



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS MICROBIANOS FRENTE  
A PUDRICIONES RADICULARES EN AGUACATE  
GENERADAS POR *Phytophthora cinnamomi***

**Sara Ramírez Restrepo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias  
Medellín, Colombia

2016

# **EVALUACIÓN DE EXTRACTOS MICROBIANOS FRENTE A PUDRICIONES RADICULARES EN AGUACATE GENERADAS POR *Phytophthora cinnamomi***

**Sara Ramírez Restrepo**  
Biotecnóloga

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Biotecnología**

**Director:**

Sinar David Granada García, MSc. en Ciencias Químicas, Químico.

**Codirector:**

Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez, Ph.D., MSc. en Ciencias de Cultivos y Suelos, Biólogo  
Genetista.

**Línea de Investigación:**

Control Microbiológico

**Grupo de Investigación:**

Fitosanidad y Control Biológico

Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias  
Medellín, Colombia

2016

*A mi madre*

*Por siempre haber creído en mí. Por todo su  
esfuerzo, dedicación y paciencia.*

## Agradecimientos

A Dios por ser esa luz que necesitaba para continuar cuando pensaba que ya no tenía fuerzas para seguir.

A mi madre Luz Marina, a mi Hermano Alejandro y a mi novio Juan Carlos por su apoyo incondicional, su comprensión y por su inmenso amor en todo este proceso.

A mis tutores Sinar David Granada y Rodrigo Alberto Hoyos por lo aprendido, su paciencia y su amor para conmigo en cada uno de sus consejos para guiarme en esta formación que apenas comienza.

Al profesor Juan Carlos Pérez y al Dr. Salvador Ochoa Asencio por su asesoría, apoyo y consejos mientras realicé la maestría.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fitosanidad y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) porque sin su ayuda esto no hubiese sido posible.

A Gloria Rivas del Área Curricular en Biotecnología por todo su apoyo para que todo mi trabajo se vea recompensado.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), a la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (IUCMA) y al Sistema General de Regalías Antioquia por los recursos para desarrollar este trabajo de investigación y el apoyo incondicional con sus instalaciones.

A Colciencias, especialmente al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores.

## Resumen

La demanda mundial de aguacate supera su oferta en más de un 50% y existe la necesidad de buscar alternativas que permitan incrementar su producción. Sin embargo, la productividad de este cultivo es seriamente afectada por problemas fitosanitarios como la pudrición radicular causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. En este trabajo se evaluó la producción y actividad biológica frente a *P. cinnamomi*, de metabolitos extracelulares obtenidos a partir de aislamientos bacterianos asociados a plantas de aguacate en campo. Inicialmente se demostró la capacidad infectiva de aislamientos de *P. cinnamomi*. A través de pruebas de antagonismo *in vitro* se seleccionaron las bacterias AED38 y AED56 con base en su halo de inhibición. Posteriormente, los extractos metabólicos bacterianos fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* para verificar su capacidad de protección de plantas de aguacate frente a infecciones radiculares causadas por *P. cinnamomi*. El extracto AED38 demostró ser efectivo a una concentración de 60 mg/L, igualando el efecto de un fungicida sintético comercial a 0,5 mg/L.

**Palabras clave:** microbioma, rizósfera, control biológico, *Serratia* sp., metabolitos secundarios.

## Abstract

The global avocado demand exceeds its supply by more than 50%. New alternatives to increase avocado fruit production are necessary. However, the productivity of this crop is seriously affected by diseases such as root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands. In this study, the biological activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria against *P. cinnamomi* was evaluated. The bacterial isolates were obtained from healthy avocado trees in field. In the first place, the infectivity of several *P. cinnamomi* isolates was demonstrated. AED38 and AED56 were selected through antagonism assays, due to their highest inhibition halo. Metabolic extracts from promising bacteria were evaluated *in vitro* and *in vivo* to validate their capacity to protect avocado plantlets against root rot caused by *P. cinnamomi*. The extract showed to be effective at a concentration of 60 mg/L. The effect of the metabolic extract was not different to that of a commercial synthetic product at 0.5 mg/L.

