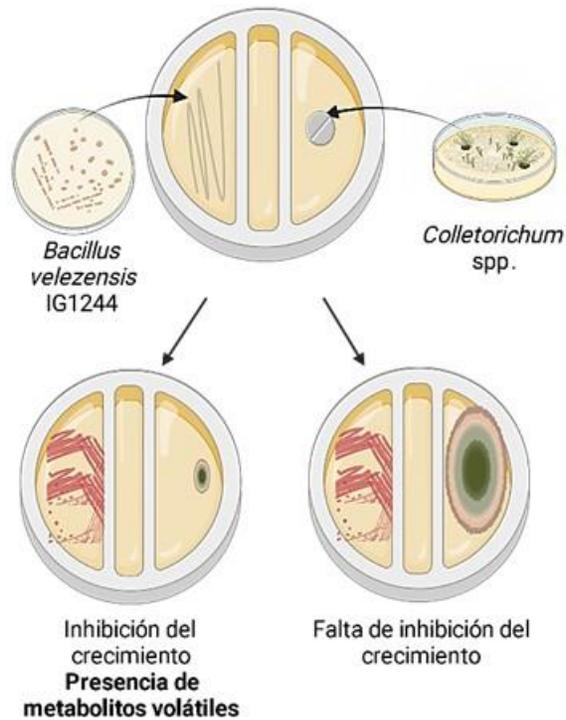


Figura 13 Ensayo para la determinación de la naturaleza del metabolito antifúngico (volátil o no volátil)

5.4. Búsqueda Biodirigida de Fracciones Bioactivas

5.4.1. Selección del Medio Cultivo

Se evaluó el efecto de los medios Caldo Nutritivo (CN), Luria Bertani (LB), ISP2 y MOLP (su composición se describe en el Cuadro 6) sobre la producción de metabolitos antifúngicos. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de los medios estériles, inoculados luego con 150 μ l de suspensión de *Bacillus* sp IG1244 con una concentración de células viables de 1.2×10^7 UFC/ml incubados a 30 °C 180 rpm, durante 72 horas. Posteriormente, los medios fermentados se centrifugaron (centrífuga Thermo Scientific) a 10,000 rpm a 4 °C, durante 80 min. Los sobrenadantes resultantes, conteniendo los metabolitos fungicidas se filtraron con jeringa a través de una membrana de polietersulfona de 0.22 μ m (Sartorius) para eliminar células microbianas residuales.

Cuadro 6 Medios de cultivo utilizados en el estudio

Medio de cultivo	Composición	Referencia
Caldo nutritivo (CN)	Peptona 5.0 g/L, extracto de carne 3.0 g/L (Bioxon).	
Luria Bertani (LB)	Peptona 10g/ L Extracto de levadura 5g/L, Cloruro de sodio 5 g/L	Medina <i>et al.</i> (2011)
ISP2	Extracto de malta 10 g/L, Extracto de levadura 4 g/L, Dextrosa 4 g/L	Paz <i>et al.</i> (2016)
Medio para la producción óptima de lipopéptidos (MOLP)	Peptona 30 g/L, Sacarosa 20 g/L, KH ₂ PO ₄ 1.9 g/L, Extracto de levadura 7 g/L, Solución de elementos traza: 1 mL/L, Solución Mn-Mg 9 mL/L Solución de elementos traza: CuSO ₄ 1 mg/L, FeCl ₃ ·6H ₂ O 5mg/L, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 4 mg/L, KI 2 mg/L, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.14mg/L, H ₃ BO ₄ 10mg/L, C ₆ H ₈ O ₇ 10 g/L. Solución Mn-Mg: MnSO ₄ ·H ₂ O 0.4 g/L, MgSO ₄ 50 g/L.	Jacques <i>et al.</i> (1994)

5.4.1.1. Pruebas de antibiosis. Se utilizaron cajas de Petri conteniendo agar PDA (Bioxon), inoculadas con 150µL de una suspensión de micelio de cepas de los hongos del género *Colletotrichum*. La suspensión se preparó agregando 5ml de una solución Tween 10 al 1% v/v a cajas de Petri conteniendo cultivos de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae*, cultivados en caja Petri y raspando su micelio con un aza bacteriológica. Luego, con una pipeta se recolectó aproximadamente 4 ml de la suspensión y se depositó en un tubo Eppendorf estéril de 5 ml. Posteriormente, con la ayuda de un sacabocados estéril, se realizaron 4 perforaciones circulares equidistantes de 5mm en el agar y en cada uno de los pozos resultantes se depositaron 50 µl del sobrenadante a evaluar. Finalmente, las cajas fueron incubadas a 28°C hasta que el hongo cubrió toda la placa (aproximadamente 3 días). Pasado el periodo de incubación se midieron los halos de inhibición.

5.4.1.2. Análisis estadístico. Las pruebas fueron corridas empleando dos réplicas biológicas, con tres repeticiones técnicas cada una. Los tratamientos fueron los cuatro medios utilizados (CN, LB, ISP2 y MOLP) y la variable respuesta fue el halo de inhibición en centímetro El análisis estadístico fue realizado empleando un ANOVA de una vía y una prueba de comparación de medias por Tukey-Kramer, a una significancia $p < 0.05$ en el software NCSS V 21.0.3.

5.4.2. Cinéticas de Crecimiento Microbiano y de Producción de Metabolitos Antifúngicos

5.4.2.1. Condiciones de cultivo sumergido para la cinética de crecimiento microbiano y producción de metabolitos antifúngicos. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del medio de cultivo MOLP (su composición se describe en el Cuadro 6). Este se inoculó con 150 μ l de suspensión de *Bacillus* sp. IG1244 con una concentración de células viables de 1.2×10^7 UFC/ml. Los matraces fueron incubados a 30 °C y 180 rpm durante 120 h. Para la cinética de crecimiento microbiano en las primeras 48 h se tomaron muestras cada 8 h y luego cada 12 h. Para la cinética de producción de metabolitos antifúngicos se tomaron muestras cada 24 h. En los puntos de muestreo se tomaron tres matraces y su contenido fue centrifugado a 10,000 rpm a 4 °C, durante 80 min. El sobrenadante resultante se filtró con una jeringa a través de una membrana de polietersulfona de 0.22 μ m (Sartorius) para eliminar la presencia de células microbianas residuales (Se realizaron dos réplicas biológicas del ensayo).

5.4.2.2. Medición del crecimiento bacteriano. Se midió el crecimiento bacteriano mediante el conteo de bacterias viables en placa. Para ello, se realizó una dilución seriada de la muestra (desde 10^{-1} hasta 10^{-8}). Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 μ l de cada dilución (desde de 10^{-4} hasta 10^{-8}) y se inoculó en cajas Petri con agar LB (Sigma) (40 g/L), se dejó incubar durante 24 h. Se realizaron tres replicas para cada dilución. Finalmente, se contaron las colonias tomando en cuenta la normativa mexicana NOM-092, que indica que solo deben considerar las diluciones que contengan más de 25 colonias y menos de 250 colonias.

5.4.2.3. Medición de la producción de metabolitos antifúngicos. La producción de metabolitos antifúngicos se determinó de manera indirecta, correlacionando el halo de inhibición producido por *Bacillus* sp. IG1244 de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.4.1.1.

5.4.2.4. Análisis estadístico para la obtención de parámetros cinéticos. Se realizaron gráficas de

puntos para determinar el comportamiento del crecimiento microbiano y la producción de metabolitos antifúngicos. Es importante destacar que, en cada punto de muestreo, las muestras fueron destruidas para su análisis. Se llevaron a cabo dos réplicas biológicas, y en cada réplica se realizaron tres repeticiones técnicas. Para calcular los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento microbiano se utilizó el modelo logístico modificado (Ecuación 1) en el software NCSS V 21.0.3.

Ecuación 1: Modelo matemático del crecimiento microbiano

$$LN\left(\frac{UFC}{mL}\right) = \frac{(A)}{[1 + B * e^{-C*t}]}$$

t = tiempo (h)

A,B y C= Parámetros cinéticos a determinar.

5.4.3. Identificación de las Fracciones Bioactivas

5.4.3.1. Preparación del extracto de metabolitos antifúngicos de *Bacillus* sp. IG1244. El fermento de *Bacillus* sp IG1244, fue centrifugado a 10,000 rpm y 4 °C, durante 80 min. El sobrenadante resultante se filtró con una jeringa a través de una membrana de polietersulfona de 0.22 µm (Sartorius). Posteriormente, el sobrenadante fue congelado a -80°C en un ultracongelador y liofilizado durante 48h a -34°C y 1 Pa. en un equipo KN-HFD1(FULLWIDE). Finalmente, el liofilizado fue sometido a una extracción con metanol bajo sonicación a 20°C por 20 min (sonicador Cpx-952-219 Branson) para obtener una solución metanólica de los metabolitos producidos por *Bacillus* sp. IG1244.

5.4.3.2. Separación de fracciones mediante cromatografía en capa fina (TLC). La separación en fracciones del extracto metanólico se realizó por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés), para lo cual, se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ con respaldo de aluminio de 20 cm×20 cm (Merck). Con una micropipeta, se aplicaron 12µL de muestra en la línea de depósito (de 2 en 2 µL) y las placas se eluyeron con una fase móvil formada por cloroformo, metanol y agua (65: 25: 5 v/v). Luego las placas fueron reveladas con luz UV (a 254 y 365 nm) y ninhidrina al 2% p/v. El factor de retardo (Rf) fue calculado con la ecuación 2.

Ecuación 2: Factor de retardo (Rf)

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la fracción}}{\text{Distancia de la placa (entre las dos marcas)}}$$

5.4.3.3. Identificación de las fracciones bioactivas mediante la técnica de autobiografía. Para la identificación de las fracciones antifúngicas se utilizó la técnica de autobiografía descrita por Choma *et al.* (2011) con las siguientes modificaciones. En primer lugar, se obtuvo una placa de TLC como se indica en el subtítulo anterior y fueron sumergidas ligeramente en el caldo de cultivo de los hongos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, y *C. kahawae* que previamente fue incubado por 4 días en agitación a 180 rpm y 28°C. El caldo contenía: 30 g/L dextrosa, 3 g/L NaNO₃, 5.07 g/L KH₂PO₄, 1.73 g/L KCl, 1.73 g/L MgSO₄·7H₂O, 3.3 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 2.8 mg/L FeCl₃·7H₂O, 3 g/L extracto de levadura (Bioxon), 50 g/L polietilenglicol. El caldo ajustado a un pH de 4.5. Luego, la placa de TLC sumergida en el caldo de cultivo del hongo se coloca en una caja Petri grande 20x20 cm y se dejó incubando por 72 h (se colocó un algodón humedecido estéril, para mantener la humedad). Pasado el tiempo de incubación, en el caso de observar un área de inhibición se determinó el Rf con la ecuación 1. Los ensayos fueron realizados en dos réplicas biológicas con tres repeticiones técnicas cada una.

5.5. Caracterización Química del (los) Metabolito(s) Contenidos en la(s) Fracción(es) Activa(s)

En primera instancia se obtuvo un extracto metanólico de las fracciones activas obtenidas en la placa cromatográfica descrita en la sección 5.4.3.2. Para ello, se raspó la sílica de la placa cromatográfica en la que se encontraba la fracción activa y se realizó una extracción con metanol mediante sonicación durante 20 minutos a 20°C.

Posteriormente, el extracto metanólico fue sometido a análisis de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas (UPLC-ESI-MS/MS) en el laboratorio multidisciplinario de caracterización de nanoestructuras y materiales del IPN (Instituto Politécnico Nacional). Las condiciones de UPLC incluyeron una columna de fase reversa C18 y una fase móvil compuesta por una mezcla de agua (A) y acetonitrilo (B) ambos acidificados con ácido fórmico al 0,1% v/v, con un flujo de 0.2 ml/min y una temperatura de 35°C. El programa de gradiente de elución utilizado fue el siguiente: 0-7,9 min, 5% B; 7,9-9,5 min, 5-40% B; 9,5-16,3 min, 40-90% B; 16,3-18,5 min, 90-100% B; 18,5-22,7 min, 100% B. El tiempo total de análisis fue de 23 minutos.

La detección se realizó mediante un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (ESI) en modo positivo y negativo con un analizador micrOTOF-Q, con un rango de m/z de 50 a 3000, un voltaje de la fuente de iones de 3500 V, una temperatura de la fuente de iones de 200°C y un flujo de gas de nebulización de 9,0 L/min. La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas obtenidos con las bases de datos de acceso público GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) mediante la herramienta de búsqueda masiva.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identidad de los Microorganismos de Estudio

Se verificó la identidad de la cepa de *Bacillus* sp. IG1244 mediante técnicas de biología molecular, utilizando como primer paso la amplificación por PCR de la región universal 16SrRNA (1420 pb). Con la secuencia obtenida, se realizó un análisis comparativo utilizando la base de datos del NCBI y la construcción de un árbol filogenético, el cual mostró que la cepa de estudio presenta una homología del 99.58% con *B. velezensis*, 98.58% con *B. amyloliquefaciens* y 99.58% con *B. methylotrophicus* (Figura 14). Estas especies pertenecen al clado II "*B. amyloliquefaciens*" que forma parte del complejo *B. subtilis*. Sin embargo, se ha reportado que el análisis filogenético del gen 16SrRNA no puede diferenciar de manera precisa las especies dentro de este complejo debido a la naturaleza altamente conservada del gen (Das *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2017; Rooney *et al.*, 2009), lo que sugiere que se deben utilizar otros análisis para la identificación precisa de la especie. Por tal motivo, se realizó un estudio más profundo utilizando un enfoque de análisis de secuencia multilocus, el cual consiste en la concatenación de cuatro secuencias: la subunidad α de la ADN girasa (*gyrA*) (1.040 pb), la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) (1.140 pb), la subunidad larga de la chaperonina (*groEl*) (1.010 pb) y la subunidad fosforribosil-aminoimidazol-carboxamida formiltransferasa (*purH*) (970 pb). Esto dio lugar a un análisis de datos más completo que abarcó una longitud total de 4.160 pb.

En cuanto a los resultados, el análisis multilocus mostró una homología del 99.81%, tanto con *B. velezensis*, como con *B. amyloliquefaciens* (Figura 15). Cabe agregar que en el dendrograma se observan dos niveles de agrupación: en el clado superior se encuentran 8 bacterias de la especie *B. velezensis* y 5 bacterias de la especie *B. amyloliquefaciens*, mientras que en el clado inferior se encuentran nuestra bacteria (*Bacillus* sp. IG1244) y la bacteria *B. amyloliquefaciens* FS1092. Esto podría indicar que la bacteria de estudio comparte mayores características con *B. amyloliquefaciens*; sin embargo, no existe una separación clara de especies en cada clado, ya que en ambos se encuentran presentes bacterias de la especie *B. amyloliquefaciens*. Además, la bacteria de estudio presenta homología con más especies de *B. velezensis*. En conclusión, el análisis

multilocus no fue suficiente para identificar con precisión la especie taxonómica de la cepa de *Bacillus* sp. IG1244, ya que comparte características con ambas especies de *Bacillus*. No obstante, el dendrograma proporciona información valiosa sobre la relación entre las bacterias estudiadas, lo que puede ser útil para futuros estudios taxonómicos y filogenéticos.