**Keywords:** microbiome, rhizosphere, *Serratia* sp., secondary metabolics.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Capítulo 1. Patogenicidad de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> frente a raíces desprendidas de aguacate</b> .....	<b>7</b>
1.1 Antecedentes.....	7
1.2 Materiales y métodos.....	8
1.2.1 Medios de cultivo y reactivos.....	8
1.2.2 Microorganismos.....	9
1.2.3 Pruebas de virulencia.....	9
1.2.4 Análisis estadístico.....	10
1.3 Resultados y discusión .....	10
1.3.1 Pruebas de virulencia.....	10
<b>2. Capítulo 2. Capacidad antagonica frente a <i>P. cinnamomi</i> de bacterias asociadas al microbioma rizosférico de plantas de aguacate</b> .....	<b>15</b>
2.1 Antecedentes.....	15
2.2 Materiales y métodos.....	17
2.2.1 Microorganismos y medios de cultivo .....	17
2.2.2 Aislamiento de Microorganismos.....	17
2.2.3 Ensayos de antagonismo in vitro.....	18
2.2.4 Cinética de producción de metabolitos extracelulares con capacidad antagonica .....	18
2.2.5 Extracción de los metabolitos extracelulares.....	19
2.2.6 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos .....	19
2.2.7 Caracterización molecular de los microorganismos con mayor potencial	20
2.3 Resultados y discusión .....	20
2.3.1 Ensayos de antagonismo in vitro.....	20
2.3.2 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos .....	21

---

<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Evaluación de la efectividad de los extractos extracelulares en la protección de plántulas de aguacate frente a la pudrición de raíz generada por <i>P. cinnamomi</i></b> .....	<b>27</b>
3.1	Antecedentes .....	27
3.2	Materiales y métodos .....	28
3.2.1	Microorganismos y medios de cultivo .....	28
3.2.2	Obtención y extracción de los extractos microbianos de AED38 y AED56. ....	28
3.2.3	Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos.....	29
3.2.4	Pruebas de toxicidad de los extractos microbianos producidos en PDA sobre un modelo de Rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ).....	29
3.2.5	Efectividad de los extractos extracelulares <i>in vivo</i> .....	30
3.3	Resultados y discusión.....	32
3.3.1	Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos.....	32
3.3.2	Pruebas de toxicidad de los extractos microbianos.....	33
3.3.3	Efectividad de los extractos extracelulares <i>in vivo</i> .....	34
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>39</b>
4.1	Conclusiones.....	39
4.2	Recomendaciones.....	40
<b>A.</b>	<b>Anexo A: Preparación medio PDA PARBH o PDA con antibióticos</b> .....	<b>41</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo B: Preparación medio VK</b> .....	<b>43</b>
	<b>Referencias</b> .....	<b>45</b>



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1.</b> Pruebas de virulencia de aislamientos de <i>Phytophthora cinnamomi</i> y crecimiento de bacterias y hongos en muestras de raíz desprendida. Las letras corresponden a la prueba de comparación de medias de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un porcentaje de confiabilidad del 95%. 11	
<b>Figura 2-1.</b> Ensayos de antagonismo por cultivo dual (tres réplicas por ensayo). <b>A.</b> Control de <i>P. cinnamomi</i> <b>B.</b> Inhibición de <i>P. cinnamomi</i> frente a cuatro aislamientos bacterianos diferentes <b>C.</b> Control de <i>Colletotrichum</i> sp. <b>D.</b> Inhibición de <i>Colletotrichum</i> sp. frente a cuatro aislamientos bacterianos diferentes. <b>E.</b> Control de <i>Phomopsis</i> sp. <b>F.</b> inhibición de <i>Phomopsis</i> sp. frente a cuatro aislamientos bacterianos diferentes. .... 20	
<b>Figura 3-1:</b> Concentración mínima inhibitoria de <i>Serratia</i> sp. AED38 y <i>Serratia</i> sp. AED56 frente a <i>P. cinnamomi</i> . .... 32	
<b>Figura 3-2.</b> Fitotoxicidad de los extractos de <i>Serratia</i> sp. AED38 sobre rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ). <b>A.</b> Porcentaje de germinación. <b>B.</b> Peso fresco de las semillas germinadas a los 5 días del ensayo. .... 33	
<b>Figura 3-3.</b> Imágenes de la fitotoxicidad del extracto <i>Serratia</i> sp. AED38 en semillas de rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ). <b>A.</b> Control. <b>B.</b> 62,5 mg/L. <b>C.</b> 125 mg/L. <b>D.</b> 250 mg/L. . ¡Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 3-4.</b> Área bajo la curva del progreso de la infección de <i>P. cinnamomi</i> en plántulas de aguacate. Escala utilizada: 1. decaimiento de las hojas; 2. enrollamiento de las hojas en el tercio superior; 3. enrollamiento de las hojas en el tercio medio, cuarto; 4. enrollamiento de las hojas en el tercio inferior; 5. marchitez de la planta. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 95%. .... 35	
<b>Figura 3-5.</b> Plantas de aguacate al finalizar el experimento de actividad in vivo. <b>A.</b> Control Absoluto: plantas sin infectar con P35. <b>B.</b> Control de infección: plantas inoculadas con P35. <b>C.</b> Control Fungicida: plantas inoculadas con P35 + fungicida comercial (concentración final 0,5 mg/L). <b>D.</b> Tratamiento extracto AED38 (180 mg/L). <b>E.</b> Tratamiento extracto AED38 (120 mg/L). <b>F.</b> Tratamiento extracto AED38 (60mg/L)..... 36	