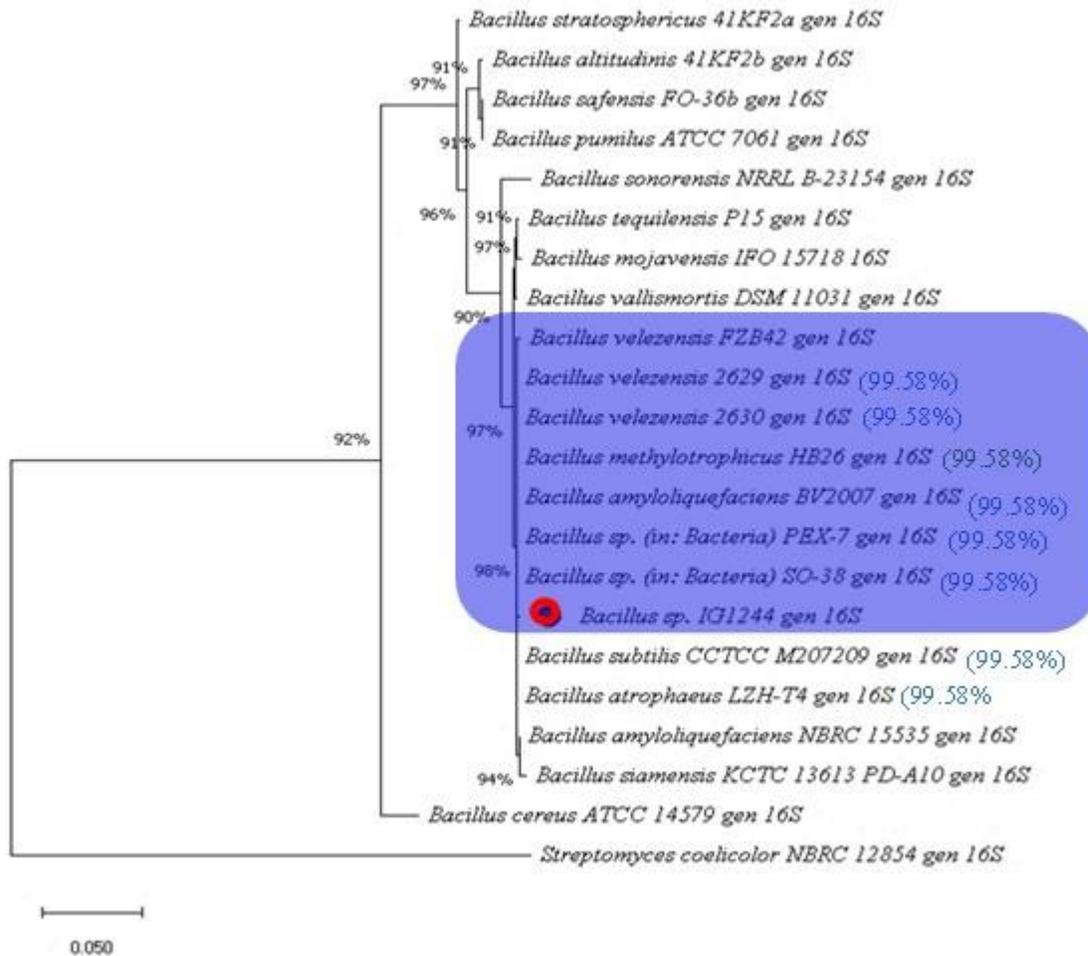


Figura 14: Análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA de *Bacillus* sp IG1244 en relación con otras bacterias. La cepa de estudio esta etiquetada con ●. Al lado del nombre de las especies se indica el % de homología con *Bacillus* sp IG1244. En el punto de bifurcación de las ramas del árbol se observan los valores de Bootstrap >90 %, basados en 1000 repeticiones.

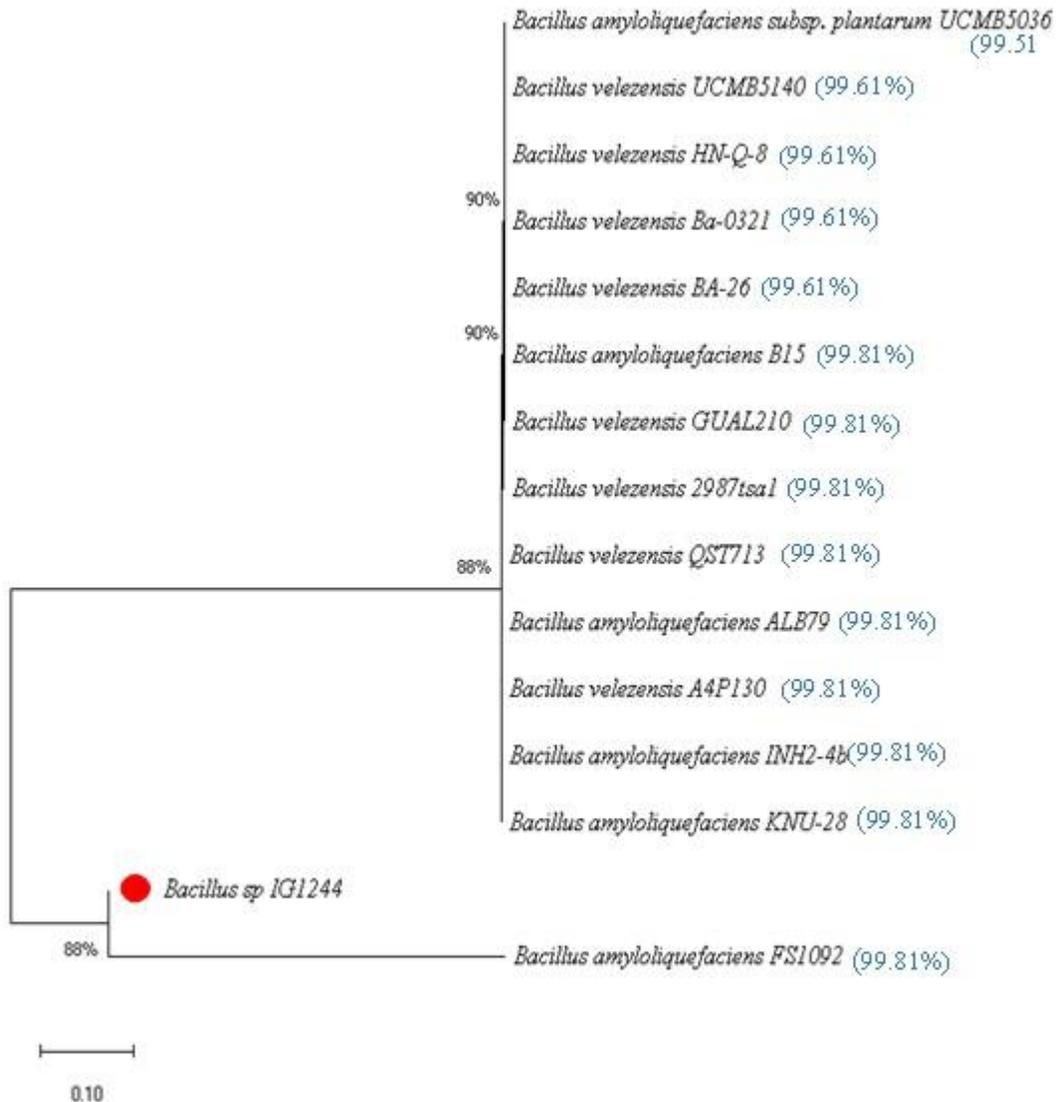


Figura 15: Análisis filogenético basado en la concatenación de genes (*gyrA*, *rpoB*, *groEl* y *purH*) de *Bacillus* sp IG1244 en relación con otras bacterias de su género. La cepa de estudio esta etiquetada con ●. Al lado del nombre de las especies se indica el % de homología con *Bacillus* sp IG1244. En el punto de bifurcación de las ramas del árbol se observan los valores de Bootstrap >90 %, basados en 1000 repeticiones

Como alternativa metodológica se determinó su huella genómica mediante BOX-PCR. Dicho estudio se usa para observar la diversidad de especies y las relaciones genéticas específicas entre microorganismos; siendo considerada una técnica altamente discriminatoria, confiable, reproducible y rápida (Da Costa-Fernandes *et al.*, 2022). Se realizó una clasificación discriminatoria basada en un patrón de bandeo del gel de electroforesis, considerando el ancho, la altura en el gel y el número de bandas, y comparándolo con otras bacterias de *Bacillus* de identidad

definida. En la Figura 16, se observa que las bacterias *B. subtilis* C5 y *B. subtilis* I6, están clasificadas en un mismo clado, ya que presentan los mismos patrones. Por otro lado, las bacterias *B. velezensis* I, *B. velezensis* II; y *Bacillus* sp. IG1244 (bacteria de estudio), son clasificados en otro clado. Sin embargo, la bacteria *B. amyloliquefaciens* IG1201, es clasificada aparte, pero con una relación con el clado de *B. velezensis*. En ese sentido se observa que *Bacillus* sp. IG1244 tiene una mayor relación con *B. velezensis*, lo que sugiere una posible similitud con la especie.

Se ha reportado la complejidad de identificar especies dentro del género *Bacillus*, especialmente los del clado II, denominados “*B. amyloliquefaciens*”, esto debido a la relación genética estrecha entre las bacterias pertenecientes a dicho clado (Ben-Gharsa *et al.*, 2021; Rooney *et al.*, 2009). Como era de esperar, el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA por sí solo no fue suficiente para identificar las especies de *Bacillus*. Incluso, en el presente estudio el uso del análisis multilocus tampoco fue eficiente para la identificación a nivel de especie; contrario a lo reportado en el estudio de Ben-Gharsa *et al.* (2021) quienes lograron clasificar a la cepa MBY2 como *B. velezensis* utilizando justamente el análisis multilocus con la concatenación de la secuencia de los genes (groEL, purH, rpoB y gryA).

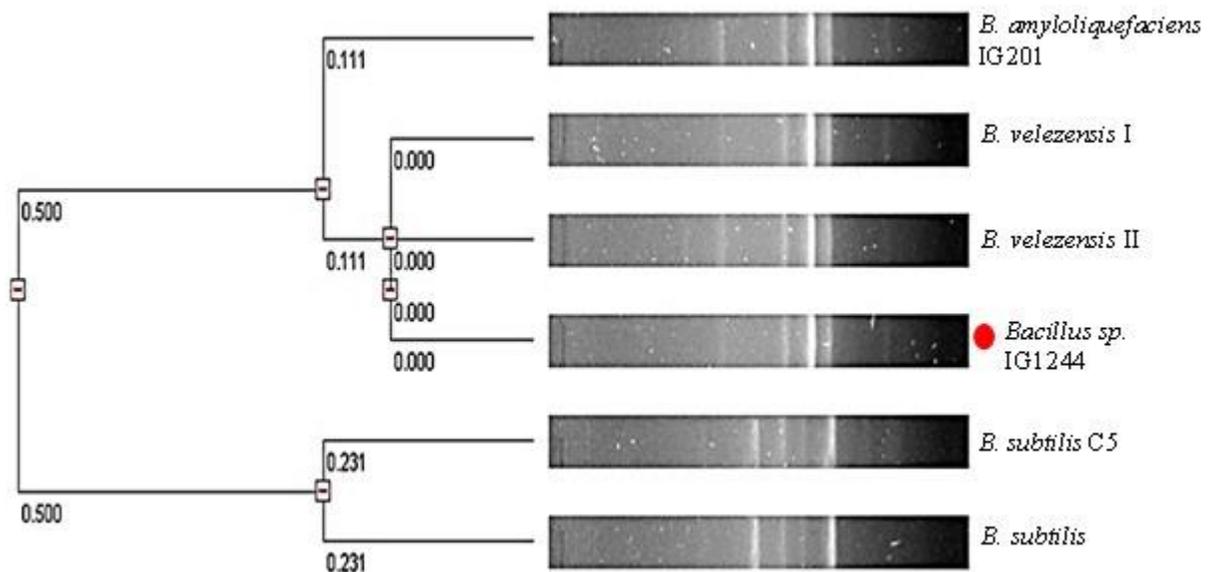


Figura 16 Huella genómica *Bacillus* sp. IG1244, en comparación con otros *Bacillus*. La cepa de estudio esta etiquetada con ●.

Otra técnica que también se ha utilizado es la determinación de la huella genómica para examinar la relación filogenética entre microorganismos y realizar una tipificación molecular por PCR basada en secuencia repetitiva. Las huellas genómicas reflejan una alta diversidad tanto intraespecífica e interespecífica (Freitas *et al.*, 2008; López *et al.*, 2020). Por lo cual, nos sirve para determinar una relación filogenética de la bacteria de estudio, como lo hicieron Da Costa-Fernandes *et al.* (2022), donde utilizaron el método de huella genómica para identificar 30 cepas de *Bacillus thuringiensis* y clasificarlas en sub especies tóxicas contra dípteros.

Por otra parte, varias cepas de *Bacillus* se han declarado sinónimos heterotípicos de *B. velezensis*, debido a la relación genética estrecha, lo que llevo en un primer momento a los investigadores a clasificar a estas bacterias en una especie que no correspondía. Posteriormente realizaron análisis filogenómicos utilizando secuencias completas de los genomas y ensayos de hibridación ADN-ADN para reclasificar a las bacterias. Por ejemplo, *Bacillus methylotrophicus* XT1 CECT 8661 fue denominada posteriormente *Bacillus velezensis* (Torralba *et al.*, 2018). Otro ejemplo es el estudio de Dunlap *et al.* (2016), reclasificaron a la bacteria que en un inicio se reportó como *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-41580 como *B. velezensis* basándose en un ensayo de hibridación ADN-ADN; pero en un estudio posterior utilizando análisis de secuencia del genoma completo la reclasificaron como *Bacillus methylotrophicus*.

En conclusión, aunque la huella genómica nos permitió clasificar a la cepa de *Bacillus* sp. IG1244 como *Bacillus velezensis*, para tener un resultado de alta confiabilidad sería necesario realizar una secuenciación del genoma completo y hacer un ensayo de hibridación ADN-ADN.

Por otro lado, se verificó la identidad de los tres hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum* aislados de aguacates infectados con antracnosis, mediante PCR de la región universal ITS y de la región β -tubulina, cuyos pares de bases secuenciados se muestran en el Cuadro 7. Se construyeron dendogramas basados en el gen ITS (Figura 17) y β -Tubulina (Figura 18), observándose una homología de las cepas de estudio con las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum kahawae* con un porcentaje superior al 94%. Además, se pudo determinar la subespecie de la cepa de *Colletotrichum kahawae*, denominándose como "*Colletotrichum kahawae* subsp *ciggaro*".

Cuadro 7 Pares de bases secuenciados para la región ITS y β -Tubulina correspondiente a los hongos de estudio *Colletotrichum*

	ITS (pb)	β -Tubulina (pb)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	580	476
<i>Colletotrichum acutatum</i>	587	557
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp <i>ciggaro</i>	578	578

pb: Pares de bases

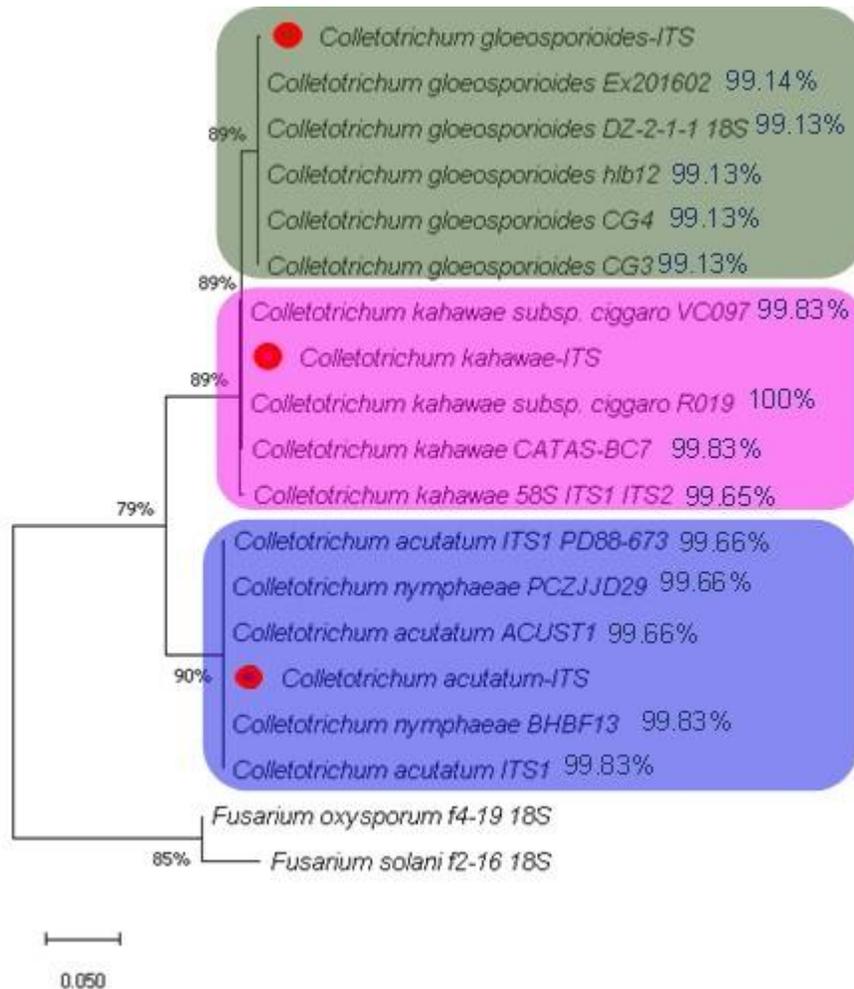


Figura 17: Análisis filogenético basado en el gen ITS de *Colletotrichum* spp. Las cepas de estudio están etiquetadas con ●. Al lado del nombre de las especies se indica el % de homología. En el punto de bifurcación de las ramas del árbol se observan los valores de Bootstrap >90 %, basados en 1000 repeticiones.

Contrariamente a lo esperado, se observó una separación más clara de especies en los clados en el dendograma basado en la región ITS. Cabe destacar que, en base a los resultados obtenidos, se

pudo corroborar lo mencionado en el apartado 2.2.2. Las especies de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* ya han sido reportadas como causantes de antracnosis en aguacate en México en estudios previos (Silva-Rojas *et al.*, 2011; Tapia-Rodríguez *et al.*, 2020; Trinidad *et al.*, 2017). Por otra parte, no se han reportado casos de *Colletotrichum kahawae* subsp *ciggaro* como causante de antracnosis en aguacate en México, por lo que este estudio podría ser uno de los primeros en reportar esta especie en el país.

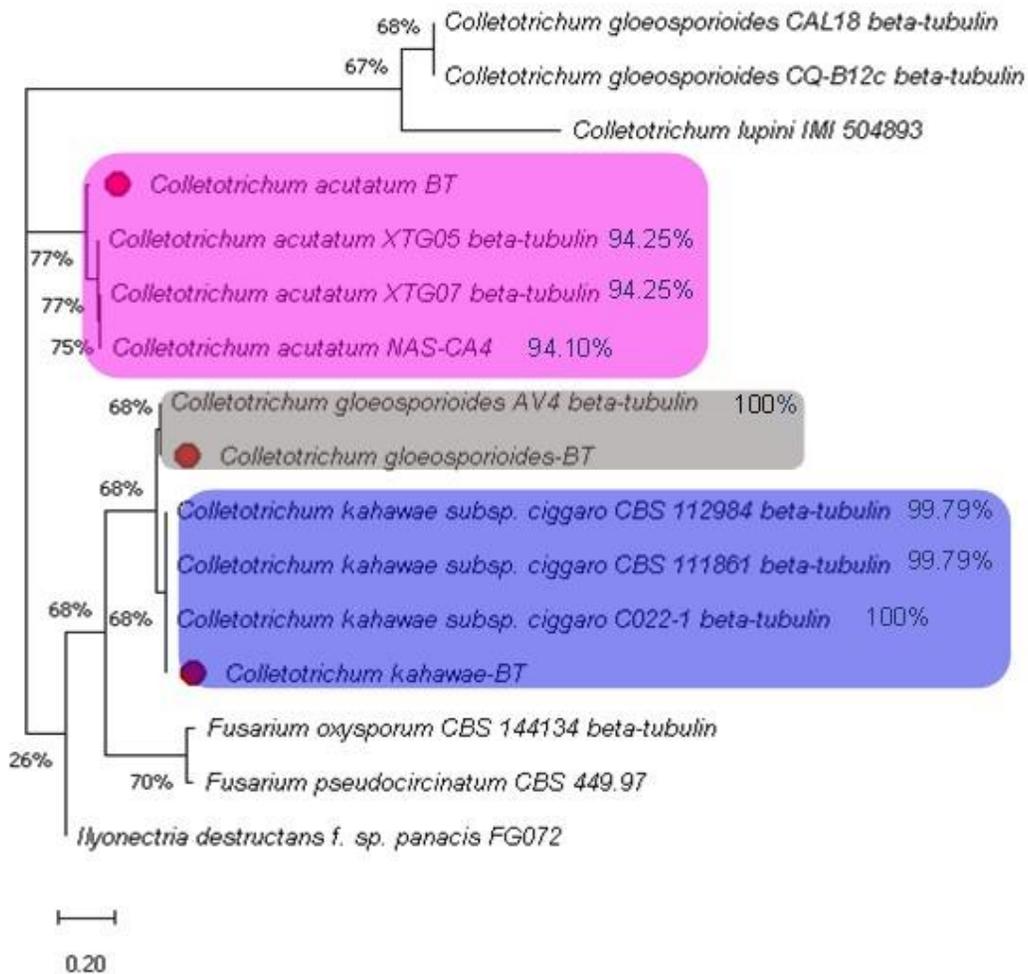


Figura 18 Análisis filogenético basado en el gen β -tubulina de *Colletotrichum* spp. Las cepas de estudio están etiquetadas con ●. Al lado del nombre de las especies se indica el % de homología. En el punto de bifurcación de las ramas del árbol se observan los valores de Bootstrap >90 %, basados en 1000 repeticiones.

6.2. Antibiosis de *B. velezensis* IG1244 Frente a *Colletotrichum* spp.

Para establecer el grado de antagonismo de *B. velezensis* IG1244 contra *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. kahawae* subsp *cigarro*, se realizaron enfrentamientos directos en cajas Petri para cada uno de los hongos. En la figura 19 se observa que la bacteria limitó, en mayor o menor grado, el desarrollo de todas las especies de *Colletotrichum*.

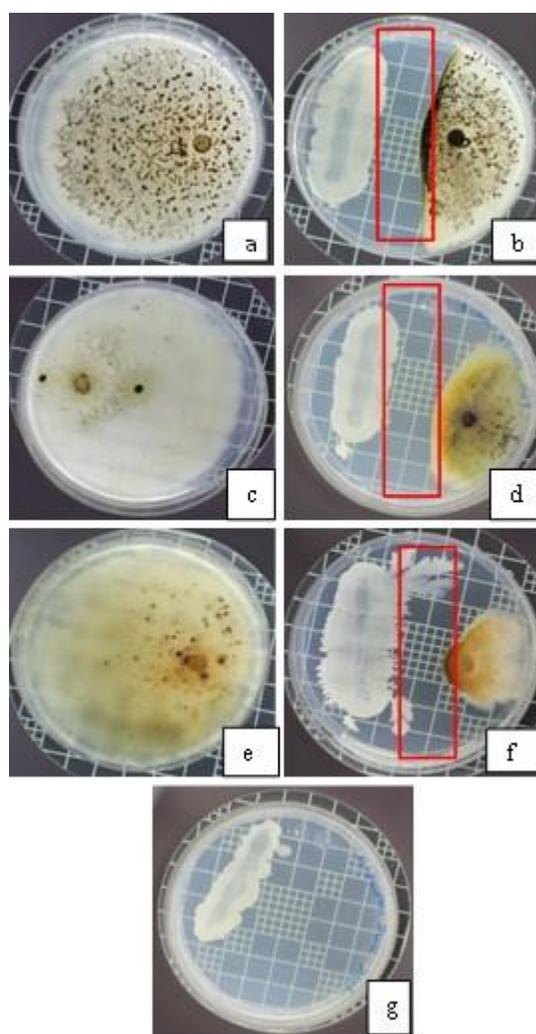


Figura 19. Antagonismo por confrontación *in vitro* de *B. velezensis* IG1244 contra especies del género *Colletotrichum*. a) *C. gloeosporioides*; b) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. gloeosporioides* (incubación por 8 días) c) *C. kahawae* subsp *cigarro* d) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. kahawae* subsp *cigarro* (incubación por 14 días) e) *C. acutatum* f) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. acutatum* (incubación por 28 días) g) *B. velezensis* IG1244.

En las figuras de enfrentamiento (19b; 19d y 19f) se observa un área donde no existe crecimiento de ninguno de los dos microorganismos (área marcada en rojo), denominado “halo de inhibición”, característico de un mecanismo de competencia de tipo directo, donde la bacteria produce un antibiótico que limita el crecimiento del hongo. El grado de inhibición del crecimiento fue variable, observando que la cepa más sensible fue la de *C. acutatum*, seguida por la de *C. kahawae* subsp *ciggaro* y *C. gloeosporioides*. Sin embargo, no es posible asignar un grado de inhibición debido a la marcada diferencia en la velocidad de crecimiento de los hongos, lo que puede resultar en una relación desproporcionada. Por otra parte, aunque se ha identificado un patrón de sensibilidad diferente para cada una de las cepas de *Colletotrichum*, no es posible asignar un grado de inhibición, por lo que el bioensayo se considera de tipo cualitativo

Por otro lado, a través de estudios de microscopía se pudo evidenciar que el enfrentamiento con la bacteria promovió cambios morfológicos importantes en las hifas de los hongos, así como la inducción en la formación de estructuras de resistencia, como clamidosporas (Figura 20).

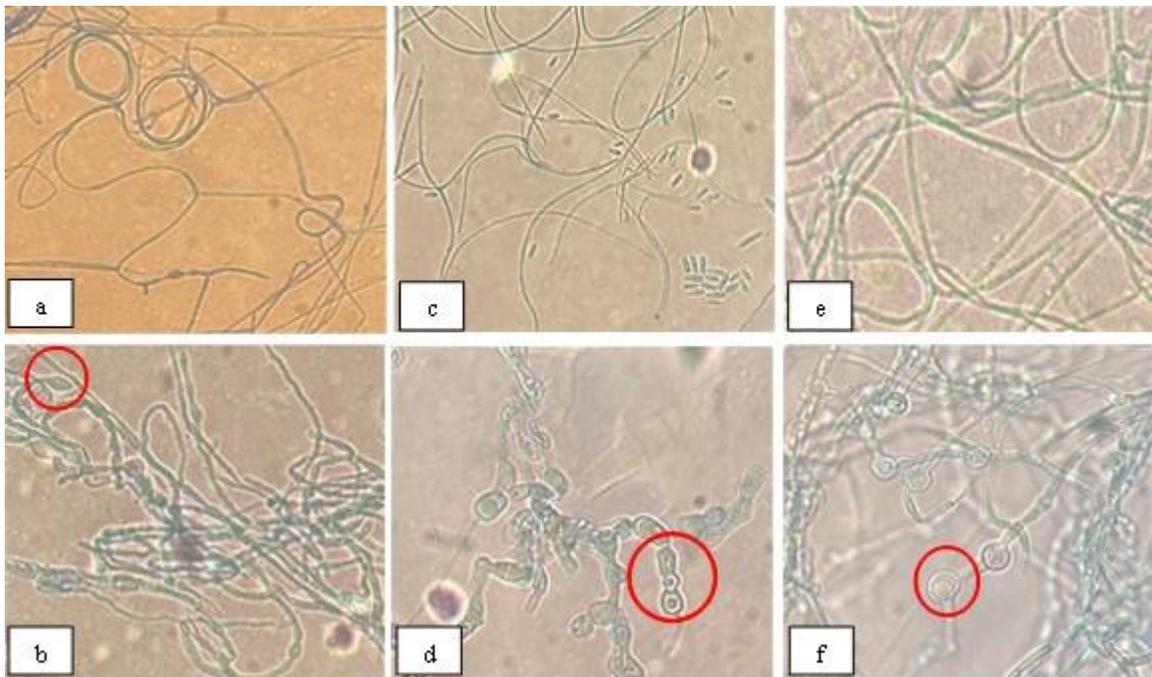


Figura 20. Imágenes al microscopio del micelio de especies de *Colletotrichum* spp. enfrentadas y no enfrentadas con *Bacillus velezensis* IG1244. a) *C. gloeosporioides*; b) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. gloeosporioides* c) *C. acutatum* d) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. acutatum* e) *C. kahawae* subsp *ciggaro* d) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. kahawae* subespecie *ciggaro*. En el círculo rojo se observan clamidosporas.

En los micelios de los hongos enfrentados se observan cambios estructurales marcados en las hifas; por ejemplo: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Figura 20 b y d) muestran la formación de clamidosporas en cadena mientras que *C. kahawae* subsp *ciggaro* tiene clamidosporas terminales (Figura 20 f). Las alteraciones morfológicas en las hifas observadas coinciden con el reporte sobre el crecimiento anormal del micelio y formación de protuberancias en diferentes hongos provocadas por la cepa GH1-13 de *B. velezensis* (Park *et al.*, 2019). Así mismo, se reportó que la cepa XT1 CECT 8661 fue capaz de provocar alteraciones morfológicas llamativas como estructuras de resistencia y alteraciones morfológicas en las hifas de *Botrytis cinerea* (Toral *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos demuestran que existe una actividad antifúngica de *B. velezensis* IG1244 frente a los hongos estudiados y que el principal mecanismo de competencia es la antibiosis. Además, los antibióticos sintetizados por *B. velezensis* IG1244 provocan en *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. kahawae* subsp *ciggaro* distorsión en la estructura de las hifas y la formación de estructuras de resistencia como clamidosporas.

En ese marco, se sabe que *B. velezensis* es una especie que alberga en su genoma genes relacionados con actividad antifúngica (Rabbee *et al.*, 2019). En tal sentido, se han reportado cepas de *B. velezensis* que controlan a *Colletotrichum* spp. y son excelentes candidatas para aplicación en biotecnología agrícola, así como: *B. velezensis*: AK-0 (Kim *et al.*, 2021), NSB-1 (Nam *et al.*, 2012), TS3B-45 (Reyes-Estebanez *et al.*, 2020), HN-2 (Jin *et al.*, 2020) y CE-100 (Choub *et al.*, 2021), las cuales demostraron mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* en manzana, fresa, mango y nueces que son antagonistas de *C. gloeosporioides*, con un porcentaje alto de inhibición. También, se conoce que algunas cepas de *B. velezensis* poseen mecanismos de competencia de tipo directo e indirecto, como es el caso de la cepa C2 antagonista a *Verticillium dahliae*. Dicha cepa sintetiza compuestos orgánicos volátiles (COVs) antifúngicos, además de enzimas líticas como (proteasa, quitinasa y β -glucanasa), como parte de los mecanismos directos de antibiosis y también sintetiza un sideróforo y un metabolito que solubiliza fosfato inorgánico (Dhouib *et al.*, 2019), como parte de mecanismos indirectos. Otro ejemplo, es la cepa Bvel1 que, además de sintetizar metabolitos antifúngicos como lipopéptidos cíclicos (LPCs), también produce ácido azelaico, que es un inductor químico de resistencia sistémica inducida (RSI) (Nifakos *et al.*, 2021); es decir, Bvel1 cuenta con ambos mecanismos de control.