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1.</b> Aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> empleados en el estudio.....	9
<b>Tabla 2-1.</b> Rango de inhibición en ensayos de antagonismo de cada uno de los aislamientos obtenidos en los muestreos en el Municipio de Anserma, departamento de Caldas y el Oriente Antioqueño, Colombia.....	22
<b>Tabla 2-2.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/L frente a <i>P. cinnamomi</i> P35 de los extractos obtenidos a partir de AED38 y AED56.....	23

## Lista de ecuaciones

<b>Ecuación 3.1.</b> Cálculo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad.....	29
--	----

# Lista de abreviaturas

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>P. cinnamomi</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetros
mL	Mililitros
cm	Centímetros
min	Minutos
nm	Nanómetros
µL	Microlitros
mg/L	Miligramos por mililitro
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDA - PARBH	Agar PDA con PCNB, ampicilina, rifampicina, benomil e himexazol
TSA	Agar Tripticasa de Soya
PCNB	Pentacloronitrobenceno
AED	Aislado Endófito
ARP	Aislado de rizoplano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
PGPR	Bacterias promotoras de crecimiento
ABCPE	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

# Introducción

El aguacate es un fruta tropical que por sus propiedades nutritivas y características fisicoquímicas es altamente demandado por la industria debido a su gran potencial exportador, su alto valor nutritivo, sabor agradable, versatilidad, fácil preparación y amplias posibilidades de uso, tanto en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Dada su importancia en términos económicos y alimenticios hoy se cultiva en más de 59 países como: México, Colombia, Chile, Estados Unidos, Sud África, Israel, Perú, Australia, España, Kenia, entre otros, dando lugar a unas 400.000 hectáreas de cultivo distribuidas en diferentes regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Bernal, Diez, Tamayo, Cordoba, & Londoño, 2008; Mejía, 2010; Yabrudy, 2012).

En Colombia el cultivo del aguacate ha venido creciendo durante los últimos años, permitiendo al país ubicarse entre los principales productores a nivel mundial - quinta posición - con 13% del área total cultivada en el mundo (Páez, Salazar, Acosta, & López, 2016; G. J. G. Ramírez, Castañeda, & Morales, 2014; Yabrudy, 2012). En la actualidad, gracias a la ayuda del Ministerio de Agricultura, se fomenta el desarrollo del cultivo y su participación en el mercado internacional a través del apoyo en investigación y a pequeños productores, tanto en el proceso de siembra como en el manejo poscosecha, buscando así garantizar la calidad del producto final (Cañas, Galindo, Arango, & Saldamando, 2015; Mejía, 2010). Sin embargo, a pesar del rápido crecimiento y las postuladas ventajas agroclimáticas que tiene Colombia para la producción de aguacate, aún no se logra satisfacer su demanda interna.