6.3. Naturaleza de los Metabolitos Bioactivos Involucrados en el Control de *Colletotrichum* spp.

Para establecer la naturaleza (volátil o no volátil) de los metabolitos antifúngicos responsables del mecanismo de antibiosis de *B. velezensis* IG1244 contra hongos del género *Colletotrichum* se emplearon cajas de Petri con división (Figura 21), las cuales impiden la difusión de los metabolitos sobre el agar. En todos los casos no se observó inhibición del desarrollo de las cepas de *Colletotrichum* lo que indica la ausencia de producción de metabolitos antifúngicos volátiles por parte de la cepa de *B. velezensis* IG1244 en condiciones estándar, por lo cual, el antagonismo de dicha cepa contra hongos del género *Colletotrichum* está dada principalmente por metabolitos antifúngicos no volátiles. Se han reportado varias cepas de *B. velezensis* con mecanismo de antibiosis, antagonistas a algunas especies de *Colletotrichum*, las cuales sintetizan metabolitos antifúngicos no volátiles, como lipopéptidos cíclicos (LPCs). Por ejemplo, las cepas HN-2 y GH1-13, ambas antagonistas a *C. gloeosporioides*, productoras de bacilomicina-D (Jin *et al.*, 2020) y varias isoformas de surfactinas (Park *et al.*, 2019), respectivamente. También, la cepa PW192 antagonista a *C. musae* y *C. gloeosporioides* productora de fengicinas A y B (Jumpathong *et al.*, 2022). Cabe agregar a la cepa AR1, antagonista de *C. gloeosporioides* que produce 5-N-tirosinilornitina como metabolito secundario antifúngico no volátil (Regassa *et al.*, 2021).

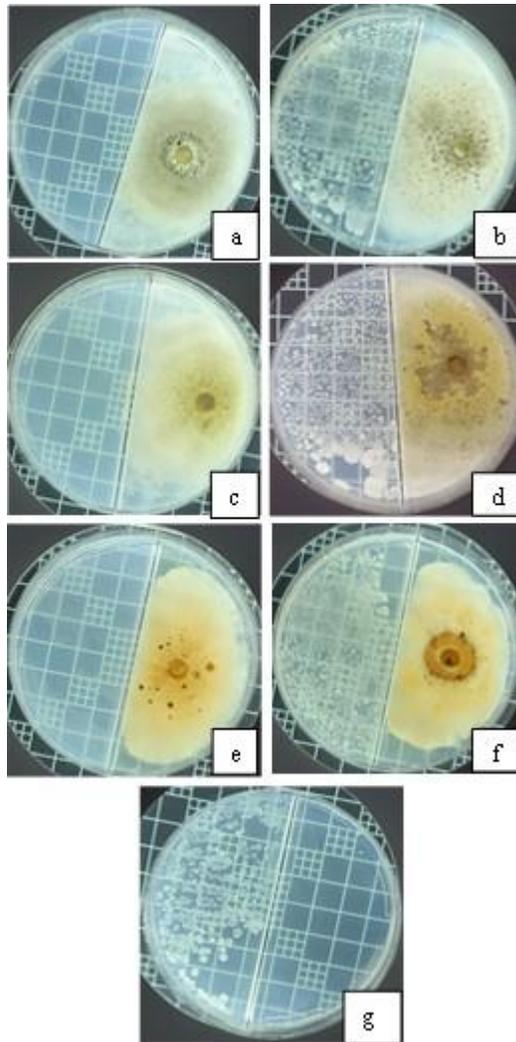


Figura 21. Enfrentamiento en cajas de Petri divididas para la evaluación de la naturaleza (volátil o no volátil) de los metabolitos antifúngicos producidos por la cepa *B. velezensis* IG1244 a) *C. gloeosporioides*; b) *B. velezensis* IG1244 vs. *C. gloeosporioides* (incubación por 8 días) c) *C. kahawae* subsp *ciggaro* d) *B. velezensis* IG1244 vs *C. kahawae* subsp *ciggaro* (incubación por 14 días) e) *C. acutatum* f) *B. velezensis* IG1244 vs *C. acutatum* (incubación por 28 días) g) *B. velezensis* IG1244.

6.4. Selección del Medio de Cultivo Para la Producción de Metabolitos Antifúngicos

Se realizó un análisis comparativo del efecto de cuatro medios de cultivo diferentes, CN, LB, ISP2 y MOLP sobre la producción de metabolitos antifúngicos por *B. velezensis* IG1244. En la Figura 22 se puede observar que existe una clara influencia del medio de cultivo en la producción de

metabolitos antifúngicos. Por ejemplo, el sobrenadante de *B. velezensis* IG1244 obtenido en el medio CN no produjo ningún halo de inhibición sobre ninguno de los tres hongos evaluados. Sin embargo, los sobrenadantes correspondientes a los medios LB, ISP2 y MOLP provocaron la formación de halos de inhibición de diferente diámetro, siendo los producidos por el medio MOLP, los de mayor tamaño (30% mayores a los producidos por los sobrenadantes de los medios ISP2 y LB).

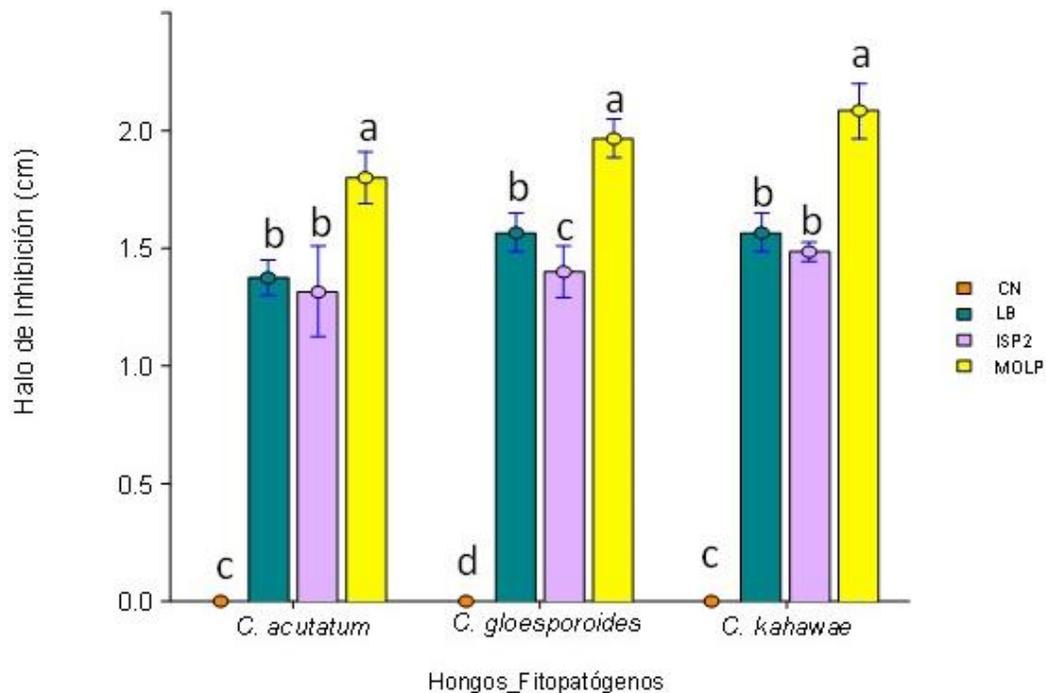


Figura 22 Efecto del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos antifúngicos, cuantificado a través de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes obtenidos del cultivo de *B. velezensis* IG1244.

*Las letras iguales no representan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) Según la prueba de Tukey Kramer. CN: Caldo nutritivo; LB: Luria Bertani; ISP2: Medio; MOLP: Medio óptimo para la producción de lipopéptidos.

Los resultados obtenidos concuerdan con los del estudio de Toral *et al.* (2018), quienes probaron tres medios líquidos para la producción de compuestos antifúngicos de *Bacillus velezensis* XT1 CECT 8661 (medio SG, medio comercial concentrado de res CM, y medio MOLP). Sus resultados indican que MOLP aumentó la producción de moléculas antifúngicas en comparación con los otros medios evaluados.

En la naturaleza, las rizobacterias (entre ellas bacterias del género *Bacillus*) contienen un grupo de genes inducibles por los exudados de las raíces de las plantas que codifican la síntesis no ribosómica de metabolitos secundarios antimicrobianos (Fan *et al.*, 2012). Por ejemplo, la producción de metabolitos antifúngicos de *B. subtilis* BGS3 fue mayor en presencia de ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido succínico) y aminoácidos (ácido aspártico y ácido glutámico), compuestos presentes en los exudados (Fan *et al.*, 2012; Moreno-Velandia *et al.*, 2021; Nihorimbere *et al.*, 2009). En ese sentido, cabe la posibilidad que el incremento en la producción de metabolitos antifúngicos de *B. velezensis* IG1244 se deba a la presencia de ácido cítrico en MOLP, el cual estaría actuando como inductor de la producción de metabolitos antifúngicos.

Por otro lado, el medio MOLP fue creado por Jacques *et al.* (1994) con el objetivo de aumentar la producción de lipopéptidos cíclicos (LPCs) en *B. subtilis*. Cabe señalar, que el mismo autor en artículos posteriores ha usado MOLP para estudiar la producción de LPCs en diferentes especies de *Bacillus*, y también estudiar las características fisicoquímicas de LPCs (Ahimou *et al.*, 2000). Con base a estos antecedentes, la mayor actividad antifúngica observada por el cultivo de la cepa de *B. velezensis* IG1244 en MOLP, sugiere que los metabolitos responsables podrían ser LPCs, cuya concentración se estaría incrementando por efecto del medio de cultivo.

6.5. Crecimiento Microbiano y Producción de Metabolitos Antifúngicos de *Bacillus velezensis* IG1244

Los resultados de las cinéticas de crecimiento microbiano y de producción de metabolitos antifúngicos de *B. velezensis* IG1244 se presentan en la Figura 23. Los datos experimentales del proceso de crecimiento bacteriano fueron ajustados al modelo logístico modificado (Ecuación 3), el cual permitió estimar una $\mu_{\max} = 0.2315 \text{ h}^{-1}$, como uno de los parámetros de ajuste al modelo. Dicho valor es similar al que presentan Vahidinasab *et al.* (2022) en su estudio ($\mu_{\max} = 0.22 \text{ h}^{-1}$) para *B. velezensis* UTB96. En las primeras 4 horas de cultivo no se observó incremento en las poblaciones de la bacteria, siendo el periodo de tiempo que corresponde a la fase de latencia, en el cual la bacteria se va adaptando a las condiciones de cultivo. Seguidamente se dio un crecimiento exponencial, alcanzando un máximo a las 28 h, punto a partir del cual, el cultivo se mantuvo en

fase estacionaria, aunque con una serie de pequeñas fluctuaciones de las poblaciones hasta el final del proceso (120 h).

Ecuación 3 Modelo ajustado

$$LN\left(\frac{UFC}{mL}\right) = \frac{(15.31654)}{[1 + ((0.07667) * e^{-(-0.21725)*t})]}$$

t = tiempo (h)

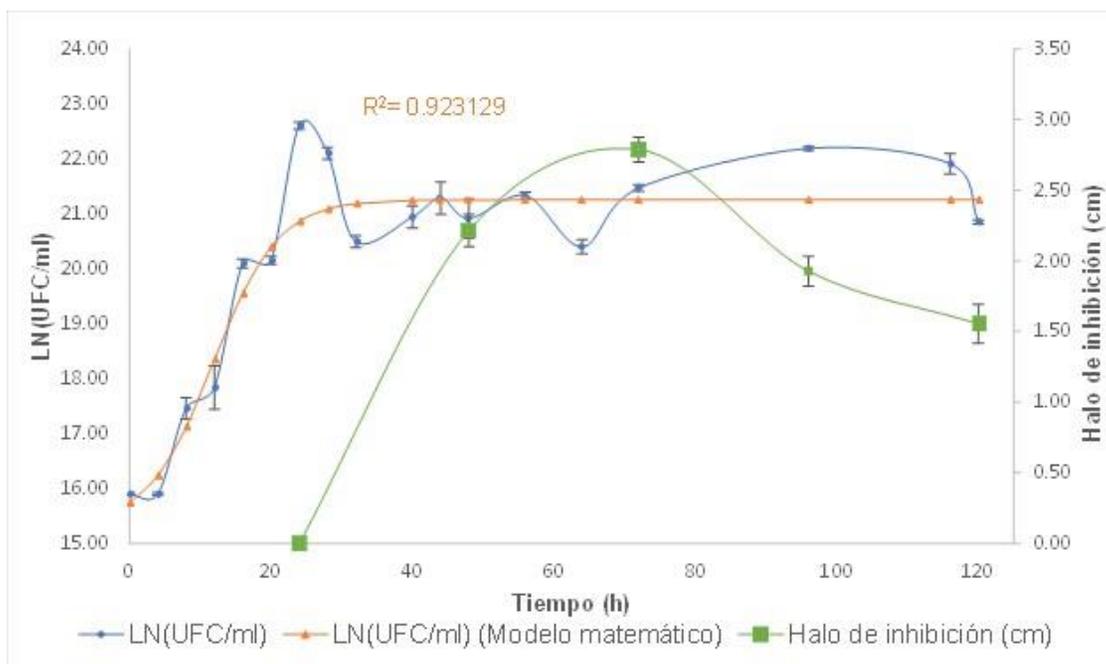


Figura 23. Cinética de crecimiento microbiano y producción de metabolitos antifúngicos. Cinética de crecimiento de *B. velezensis* IG1244 (♦) y actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células contra *Colletotrichum* spp. (■). Las barras de error representan el error estándar de la media

Las fluctuaciones presentes en la fase estacionaria pueden estar relacionadas con la esporulación y el quorum sensing de *B. velezensis* IG1244. El quorum sensing es un proceso mediante el cual las

bacterias pueden comunicarse entre sí y coordinar su comportamiento en función de la densidad de población. Las bacterias liberan moléculas de señalización, llamadas autoinductores que se acumulan en el medio a medida que la población crece. Cuando la concentración de autoinductores alcanza un umbral crítico, las bacterias pueden iniciar la expresión de genes específicos y coordinar su comportamiento, como es el caso de la esporulación en *Bacillus*. Este proceso está regulado por un sistema de señalización complejo que incluye quorum sensing y otros mecanismos de comunicación celular, con los cuales, las bacterias buscan sobrevivir en condiciones adversas, así sea en forma de estructuras de latencia (endosporas) (Bareia *et al.*, 2018; Medeot *et al.*, 2017)

Por otro lado, la producción de metabolitos antifúngicos fue seguida de manera indirecta, a través de los halos de inhibición del crecimiento fúngico producidos por los sobrenadantes del cultivo de la bacteria, tomados a diferentes tiempos de fermentación. Un aspecto importante por destacar es que la actividad antifúngica de los sobrenadantes de *B. velezensis* IG1244 frente a *C. gloeosporoides*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro* y *C. acutatum* en función del tiempo mostró un comportamiento similar para los tres hongos, por lo que en la Figura 23 se presenta la actividad antifúngica promedio de las tres especies de hongos en estudio. La producción de metabolitos antifúngicos fue prácticamente inexistente durante la fase de latencia y la fase exponencial de crecimiento. Se empezó a detectar actividad antifúngica a partir de las 48 horas de cultivo, cuando el crecimiento bacteriano se encontraba ya en la fase estacionaria, alcanzando su valor máximo a las 72 horas, punto a partir del cual se observó un descenso hasta el final del cultivo a las 120 h. Este comportamiento demuestra que la producción de compuestos antifúngicos no está asociada a crecimiento por lo que se trataría de metabolitos secundarios.