Para responder al reto de competitividad y las exigencias del mercado con respecto a los demás países productores existe una necesidad creciente de incrementar los rendimientos en la producción de aguacate, aumentar el área cultivada y resolver algunos problemas fitosanitarios que limitan su producción y disminuyen la calidad del fruto (Ríos & Tafur, 2003). En este sentido, la pudrición de raíz generada por el oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands sobresale como la enfermedad más limitante y de mayor incidencia a nivel mundial (Damm et al., 2010; Fierro Corrales, 2011; Horta, Sousa, Coelho, Neves, & Cravador, 2008; Rookes, Wright, & Cahill, 2008). *P. cinnamomi* puede afectar cualquier variedad de aguacate, siendo la variedad Hass – el 95% de los frutos de

aguacate que se comercializan a nivel mundial son de esta variedad – altamente susceptible generando pérdidas hasta en un 90% del cultivo (Pérez-Jiménez, 2008).

*P. cinnamomi* se encuentra entre los fitopatógenos más destructivos en el mundo. Es capaz de atacar plantas de todas las edades, ocasiona pudrición en las raíces pivotantes y laterales y se extiende hasta el tronco disminuyendo la vigorosidad, productividad e incluso causando la muerte del árbol (Bernal et al., 2008; Ciro, Rendon, & Navarro, 2006; Pérez-Jiménez, 2008). Entre las raíces más afectadas se encuentran las más finas, las cuales son deterioradas generando un retraso en la toma de nutrientes, en el desarrollo normal del material vegetal y causando la muerte de la planta en un periodo que puede tardar desde unos pocos meses hasta 2 o 3 años aproximadamente (Ramírez Gil, Castañeda Sánchez, & G., 2014; Tamayo, 2007).

La clasificación taxonómica actual de *P. cinnamomi* está definida de la siguiente manera:

**Reino:** Protista

**Filo:** Oomycota

**Clase:** Oomycetes

**Orden:** Pythiales

**Familia:** Pythiaceae

**Género:** *Phytophthora*

**Especie:** *P. cinnamomi*.

*Phytophthora* es considerado el género más importante de los patógenos oomycetes, puesto que es el agente causal que más pérdidas genera en la producción agrícola y hortícola en el mundo (Drenth et al., 2006; Pegg, Whiley, Sarahah, & Glass, 1985; Zentmeyer, 1980). Su importancia radica en la cantidad de plantas hospederas que tiene para sobrevivir como canelo, eucaliptos, roble, pino, piña, alfalfa, crucíferas, tomate, zanahoria y fresa, entre las más conocidas. Se han descubierto 117 especies, la mayoría invasoras de tejidos vegetales en una amplia gama de cultivos vegetales y plantas ambientales (Del Castillo et al., 2013). A nivel mundial, ha sido reportado como el causante de miles de millones de dólares en pérdidas de cultivos de aguacate en países como México, Perú, Costa Rica y Honduras (Tamayo, 2007). En Colombia *P. cinnamomi* se ha reportado como la especie causante de la pudrición radicular en árboles en etapa de vivero y durante los dos primeros años de vida, disminuyendo los rendimientos hasta en un 50% (Tamayo, 2007).

Por tales motivos, existe la necesidad de controlar la diseminación y disminuir la incidencia de este fitopatógeno. La utilización de agroquímicos continúa siendo el método de control más utilizado. Este hecho, además de crear una dependencia creciente del sector productivo hacia las compañías abastecedoras de productos químicos, ha favorecido la selección de patógenos cada vez más resistentes. Adicionalmente, el deterioro del medio ambiente y los riesgos asociados a la salud humana generados por la aplicación de estos productos ha convertido el problema fitosanitario en una amenaza crónica. Lo anterior ha promovido la búsqueda de alternativas viables que permitan la disminución progresiva del uso de fungicidas y pesticidas de síntesis química, buscando generar un menor impacto ambiental (Chalfoun, 2010; Godinho et al., 2015; María Teresa, Rosaura, Elda, & Ernesto, 2014; Morales, 2009).

Una alternativa viable para el control de *P. cinnamomi*, y con menores impactos ambientales, es el uso de compuestos provenientes de fuentes naturales como microorganismos y plantas. Los metabolitos de origen microbiano sobresalen como las moléculas de mayor potencial de actividades biológicas (Berdy, 2005; Subramani & Aalbersberg, 2012). De éstos, más del 46% de los reportados hasta ahora exhiben algún tipo de actividad inhibitoria ya sea como fármacos, antibióticos o para uso agrícola (Chalfoun, 2010; Godinho et al., 2015). Con base en estas observaciones se ha planteado como objetivo de este trabajo evaluar la producción de metabolitos extracelulares obtenidos a partir de bacterias antagonistas asociadas a plantas de aguacate, y su capacidad protectante frente a *P. cinnamomi*.