Se conoce que, durante la fase de crecimiento exponencial, se sintetizan principalmente los metabolitos primarios necesarios para el metabolismo celular y la producción de energía, como aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y enzimas (Mohapatra *et al.*, 2017). Posteriormente, la síntesis de metabolitos secundarios suele estar involucrada en la supervivencia del microorganismo y está regulada por factores ambientales y señales de estrés (Sidorova *et al.*, 2020); sin embargo, su producción puede estar también regulada por factores como la disponibilidad de nutrientes y la densidad celular.

Por otro lado, la disminución de la actividad antifúngica a partir de las 72 h puede correlacionarse con un autoconsumo para suplir la deficiencia de nutrientes y así poder generar energía suficiente para el mantenimiento celular y la reproducción, fenómeno, conocido como “retroalimentación

negativa”(Sturz *et al.*, 2000). También, se ha observado que la producción de metabolitos secundarios es regulada a nivel génico mediante sistemas de represión por producto lo que llevaría a las bacterias a reducir la producción de compuestos antifúngicos o incluso dejar de producirlos por completo si se alcanzan concentraciones elevadas (Munimbazi *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con las cinéticas de crecimiento bacteriano y producción de metabolitos antifúngicos secundarios de las cepas de *B. subtilis* EA-CB0015 y GA1 (Mosquera *et al.*, 2014; Toure *et al.*, 2004). En el caso particular de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015, se reportó que mientras la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria se mantenía estable hasta las 120 horas, igualmente la concentración de metabolitos antifúngicos empezaba a disminuir a partir de las 72 horas (Mosquera *et al.*, 2014).

6.6. Identificación de las Fracciones con Actividad Antifúngica del Extracto de *Bacillus velezensis* IG1244

Se utilizó la técnica de autobiografía asistida por cromatografía en capa fina (TLC) para identificar las fracciones bioactivas, cuyos resultados se muestran en la Figura 24. Se observa que el extracto de metabolitos de *B. velezensis* IG1244 afectó el crecimiento de los tres hongos en algunas zonas de la cromatoplaca, evidenciando una mayor actividad antifúngica a medida que aumentaba la dosis, lo que se reflejó en halos de inhibición más grandes. Además de los halos de inhibición, se observaron zonas donde se indujo la esporulación de los tres hongos, como un mecanismo de respuesta al estrés ambiental, en este caso debido a la presencia de sustancias tóxicas.

En general, todas las fracciones con un Rf por debajo de 0.4 tienen una actividad antifúngica, pero la fracción con un Rf entre 0.3 a 0.4 se presenta la mayor actividad, ya que incluso la dosis más baja (3 μ l), provocó la inhibición del crecimiento de los tres hongos. Las fracciones con un Rf por debajo de 0.3 tienen una actividad antifúngica menor, ya que a dosis más bajas no se observaron halos de inhibición, aunque sí promovieron la esporulación.

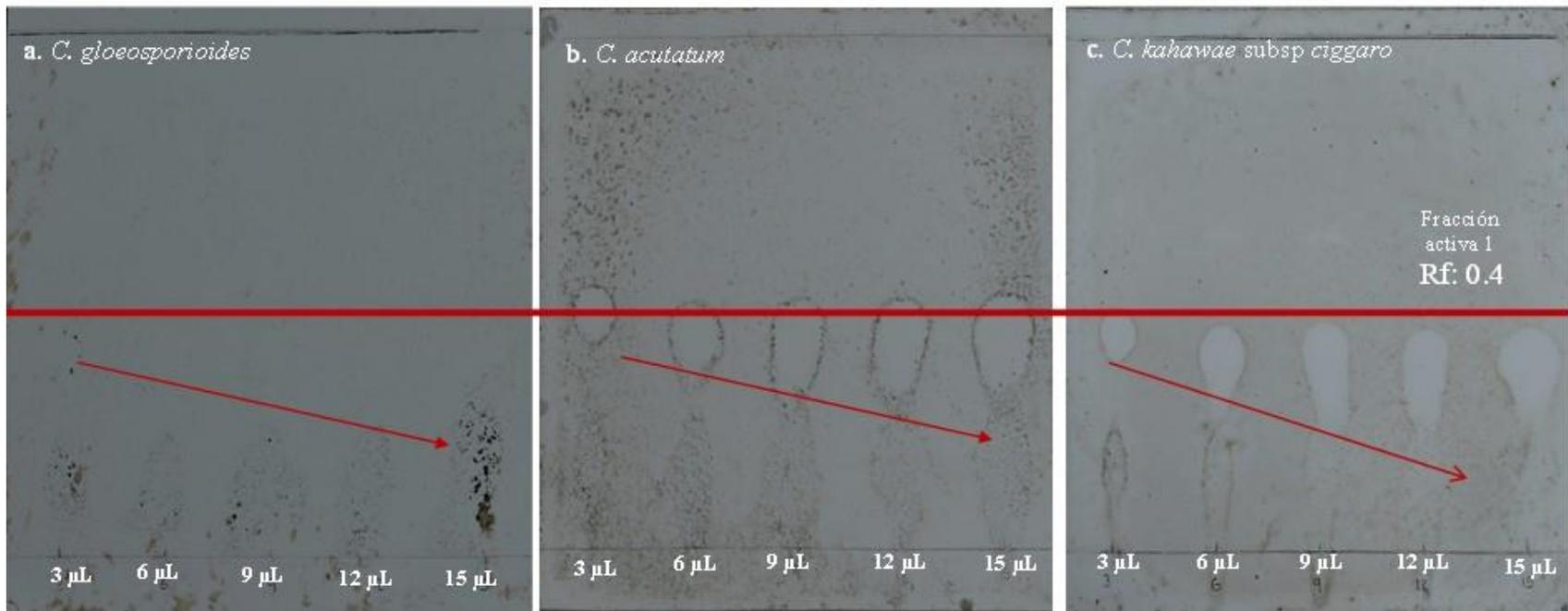


Figura 24. Actividad antifúngica de las fracciones del extracto de metanol del sobrenadante de *Bacillus velezensis* IG1244 a diferentes dosis. Ensayo de autobiografía con: A) *C. gloeosporioides*; B) *C. acutatum* C) *C. kahawae* subsp *ciggaro*. Las dosis utilizadas se observan en la figura.

6.7. Caracterización Química de las Fracciones Antifúngicas

6.7.1. Caracterización de las Fracciones Bioactivas Mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC)

En la Figura 25 se presentan los cromatogramas del extracto metanólico del sobrenadante de *Bacillus velezensis* IG1244, empleando diferentes reveladores y el resultado de la autobiografía en una cromatoplaaca corrida en las mismas condiciones.

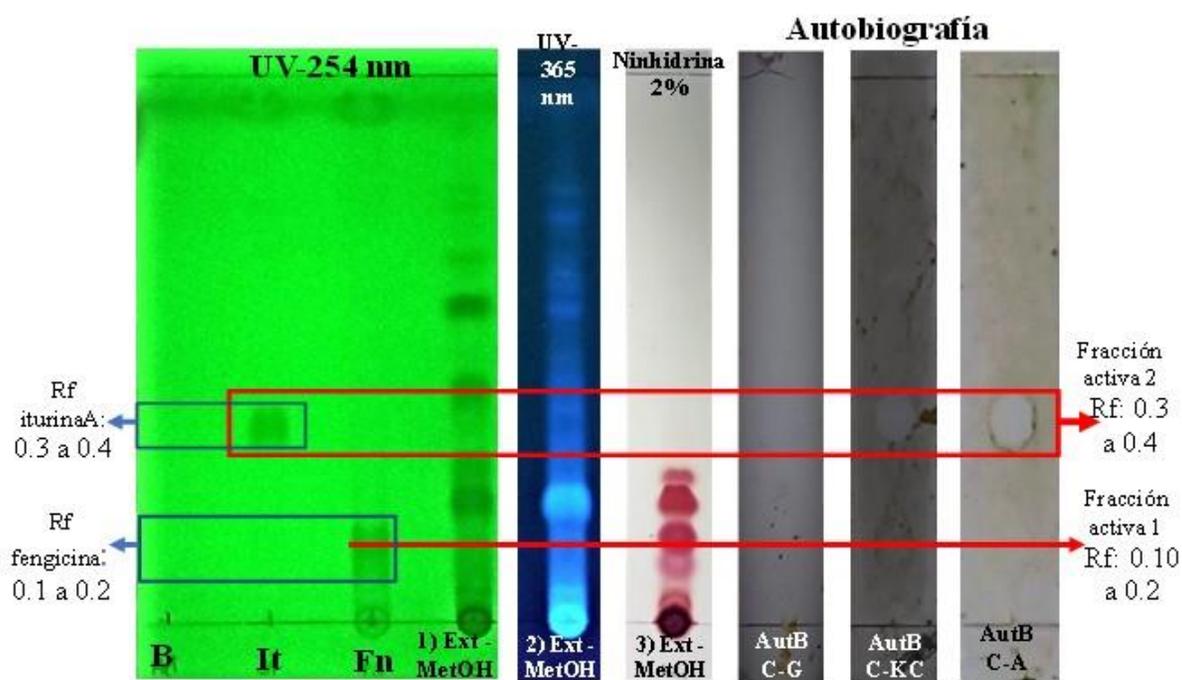


Figura 25 Cromatogramas del extracto metanólico del sobrenadante de *Bacillus velezensis* IG1244. Se emplea una dosis de 12 μ l del extracto, 50 μ l de los estándares y 6 μ l del extracto para las autobiografías. Como eluyente se utilizó cloroformo/metanol/agua 60/25/4 v/v/v. (B) Blanco-Metanol, (It) estándar de iturina-A, (Fn), estándar de fengicina, (1. Ext-MetOH) extracto de metanol revelado UV-254 nm, (2. Ext-MetOH) extracto de metanol revelado UV-365 nm, (3. Ext-MetOH) extracto de metanol revelado con ninhidrina al 2%, (AutB C-G) autobiografía con *C. gloeosporoides*, (AutB C-KC) autobiografía con *C. kahawae* subsp *ciggaro*, (AutB C-A) autobiografía con *C. acutatum*.

Como se observa en la figura 25, la fracción con un factor de retardo (Rf) de 0.3 a 0.4, presenta una fuerte actividad antifúngica para las tres especies de *Colletotrichum* del estudio. En las cromatoplasmas reveladas con UV a 254 nm y 365 nm, se presentan manchas tenues que denotan la presencia de al menos 3 o más compuestos en baja concentración o de escasa actividad a la luz UV, pero de alta potencia en su actividad fungicida. Un estándar de Iturina A, tuvo correspondencia con el rango del factor de retardo de la fracción, por lo que pudiera tratarse de algún compuesto de dicha familia. A su vez, en el cromatograma del extracto, revelado con ninhidrina, no se observa ningún compuesto con el mismo factor de retardo. Esto no desvirtúa el hecho de que pudiera tratarse de algún(os) LPC(s) de la familia de las iturinas ya que se ha reportado que estos compuestos pueden dar un revelado negativo a la ninhidrina. Por ejemplo, en el estudio de Yu *et al.* (2002), separaron por TLC el extracto antifúngico de la cepa de *B. amyloliquifaciens* B94 y encontraron tres fracciones con Rf similares, con reacción negativa a la ninhidrina. Los autores mencionaron que los compuestos antifúngicos no contenían grupos amino libres, pero sí presentaban enlaces peptídicos. Posteriormente, a partir de estas tres fracciones negativas a ninhidrina, ellos identificaron mediante espectrometría de masas tres isoformas de iturina A.

Asimismo, en la figura 25 se observa una segunda fracción bioactiva con un Rf entre 0.1 y 0.2 que, en comparación a la primera fracción bioactiva, presenta una menor actividad antifúngica, no provoca halos de inhibición, pero sí promueve la esporulación del hongo (manchas de mayor intensidad en los bordes y con estructuras esporulantes vistas al microscopio). Esta segunda fracción revelada bajo luz UV a 254 nm y 365nm es más intensa que la primera fracción, indicando de que podrían encontrarse compuestos en mayor concentración que en la primera fracción y/o tener componentes más activos a la luz UV. Esta segunda fracción, a diferencia de la primera, dio un revelado positivo a la ninhidrina, lo que significa que podría contener metabolitos con grupos amino libres. Se corrió un estándar de fengicina en las mismas condiciones, marcando un Rf entre 0.1 y 0.2, similar al observado para la segunda fracción bioactiva. Igualmente, el estándar de fengicina mostró actividad a la luz UV (254 y 365 nm) por lo que esta segunda fracción podría contener al menos un compuesto perteneciente a la familia de las fengicinas.

De acuerdo con las polaridades de la fase estacionaria (silica gel) y la fase móvil, se puede mencionar que la migración de los compuestos en las placas de TLC es inversamente proporcional a su polaridad; es decir, aquellos compuestos menos polares migrarán más y viceversa. En este sentido, se puede concluir que la primera fracción (Rf 0.3-0.4) contiene compuestos menos polares

que la segunda (Rf 0.1-0.2), lo que lleva a inferir que, a mayor polaridad de los compuestos, menor es la actividad antifúngica.

Cabe mencionar, la polaridad de una molécula depende de su estructura y de las cargas eléctricas presentes en ella. En el caso de las fengicinas, estas contienen un grupo amino (-NH₂) en uno de sus extremos y un grupo carboxilo (-COOH) en el otro extremo, lo que les confiere polaridad. Además, tienen varios grupos hidroxilo (-OH) en su estructura, lo que también aumenta su polaridad. Por otro lado, las iturinas tienen una estructura que contiene principalmente aminoácidos hidrofóbicos, lo que les confiere una menor polaridad que las fengicinas (Ahimou *et al.*, 2000). Estos antecedentes y los estándares utilizados elevan la probabilidad de que la primera y segunda fracción bioactiva contienen compuestos pertenecientes a las familias de las itutinas y fengicinas, respectivamente, aunque de acuerdo con los cromatogramas, cada una de dichas fracciones podría contener varios compuestos ya que las manchas no están plenamente definidas y se ven barridos en las zonas de actividad antifúngica.

6.7.2. Identificación de Lipopéptidos de la Fracción Bioactiva (Rf 0.1 a 0.2) a Través de ESI-MS

Los lipopéptidos de la fracción Rf 0.1-0.2 se caracterizaron mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización. Los iones precursores y sus aductos se enumeran en el Cuadro 8. La información sobre los espectros de masas con los iones precursores se proporciona en el anexo 1. Se detectaron cuatro isoformas de fengicina A [C₁₅, C₁₆, C₁₇ y C₁₈.] y tres isoformas de fengicina B. [C₁₅, C₁₆ y C₁₇.]. Los resultados fueron consistentes con los espectros estándar y con otros trabajos (Bidima *et al.*, 2022; Vater *et al.*, 2002).

Cuadro 8 Lipopéptidos de la fracción antifúngica (Rf 0.15) de *Bacillus velezensis* IG1244 identificado por ESI-MS.