Para tal fin, el presente trabajo estuvo enmarcado en los siguientes objetivos:

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la producción y actividad biológica frente a *Phytophthora cinnamomi*, de metabolitos extracelulares obtenidos a partir de bacterias antagonistas asociadas a plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.).

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la virulencia de aislamientos de *P. cinnamomi* pertenecientes a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).
- Determinar la capacidad antagónica de bacterias asociadas al microbioma rizosférico de plantas de aguacate frente a aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* de mayor virulencia resultado de la evaluación anterior.
- Evaluar la eficacia de los extractos extracelulares en la protección frente a la pudrición de raíz generada por *P. cinnamomi* en plántulas de aguacate.

# 1. Capítulo 1. Patogenicidad de aislamientos de *P. cinnamomi* frente a raíces desprendidas de aguacate

## 1.1 Antecedentes

Los oomycetes son un grupo de microorganismos entre los que se incluyen los fitopatógenos más devastadores a nivel mundial. En los últimos años el género de *Phytophthora* ha recibido gran atención debido a las innumerables pérdidas que genera en la producción agrícola y hortícola (Drenth et al., 2006). *Phytophthora cinnamomi* Rands se encuentra entre los géneros más importantes de patógenos oomycetes. Ataca plantas de todas las edades y cuenta con una gran cantidad de hospederas para poder sobrevivir (Hoyos et al., 2015; Zentmeyer, 1980). Su principal síntoma es la pudrición radicular; sin embargo, puede causar síntomas secundarios como decoloración y marchitamiento en las hojas viejas, enrollamiento de las hojas nuevas, sobreproducción de frutos pequeños y de mala calidad, entre otros (Lopez, 2004; Tamayo, 2007).

*P. cinnamomi* en su estado vegetativo puede desarrollar un crecimiento micelial y es capaz de producir tres tipos de esporas asexuales: esporangios, zoosporas y clamidosporas; todas con capacidad de infectar un gran número de plantas (O'Gara, Howard, McComb, Colquhoun, & Hardy, 2015). Este oomycete ataca las raíces de las plantas generalmente mediante unidades infectivas llamadas zoosporas que son liberadas a partir de los esporangios. Las zoosporas son células sencillas carentes de pared celular, biflageladas, motiles, que se encuentran inmersas en películas de agua en el suelo, arroyos y estanques, lo que les permite desplazarse con facilidad y nadar hacia las raíces jóvenes y tejidos de tallo de plantas vivientes (Serrano, de Vita, Rebollo, & Sánchez, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, *P. cinnamomi* puede convertirse en un



patógeno devastador, debido a que las precipitaciones y el agua de riego se tornan en un factor clave para la distribución de éste en casi cualquier tipo de geología (Morgan & Shearer, 2013).

No obstante, a pesar de las grandes pérdidas ecológicas y económicas que genera en diferentes cultivares, las investigaciones en esta última década se han centrado más en estudios de origen molecular y filogenético que en estudios que permitan su control (Drenth et al., 2006; Garnica et al., 2006). Por tanto, el desarrollo de proyectos en el área de control biológico que ayuden a disminuir o erradicar los efectos por *P. cinnamomi* se hace cada vez más evidente y necesario. En este sentido, el uso de microorganismos antagonistas presentes en el suelo es considerada una fuente importante de productos naturales con capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes patógenos de interés. Se sabe que las plantas sanas en agroecosistemas se asocian frecuentemente a microorganismos que le dan la posibilidad a la planta hospedera de defenderse de un ataque por patógenos o estreses abióticos. Estos microorganismos han mostrado gran potencial para la producción de compuestos activos (Firáková, Šturdíková, & Múčková, 2007; Ludwig-Müller, 2015).

Por todo lo anterior, el desarrollo de este trabajo tuvo como objetivo evaluar la virulencia de diferentes aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* pertenecientes a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en raíces desprendidas de aguacate. Posteriormente, el aislamiento más virulento o agresivo será utilizado para seleccionar microorganismos antagonistas con potencial para control de *P. cinnamomi*.