Lipopéptidos	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	R*
Fengicina A	1449.18	1472.9		C15
		1483.38	1503.9	C16
		1500.3		C17
		1514.9	1531.6	C18
Fengicina B	1477.9			C15
	1491.77		1554.98	C16
		1528.01		C17
	1519.09	1542.09		C18

6.7.3. Identificación de la Fracción Antifúngica (Rf 0.3-0.4) por UPLC-ESI-MS

Se caracterizaron compuestos químicos en la fracción bioactiva (Rf 0.3-0.4) mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. Se realizó la ionización en modo positivo y negativo, cuyos cromatogramas se presentan en las figuras 26 y 27 respectivamente. En modo positivo, se observaron 32 picos con diferentes tiempos de retención, cada uno con sus respectivos espectros de masas. En modo negativo, se observaron 22 picos.

Los espectros encontrados (en modo positivo y negativo) se sometieron a análisis de comparación y búsqueda masiva en bases de datos de acceso público del GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). Los espectros de masas resultantes del análisis se presentan en los anexos 2 (modo +) y 3 (modo -). Los enlaces de la identificación de compuestos se encuentran en el anexo 4. Finalmente, los compuestos que mostraron correspondencia con los iones moleculares y fragmentos de masas reportados en las bases de datos son presentados en el Cuadro 9.

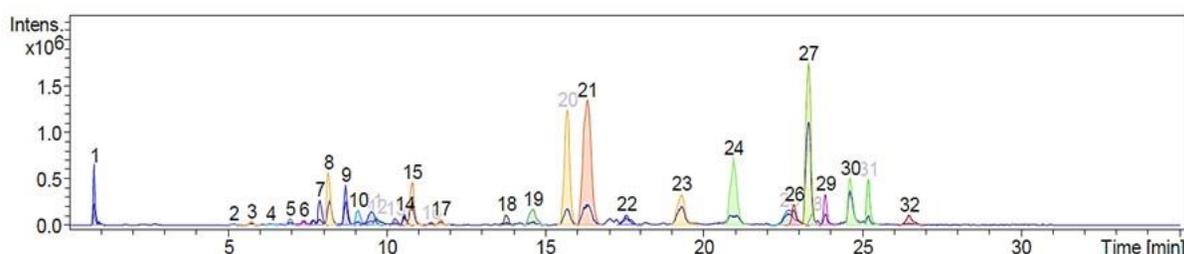


Figura 26 Perfil de compuestos de la fracción Rf 0.3 a 0.4 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo positivo

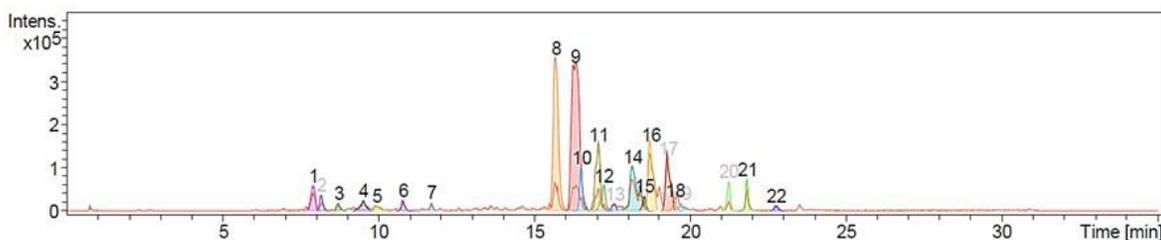


Figura 27 Perfil de compuestos de la fracción Rf 0.3 a 0.4 por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización en modo negativo

Cuadro 9 Compuestos identificados de la fracción antifúngica (Rf 0.3-0.4) de *Bacillus velezensis* IG1244 por UPLC-ESI-MS

Compuesto	Modo de Ionización		TR (min)	m/z	PM	Características	Referencia
	[H] +	[H] -					
Ofloxacino	•		5.2	362.15 1	361.36	Es un antibiótico sintético perteneciente a fluoroquinolonas, se usa para tratar infecciones bacterianas, que actúan inhibiendo la ADN girasa.	Al-Omar (2009)
Bromfeniramina	•		5.7	319.08	318.07 3	Es un antihistamínico que se usa comúnmente en medicamentos para tratar las alergias y los síntomas del resfriado común. No se conoce ningún de uso directo en la agricultura.	Mohamed <i>et al.</i> (2020)
Ácido asperulosídico	•		10.6	455.11 ^a	432.12 7	Es un compuesto orgánico que se encuentra en varias plantas, incluyendo algunas especies del género <i>Aspérula</i> , de donde se deriva su nombre. Se ha demostrado que tiene una variedad de actividades biológicas y farmacológicas, incluyendo efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales y antimicrobianos.	Chen <i>et al.</i> (2012)
Ácido glicólico	•		22.7	484.32	483.32	Se sintetiza a través de una vía metabólica conocida como la vía del glioxilato. En esta vía, el ácido acético se convierte en ácido glioxílico, que luego se convierte en ácido glicólico a través de una serie de reacciones bioquímicas.	Megraw-Robert <i>et al.</i> (1964)
3-[3-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil]-4-hidroxifenil]-7-hidroxicromen-4-ona	•		23.3	803.35 4 ^b	390.18 2	Denominado como Corylifol A es un flavonoide producido por <i>Aspergillus flocculosus</i> , tiene varias actividades biológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales y antivirales.	Xu <i>et al.</i> (2019)

Examestano o 6-metileneandrosta-1,4-dieno-3,17-diona	●	7.9	593.36 2 ^c	296.17 8	Es un compuesto que se utiliza para tratar el cáncer de mama, es un inhibidor de aromataasa, lo que significa que interrumpe un paso crítico en la síntesis de estrógenos del cuerpo.	Scholar (2007)
Mevastatina	●	9.5	399.21 5	---	Es un agente antifúngico sintético que se derivó originalmente de la compactina y fue aislado inicialmente de <i>Penicillium</i> y es considerado una estatina. Su aplicación en agricultura es de antifúngico contra diversos hongos fitopatógenos, incluyendo <i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. y <i>Colletotrichum</i> spp.	Valentovic (2007)
[(2 R)-1-[2-aminoetoxi(hidroxil)fosforil]oxi-3-hidroxiopropan-2-il] (Z)-hexadec-9-enoato	●	10.0	452.27 8	---	Es un glicerofosfolípido, componente importante de las membranas celulares y también involucrado con la movilidad de microorganismos.	Scheek <i>et al.</i> (1997)
Panaxadiol	●	18.5	483.38 ^a	460.39 2	Es un compuesto orgánico que se encuentra en varias especies de ginseng, incluyendo el <i>Ginseng panax</i> . Se ha demostrado que tiene varias propiedades farmacológicas, antitumoral, antiinflamatorio. Es un triterpenoide.	Wang <i>et al.</i> (2020)
Simvastatina	●	18.7	483.30 9	---	Es una estatina al igual que la mevastatina, se utiliza para reducir el colesterol. Sin embargo, no hay estudios de aplicación en agricultura.	
Espermidina	●	19.5	423.41 9	424.42 6	Es una poliamina que promueve la formación de biopelículas en <i>Bacillus</i> al activar la transcripción del exopolisacárido para la matriz de la biopelícula. No es necesaria para el crecimiento de la bacteria, pero sí para la producción de biopelículas.	Hobley <i>et al.</i> (2017)
Surfactina	●	21.8	1036.6 9	---	Como se mencionó en el apartado 2.4.1, la surfactina es un lipopéptido cíclico con actividad antimicrobiana, varias cepas de <i>Bacillus</i> lo producen.	

TR: Tiempo de retención. **PM:** Peso molecular. **m/z:** Ion precursor. **(a)** El ion precursor corresponde a un aducto de sodio [Na]⁺. **(b)** El ion precursor corresponde a un aducto de dos veces la molécula más un ion sodio [2M+Na]⁺. **(c)** El ion precursor corresponde a un aducto de dos veces la molécula más un protón [2M+H].

En cuanto a los compuestos encontrados en bases de datos correspondientes a la fracción con mayor actividad antifúngica (Rf 0.3-0.4), se puede mencionar que la bromfeniramina de peso molecular 318.073 g/mol con m/z 319.08 y el examestano de peso molecular 296.178 g/mol con ion precursor 593.362 m/z que corresponde a un aducto de $[2M+H]^+$ son compuestos sintéticos sin relación con las bacterias. Esto hace muy poco probable que sean los compuestos buscados. También, se han seleccionado como compuestos probables al ácido asperulosídico de peso molecular 432.127 g/mol, con ion precursor 455.11 m/z, que contiene a un aducto de $[Na]^+$ y el panaxadiol de peso molecular 460.392 g/mol con m/z de 483.38 que contiene a otro aducto de $[Na]^+$. Sin embargo, sólo existen reportes de que ambos compuestos sólo son sintetizados por algunas plantas por lo que es poco probable que se trate de estos compuestos o en su defecto sería el primer reporte sobre su síntesis por bacterias.

Por otro lado, el ofloxacino, con un peso molecular de 361.36 g/mol y m/z de 362.151, es un antibiótico sintético que las bacterias tampoco son capaces de producir, pero sí, sus homólogas las quinoxalinas, como las triostinas o quinomicinas, que son sintetizadas por algunas actinobacterias del género *Streptomyces* (Glund *et al.*, 1990). Sin embargo, las quinoxalinas biosintéticas son moléculas más grandes que las de síntesis química. Además, no se ha reportado que el género *Bacillus* sea capaz de sintetizar quinoxalinas. Lo mismo ocurre con la mevastatina con ion precursor de 399.215 m/z y la simvastatina con ion precursor 483.309 m/z, que son estatinas sintéticas con aplicación antifúngica. Aunque algunos hongos del género *Penicillium* pueden sintetizar estatinas antifúngicas como la compactina diol lactona, de peso molecular de 306 g/mol y estructura similar a la mevastatina (Valentovic, 2007), sin embargo, no se ha reportado que bacterias sean capaces de sintetizar estatinas.

De igual manera, el Corylifol A, con un peso molecular de 390.18 g/mol con ion precursor de 803.354 m/z que contiene a un aducto de $[2M+Na]^+$ es un flavonoide producido por *Aspergillus* con capacidad antimicrobiana, pero las bacterias no pueden sintetizar flavonoides. Por lo tanto, aunque el ofloxacino, mevastatina, simvastatina y Corylifol A tengan propiedades antibióticas, existe poca probabilidad que sea la identidad química real de los compuestos con actividad antifúngica producidos por *B. velezensis*.

No obstante, el ácido glicólico de peso molecular 483.32 g/mol con m/z de 484.32 y el glicerofosfolípido de m/z 452.278, son compuestos que *Bacillus* es capaz de sintetizar y que están involucrados en funciones básicas, como el metabolismo energético y la pared celular

respectivamente (Megraw-Robert *et al.*, 1964; Scheek *et al.*, 1997). pero no existen reportes sobre alguna propiedad antifúngica de estos compuestos. En el caso de la espermidina de peso molecular 424.426 g/mol y m/z de 423.419, es una poliamina que promueve la formación de biopelículas de *Bacillus* (Hobley *et al.*, 2017), lo cual sugiere que *B. velezensis* IG1244 podría formar biopelículas, un aspecto beneficioso para la colonización de la rizosfera, aunque tampoco existen reportes sobre una posible actividad antifúngica.

Otro metabolito encontrado es la surfactina con ion precursor de 1036.69 m/z, un lipopéptido cíclico reportado como antifúngico que varias cepas de *B. velezensis* pueden sintetizar. Cabe recalcar, que existen algunos espectros que no se pudieron identificar, entre ellos, algunos iones precursores, superiores a 1600 m/z, lo que sugiere la posibilidad de nuevas isoformas de lipopéptidos cíclicos.

En resumen, de los diferentes compuestos contenidos en la fracción más activa, únicamente logró ser identificada una surfactina, que por los antecedentes de la literatura tiene una alta probabilidad de ser uno de los compuestos bioactivos, junto con otros lipopéptidos no identificados de mayor peso molecular. Sin embargo, existen varios compuestos de menor peso molecular y que no tienen una naturaleza peptídica que pudieran ser también bioactivos pero que por los estudios realizados en el presente trabajo, no pudieron ser identificados plenamente. Dada la importancia de la contribución a la química de productos naturales, la biología del género *Bacillus* y las aplicaciones biotecnológicas potenciales, es necesario extender los estudios de espectrometría de masas con mayor profundidad y complementar con técnicas de resonancia magnética nuclear para tener una mejor caracterización e identificación de los metabolitos bioactivos producidos por *B. velezensis*

7. CONCLUSIONES

La cepa identificada como *Bacillus velezensis* IG1244 cumple un mecanismo de antibiosis para el control biológico de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum kahawae* subsp *ciggaro* y *Colletotrichum acutatum*, causantes de antracnosis en aguacate. Los metabolitos antifúngicos producidos por la cepa fueron identificados como lipopéptidos cíclicos de la familia de surfactina y fengicina, por lo que se confirma parcialmente la hipótesis, ya que no se pudo confirmar la presencia de iturina como antifúngico, sin embargo, nuestro estudio sugiere que la cepa sintetiza metabolitos antifúngicos no lipopeptídicos, que no se han podido elucidar en este trabajo.

8. RECOMENDACIONES

- Secuenciar el genoma completo de *Bacillus velezensis* IG1244 con el fin de saber la identidad certera de la bacteria, además, de investigar a detalle su espectro antimicrobiano y promotor del crecimiento vegetal mediante análisis de genómica comparativa.
- Llevar a cabo un estudio utilizando resonancia magnética nuclear para identificar los metabolitos antifúngicos y sus respectivas estructuras químicas de la fracción Rf 0.3 a 0.4 correspondiente al extracto metanólico del sobrenadante de *Bacillus velezensis* IG1244.
- Realizar un estudio para comprobar la capacidad de *Bacillus velezensis* IG1244 de formar biopelículas, y los beneficios que esto trae en la aplicación en campo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3), 207-228
- Aguado-Santa Cruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21
- Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 749-754
- Al-Ali, A., Davel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., & Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29910-29920
- Al-Omar, M. A. (2009). Chapter 6 - Ofloxacin. In H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 34, pp. 265-298): Academic Press.
- Ali, S. A. M., Sayyed, R. Z., Mir, M. I., Khan, M. Y., Hameeda, B., Alkhanani, M. F., . . . Poczai, P. (2022). Induction of Systemic Resistance in Maize and Antibiofilm Activity of Surfactin from *Bacillus velezensis* MS20. *Frontiers in microbiology*, 13, 879739
- Bareia, T., Pollak, S., & Eldar, A. (2018). Self-sensing in *Bacillus subtilis* quorum-sensing systems. *Nature Microbiology*, 3(1), 83-89
- Ben-Gharsa, H., Bouri, M., Mougou-Hamdane, A., Schuster, C., Leclerque, A., & Rhouma, A. (2021). *Bacillus velezensis* strain MBY2, a potential agent for the management of crown gall disease. *PLOS ONE*, 16(6), e0252823
- Bhore, S. J., Ochoa, D. S., Al-Houssari, A., Zelaya-Lopez, A., Yang, R., Chen, Z., . . . Zhang, Z. (2021). The Avocado (*Persea americana* Mill.): A Review and Sustainability PerspectiveS. *Preprints.org*
- Bidima, M. G. S., Chtaina, N., Ezzahiri, B., El Guilli, M., Barakat, I., & El Kamli, T. (2022). Antifungal activity of bioactive compounds produced by the endophyte *Bacillus velezensis* NC318 against the soil borne pathogen *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Protection Research*, 62(4), 326-333
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111208
- Chen, S., Wang, Y., Schnabel, G., Peng, C. A., Lagishetty, S., Smith, K., . . . Yuan, H. (2018). Inherent Resistance to 14 α -Demethylation Inhibitor Fungicides in *Colletotrichum truncatum* Is Likely Linked to CYP51A and/or CYP51B Gene Variants. *Phytopathology*, 108(11), 1263-1275
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved

- genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864
- Chen, Y. F., Zhang, J.-y., Zhao, M.-h., Yan, M., Zhao, Q.-c., Wu, Q., . . . Shi, G.-b. (2012). The analgesic activity and possible mechanisms of deacetyl asperulosidic acid methyl ester from *Ji shi teng* in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(4), 585-592
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691
- Choub, V., Ajuna, H., Won, S.-J., Moon, J.-H., Choi, S.-I., Maung, C. E. H., . . . Ahn, Y. S. (2021). Antifungal Activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against Anthracnose Disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and Growth Promotion of Walnut (*Juglans regia* L.) Trees. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10438
- Choub, V., Maung, C. E. H., Won, S.-J., Moon, J.-H., Kim, K. Y., Han, Y. S., . . . Ahn, Y. S. (2021). Antifungal Activity of Cyclic Tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against Plant Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pathogens*, 10(2), 209
- Choub, V., Won, S.-J., Ajuna, H. B., Moon, J.-H., Choi, S.-I., Lim, H.-I., & Ahn, Y. S. (2022). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Horticulturae*, 8(6), 557
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group- *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*-revealed by pan-genome analysis. *Food Microbiol*, 77, 146-157
- Da Costa-Fernandes, G., De Prado-Costa, D. K., De Oliveira, N. S., De Sousa, E. C. P., Machado, D. H. B., Polanczyk, R. A., . . . Da Silva, M. C. (2022). Genetic diversity of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates with toxicity against *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*). *Scientific Reports*, 12(1), 14408
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 103, 80-100
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., . . . Ellis, J. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430
- Devi, S., Kiesewalter, H. T., Kovács, R., Frisvad, J. C., Weber, T., Larsen, T. O., . . . Ding, L. (2019). Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(3), 142-149
- Dhouib, H., Zouari, I., Ben-Abdallah, D., Belbahri, L., Taktak, W., Triki, M. A., & Tounsi, S. (2019). Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease. *Biological Control*, 139, 104092
- Díaz-Rodríguez, A. M., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., & De los Santos Villalobos, S. (2019). Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology*, 28(5), 569-577
- Dunlap, C. A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus*

amyloliquefaciens subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. International journal of systematic evolutionary microbiology, 66(3), 1212-1217

- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869-878
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22
- Fan, B., Carvalhais, L. C., Becker, A., Fedoseyenko, D., Von Wirén, N., & Borriss, R. (2012). Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, 12(1), 116
- Fazle-Rabbee, M., & Baek, K.-H. (2020). Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. *Molecules*, 25(21), 4973
- Fernández, A., Villaverde, M., Casanova, J., Malo, J., Nicolas, J. A., & Blanca, I. (2004). Nuevo aislado de *Bacillus* y su utilización para el control de hongos fitopatógenos. *Agroecologia. net*, 6, 50-57
- Fonseca, P. E. R., & Escobar, J. V. (2019). Protocolo para el almacenamiento y maduración de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) en Antioquia.
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596-605
- Freitas, D. B., Reis, M. P., Lima-Bittencourt, C. I., Costa, P. S., Assis, P. S., Chartone-Souza, E., & Nascimento, A. M. A. (2008). Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. *BMC Research Notes*, 1(1), 92
- Fuentes-Aragón, D., Silva-Rojas, H. V., Guarnaccia, V., Mora-Aguilera, J. A., Aranda-Ocampo, S., Bautista-Martínez, N., & Téliz-Ortíz, D. (2020). *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. *Plant Pathology*, 69(8), 1513-1528
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., . . . Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 5-5
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105, 27-39
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330
- Glund, K., Schlumbohm, W., Bapat, M., & Keller, U. (1990). Biosynthesis of quinoxaline antibiotics: purification and characterization of the quinoxaline-2-carboxylic acid activating enzyme from *Streptomyces triostinicus*. *Biochemistry*, 29(14), 3522-3527
- Hashem, M., Mostafa, Y. S., Alamri, S., Abbas, A. M., & Eid, E. M. (2021). Exploitation of Agro-Industrial Residues for the Formulation of a New Active and Cost Effective Biofungicide to

Control the Root Rot of Vegetable Crops. Sustainability, 13(16), 9254

- Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Salazar-García, S., & Gutiérrez-Martínez, P. (2020). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate 'Hass' para exportación en Michoacán. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(7), 1647-1660
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15-25
- Hiti-Bandaralage, J., Hayward, A., O'Brien, C., Gleeson, M., Nak, W., & Mitter, N. (2019). Advances in avocado propagation for the sustainable supply of planting materials. In *Achieving sustainable cultivation of tropical fruits* (pp. 215-238): Burleigh Dodds Science Publishing.
- Hobley, L., Li, B., Wood, J. L., Kim, S. H., Naidoo, J., Ferreira, A. S., . . . Michael, A. J. (2017). Spermidine promotes *Bacillus subtilis* biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR. *J Biol Chem*, 292(29), 12041-12053
- Hofstein, R., & Chapple, A. (1999). Commercial Development of Biofungicides. In F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Biopesticides: Use and Delivery* (pp. 77-102). Totowa, NJ: Humana Press.
- Jacques, P., Hbid, C., Vanhentenryck, F., Destain, J., Bare, G., Razafindralambo, H., . . . Thonart, P. (1994). Quantitative and qualitative study of the production of broad-spectrum antifungal lipopeptides from *Bacillus subtilis* S499.
- Jiménez, R. R., Alvarado, G., Ruepert, C., Ballesteros, E., & Sommer, S. (2021). The Fungicide Chlorothalonil Changes the Amphibian Skin Microbiome: A Potential Factor Disrupting a Host Disease-Protective Trait. *Applied Microbiology*, 1(1), 26-37
- Jin, P., Wang, H., Tan, Z., Xuan, Z., Dahar, G. Y., Li, Q. X., . . . Liu, W. (2020). Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 102-107
- Jumpathong, W., Intra, B., Euanorasetr, J., & Wanapaisan, P. (2022). Biosurfactant-Producing *Bacillus velezensis* PW192 as an Anti-Fungal Biocontrol Agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*. *Microorganisms*, 10(5), 1017
- Kim, P.-I., Ryu, J.-W., Kim, Y.-H., Chi, Y.-T., & biotechnology. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology*, 20(1), 138-145
- Kim, T. Y., Hwang, S. H., Noh, J. S., Cho, J.-Y., & Maung, C. E. H. (2022). Antifungal Potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the Control of Different *Colletotrichum* Species through Isolation of Active Dipeptide, Cyclo-(D-phenylalanyl-D-prolyl). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7786
- Kim, Y. S., Lee, Y., Cheon, W., Park, J., Kwon, H.-T., Balaraju, K., . . . Jeon, Y. (2021). Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Scientific Reports*, 11(1), 626
- Kim, Y. T., Kim, S. E., Lee, W. J., Fumei, Z., Cho, M. S., Moon, J. S., . . . Kim, S. U. (2020). Isolation and characterization of a high iturin yielding *Bacillus velezensis* UV mutant with improved antifungal activity. *PLOS ONE*, 15(12), e0234177
- Kimaru, K. S., Muchemi, K. P., & Mwangi, J. W. (2020). Effects of anthracnose disease on

avocado production in Kenya. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), 1799531

- Kwon, J.-H., Choi, O., Lee, Y., Kim, S., Kang, B., & Kim, J. (2020). Anthracnose on postharvest avocado caused by *Colletotrichum kahawae* subsp. *ciggaro* in South Korea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(4), 508-513
- Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1), 12-20
- Li, F.-Z., Zeng, Y.-J., Zong, M.-H., Yang, J.-G., & Lou, W.-Y. (2020). Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms. *Journal of Biotechnology*, 323, 42-53
- Li, M., Feng, W., Yang, J., Gao, Z., Zhang, Z., Zhang, W., . . . Hu, M. (2022). First report of anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* on avocado fruits in China. *Crop Protection*, 155, 105922
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., . . . Kim, J. C. (2017). Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *Plant Pathol J*, 33(5), 488-498
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of applied microbiology*, 128(1), 242-254
- López, A. C., Fernández, L. A., & Alippi, A. M. (2020). Traceability of potential enterotoxigenic *Bacillus cereus* in bee-pollen samples from Argentina throughout the production process. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108816
- Lu, H., Li, R., Yang, P., Luo, W., Chen, S., Bilal, M., . . . Zhao, L. (2021). iTRAQ-BASED Proteomic Analysis of the Mechanism of Fructose on Improving Fengycin Biosynthesis in *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Molecules*, 26(20), 6309
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biological Control*, 127, 145-154
- Medeot, D. B., Bertorello-Cuenca, M., Liaudat, J. P., Alvarez, F., Flores-Cáceres, M. L., & Jofré, E. (2017). Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. *Biological Control*, 115, 119-128
- Medina, M. B., & Uknalis, J. (2011). Effects of sugar addition in Luria Bertani (LB) media on *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Safety*, 31(3), 386-394
- Meena, K. R., Tandon, T., Sharma, A., & Kanwar, S. S. (2018). Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(3), 091-098
- Megraw-Robert, E., & Beers-Russell, J. (1964). Glyoxylate Metabolism in Growth and Sporulation of *Bacillus Cereus*. *Journal of Bacteriology*, 87(5), 1087-1093
- Mohamed, D., Hegazy, M. A., El-Sayed, G. M., & Youssef, S. H. (2020). Greenness evaluation of different chromatographic approaches for the determination of dextromethorphan,

phenylephrine & brompheniramine in their pharmaceutical formulation. *Microchemical Journal*, 157, 104893

- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206-213
- Mora-Aguilera, J. A., Ríos-López, E. G., Yáñez-Zúñiga, M., Rebollar-Alviter, A., Nava-Díaz, C., Leyva-Mir, S. G., . . . Tovar-Pedraza, J. M. (2021). Sensitivity to MBC fungicides and prochloraz of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex isolates from mango orchards in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2), 481-491
- Moreno-Velandia, C. A., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2021). Biosynthesis of Cyclic Lipopeptides by *Bacillus velezensis* Bs006 and its Antagonistic Activity are Modulated by the Temperature and Culture Media Conditions. *Current Microbiology*, 78(9), 3505-3515
- Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Orduz, S., & Villegas-Escobar, V. (2014). Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 378-385
- Mullins, A. J., Li, Y., Qin, L., Hu, X., Xie, L., Gu, C., . . . Webster, G. (2020). Reclassification of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* BY-2 and Tu-100 as *Bacillus velezensis* and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. *Microbiology (Reading, England)*, 166(12), 1121-1128
- Munimbazi, & Bullerman. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of applied microbiology*, 84(6), 959-968
- Myo, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, 134, 23-31
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K., & Sarangi, P. K. (2019). Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101326
- Nam, M. H., Kim, H. S., Lee, H. D., Whang, K. S., & Kim, H. G. (2012). Biological control of anthracnose crown rot in strawberry using *Bacillus velezensis* NSB-1. Paper presented at the VII International Strawberry Symposium 1049.
- Nifakos, K., Tsalgatiidou, P. C., Thomloundi, E.-E., Skagia, A., Kotopoulis, D., Baira, E., . . . Katinakis, P. (2021). Genomic Analysis and Secondary Metabolites Production of the Endophytic *Bacillus velezensis* Bvell: A Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* Causing Bunch Rot in Post-Harvest Table Grapes. *Plants*, 10(8), 1716
- Nihorimbere, V., Fickers, P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. *Environmental microbiology reports*, 1(2), 124-130
- Noor, N. M., & Zakaria, L. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. associated with chili anthracnose in peninsular Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 151(4), 961-973

- Park, G., Nam, J., Kim, J., Song, J., Kim, P. I., Min, H. J., & Lee, C. W. (2019). Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 40(7), 704-709
- Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., & Domínguez, J. M. (2016). *Bacillus aryabhattai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 159
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P. S., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). *Bacillus lipopeptides* as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 70
- Pérez-Álvarez, S., Ávila-Quezada, G., & Coto-Arbelo, O. (2015). El aguacatero (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111-123
- Phoulivong, S., McKenzie, E. H., & Hyde, K. D. (2012). Cross infection of *Colletotrichum species*; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(2), 99-111
- Pliego-Alfaro, F., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., Pliego, C., Barceló-Muñoz, A., López-Gómez, R., . . . Litz, R. E. (2020). *Persea americana* avocado. In *Biotechnology of fruit and nut crops* (pp. 258-281): CAB International Wallingford UK.
- Pozo, Y. R., Flores, D. V., Romero, L. C., Pérez, E. G., & Rivera, V. P. Á. (2004). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 8(3), 35-40
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K.-h. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046
- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18
- Ranade, S. S., & Thiagarajan, P. (2015). A review on *Persea Americana* Mill.(Avocado)-Its fruit and oil. *PharmTech Res*, 8(6), 72-77
- Regassa, A. B., Cho, J. Y., & Kim, K. Y. (2020). Identification and characterization of Methyl succinate from *Bacillus velezensis* AR1. *Australasian Plant Pathology*, 49(4), 357-365
- Regassa, A. B., Cho, J. Y., & Kim, K. Y. (2021). Purification and identification of a new antifungal dipeptide from *Bacillus velezensis* AR1 culture supernatant. *Pest Management Science*, 77(2), 775-779
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartín, P., Camacho-Chab, J. C., De la Rosa-García, S. C., Chan-Bacab, M. J., Águila-Ramírez, R. N., . . . Ortega-Morales, B. O. (2020). Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control*, 141, 104127
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum subsp. nov. *International journal of systematic evolutionary microbiology*, 59(10), 2429-2436
- Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus*

velezensis sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 191-195

- Scheek, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21), 11179-11183
- Schneider, T., Müller, A., Miess, H., & Gross, H. (2014). Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *Int J Med Microbiol*, 304(1), 37-43
- Scholar, E. (2007). Exemestane. In S. J. Enna & D. B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-4). New York: Elsevier.
- Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233-1246
- Sherzad, Z., & Canming, T. (2020). A new strain of *Bacillus velezensis* as a bioagent against *Verticillium dahliae* in cotton: isolation and molecular identification. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 118
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V., & Tomashevich, N. S. (2020). Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1879-1885
- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899-908
- Silva, D. N., Talhinhos, P., Cai, L., Luzolo, M., Gichuru, E. K., Loureiro, A., . . . Batista, D. (2012). Host-jump drives rapid and recent ecological speciation of the emergent fungal pathogen *Colletotrichum kahawae*. *Molecular Ecology*, 21(11), 2655-2670
- Sturz, A. V., Christie, B. R., & Nowak, J. (2000). Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(1), 1-30
- Sur, S., Romo, T. D., & Grossfield, A. (2018). Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. *The journal of physical chemistry. B*, 122(8), 2219-2226
- Tapia-Rodríguez, A., Ramírez-Dávila, J. F., Salgado-Siclán, M. L., Castañeda-Vildózola, Á., Maldonado-Zamora, F. I., & Lara-Díaz, A. V. (2020). Distribución espacial de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en aguacate en el Estado de México, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 72-81
- Théatre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., . . . Medema, M. H. (2021). The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: Natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*, 9, 623701

- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11
- Toral, L., Rodríguez, M., & Béjar, V. (2018). Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in microbiology*, 9(1315)
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1151-1160
- Trinidad, Á. E., Ascencio-Valle, F. d. J., Ulloa, J. A., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., & Bautista-Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(SPE19), 3953-3964
- Ulloa-Ogaz, A. L., Muñoz-Castellanos, L. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. The battle against microbial pathogens: basic science, Technological advances and educational programs, 305-309
- Vahidinasab, M., Adiek, I., Hosseini, B., Akintayo, S. O., Abrishamchi, B., Pfannstiel, J., . . . Hausmann, R. (2022). Characterization of *Bacillus velezensis* UTB96, Demonstrating Improved Lipopeptide Production Compared to the Strain *B. velezensis* FZB42. 10(11), 2225
- Valentovic, M. (2007). Compactin. In S. J. Enna & D. B. Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-3). New York: Elsevier.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Singh, S. (2002). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. J. M. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability a review. *Molecules*, 21(5), 573
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. d. I. J. R. m. d. f. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130
- Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. In *Cellular molecular biology of filamentous fungi* (pp. 676-693).
- Wan, C., Fan, X., Lou, Z., Wang, H., Olatunde, A., & Rengasamy, K. R. R. (2021). Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13
- Wang, B., Liu, C., Yang, X., Wang, Y., Zhang, F., Cheng, H., . . . Liu, H. (2021). Genomics-guided isolation and identification of active secondary metabolites of *Bacillus velezensis* BA-26. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 35(1), 895-904

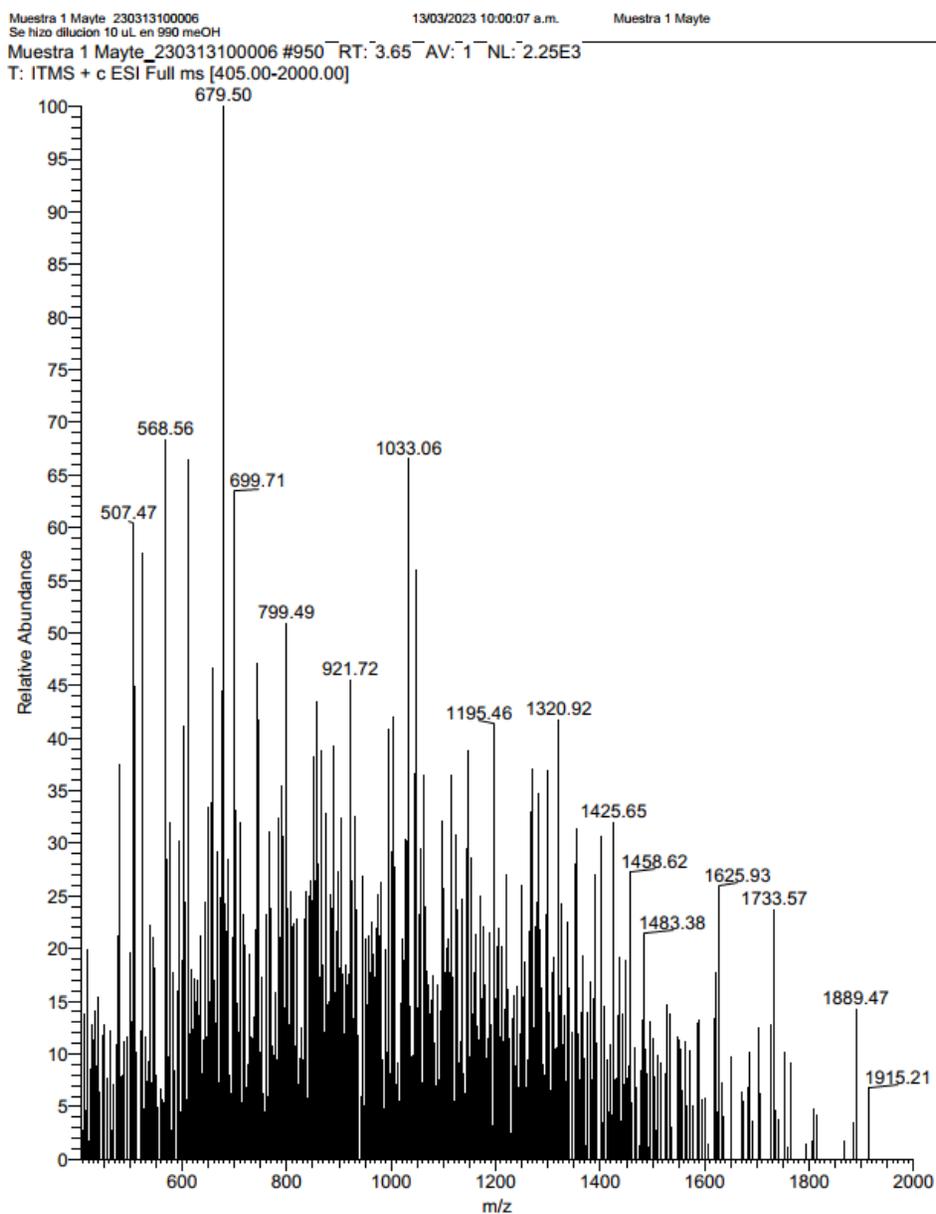
- Wang, C., Zhao, D., Qi, G., Mao, Z., Hu, X., Du, B., . . . Ding, Y. (2020). Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for Promoting the Growth of *Malus hupehensis* Rehd. and Inhibiting *Fusarium verticillioides*. *Frontiers in microbiology*, 10
- Wang, M., Li, H., Liu, W., Cao, H., Hu, X., Gao, X., . . . Li, D. (2020). Dammarane-type leads panaxadiol and protopanaxadiol for drug discovery: Biological activity and structural modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 189, 112087
- Weir, B. S., Johnston, P. R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 115-180
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1(18), 315-322
- Xiong, Z. R., Cobo, M., Whittal, R. M., Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2022). Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey. *PLOS ONE*, 17(4), e0266470
- Xu, J., Yi, M., Ding, L., & He, S. (2019). A Review of Anti-Inflammatory Compounds from Marine Fungi, 2000–2018. 17(11), 636
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955-963
- Zakaria, L. (2021). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops—A Review. *Agriculture*, 11(4), 297
- Zhang, Y., Li, T., Xu, M., Guo, J., Zhang, C., Feng, Z., . . . Qin, S. (2021). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 on oxidative stress and mitochondrial dysfunction of *Ceratocystis fimbriata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104777
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., . . . Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 5951-5960
- Zongwang, M., Zhang, S., Sun, K., & Hu, J. (2020). Identification and characterization of a cyclic lipopeptide iturin A from a marine-derived *Bacillus velezensis* 11-5 as a fungicidal agent to *Magnaporthe oryzae* in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(1), 15-24

10. ANEXOS

10.1. Espectro de la Fracción Rf 0.15

Ingresar al siguiente enlace para observar el espectro detalle:

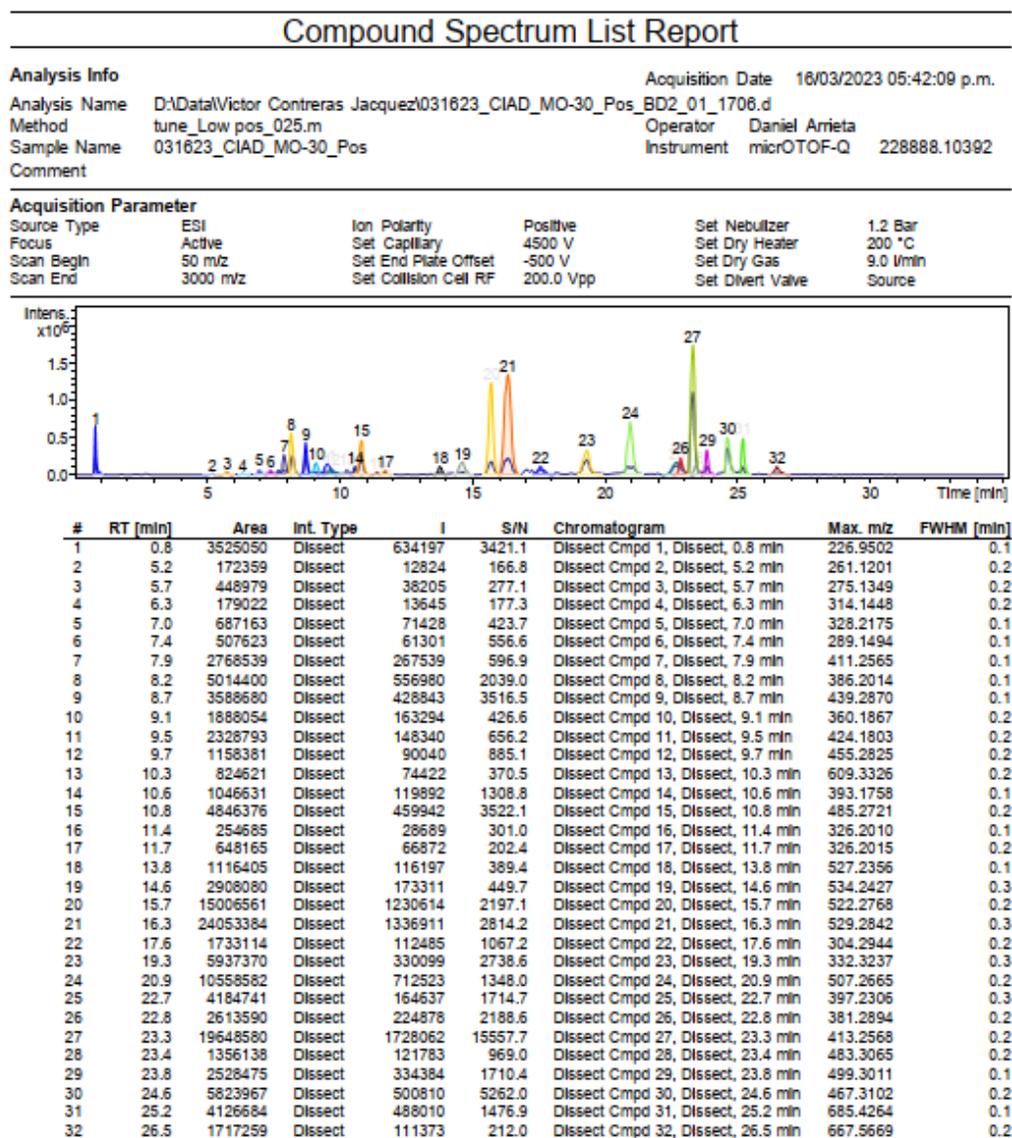
<https://drive.google.com/file/d/10X9gvDkMM3BEDeKrkaaXPrmu-E9X8PHE/view?usp=sharing>



10.2. Espectros de la Fracción Rf 0.3 a 0.4 Ionización Modo Positivo

Ingresar al siguiente enlace para observar todos los espectros:

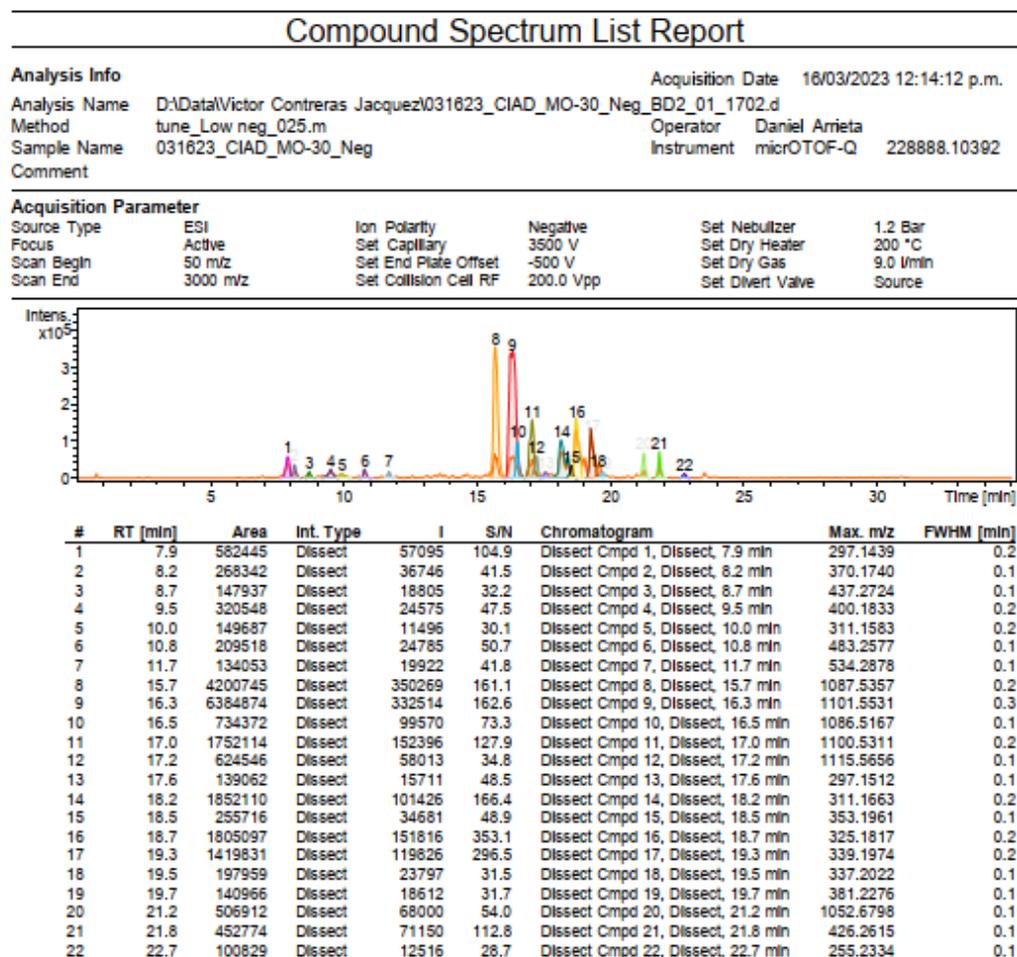
<https://drive.google.com/file/d/155v9upJPGw3DwfbHPHASbaNfke5qFvEv/view?usp=sharing>



10.3. Espectros de la Fracción Rf 0.3 a 0.4 Ionización Modo Negativo

Ingresa al siguiente enlace para observar todos los espectros:

https://drive.google.com/file/d/13nukg_L8e795ChMn_Hc8_Xl58bWdwsYM/view?usp=sharing



10.4. Enlaces de Acceso para la Identificación del Compuesto

Compuesto	Modo de Ionización		Acceso para la identificación del compuesto
	[H] ⁺	[H] ⁻	
Ofloxacín	•		https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ec0ece217c2f4f6e82933428ca6bf019
Bromfeniramina	•		https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=16bc9445a2a54e459e074195b2ba641c
Ácido asperulosídico	•		https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a11a9b9e2e214d669d2c454c2423433f
Ácido glicocólico	•		https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=efe3e1bb0bbd4e1cbbaf15f35eae5193
3-[3-[(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienil]-4-hidroxifenil]-7-hidroxicromen-4-ona	•		https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=aff43269cb754601ae15952e3c3b41fd
Examestano		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=efada6efd75c497893f0aacc5013c0f8
Mevastatina		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=f6e3a2d6e7bc41b38e4aef0741be05ab
[(2R)-1-[2-aminoetoxi(hidroxi)fosforil]oxi-3-hidroxiopropan-2-il] (Z)-hexadec-9-enoato		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=4501cd439c5c46cf876f30f5064049d9
Panaxadiol		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=5d94a978074644d4930d26394faab442
Simvastatina		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=a7343b7543784b7da2309e08f1907ad1
Espermidina		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=183dff50df414d4b946546f506a005df
Surfactina		•	https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000839966#%7B%7D