## **1.2 Materiales y métodos**

### **1.2.1 Medios de cultivo y reactivos**

Para el crecimiento de los microorganismos se empleó Agar Papa-Dextrosa (PDA) y agar granulado marca Merck®, ampicilina a una concentración de 5mg/L, rifampicina a 0,3 mg/L, benomil a 0,4 mg/L e himexazol a 25 mg/L y pentacloronitrobenzeno a 20 mg/L.

## 1.2.2 Microorganismos

Los aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* empleados fueron aislados de diferentes regiones donde se cultiva aguacate en el Departamento de Antioquia, Colombia y pertenecen al banco de fitopatógenos de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) (ver Tabla 1-1). Los aislamientos fueron mantenidos en agar PDA a 21°C comprobando su pureza antes de usarlos través de técnicas de microscopía.

**Tabla 1-1.** Aislamientos de *P. cinnamomi* empleados en el estudio.

<b>Código del aislamiento</b>	<b>Subregión</b>	<b>Municipios</b>
89	Oriente Antioqueño	San Vicente de Ferrer
FG10	Oriente Antioqueño	El Retiro
ANSS07	Oriente Antioqueño	Sonsón
P35	Suroeste Antioqueño	Caramanta
JBVF1	Suroeste Antioqueño	Jardín

## 1.2.3 Pruebas de virulencia

Se empleó la metodología de Botha (1989) con algunas modificaciones. Se obtuvieron plántulas de aguacate nativo de 5 meses de edad a partir de un patrón previamente. Posteriormente se seleccionaron raíces nutricionales teniendo en cuenta el buen estado de su ápice. Las raíces fueron cortadas en segmentos de 3 cm de largo, sumergidas en 20 mL de agua de grifo contenida en tubos plásticos y agitadas durante 15 min para remover el exceso de suelo. Luego, se dispusieron en un baño sonicador por 2 min, el agua fue descartada y se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min. Finalmente, las raíces fueron lavadas con agua estéril y etanol al 70% durante 1 min, respectivamente. Por último se realizaron tres lavados adicionales con agua estéril.

En el centro de una caja de petri que contenía agar agua (agar-agar 2%) se sembró un fragmento circular de micelio de *P. cinnamomi* de 2 mm. El fragmento fue tomado a partir de un cultivo crecido por 10 días en medio de cultivo PDA. Los ápices de las raíces fueron colocados en contacto con el micelio e incubados a 25°C bajo condiciones de oscuridad. Se utilizaron cinco raíces por placa y se realizaron tres repeticiones por

tratamiento. Cada caja de petri fue considerada como una unidad experimental. El porcentaje de avance de la infección de los aislamientos de *P. cinnamomi* se midió a las 48 horas. Para esto, se tomaron todas las raíces, se desinfectaron con etanol al 70% por 5 segundos y se lavaron con agua estéril. Posteriormente, cada raíz se cortó en segmentos de 3 mm y sus fragmentos fueron sembrados en orden de corte desde el extremo final hasta el ápice en medio PDA PARBH (Preparación en el anexo 1), para favorecer en primera medida el desarrollo de *P. cinnamomi*. Una vez observada la formación de micelio en cada uno de los fragmentos de raíz se contaron y se expresaron como segmentos con crecimiento de *P. cinnamomi* por raíz. Posteriormente se tomó nota de la presencia o ausencia de las bacterias y hongos que aparecieron en los segmentos donde no creció *P. cinnamomi* con el propósito de identificar si estos afectaban o no la colonización por parte del oomycete. (Botha, Wehner, & Kotze, 1989).

Para cada fragmento de raíz, el porcentaje de infección fue calculado a partir de la estimación del número de segmentos infectados respecto al número total de segmentos en la muestra. Posteriormente, se estimó la media por unidad experimental, y finalmente la media por tratamiento. Todas las muestras contenían la misma cantidad de segmentos. Este experimento se repitió en el tiempo para corroborar la capacidad infectiva de los aislamientos evaluados.

#### **1.2.4 Análisis estadístico**

El diseño estadístico empleado fue un diseño completamente al azar. La variable respuesta evaluada correspondió a la aparición de micelio de *P. cinnamomi* en medio PDA – PARBH, bacterias y hongos. Posteriormente se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias entre los porcentajes de infección de los aislamientos.

### **1.3 Resultados y discusión**

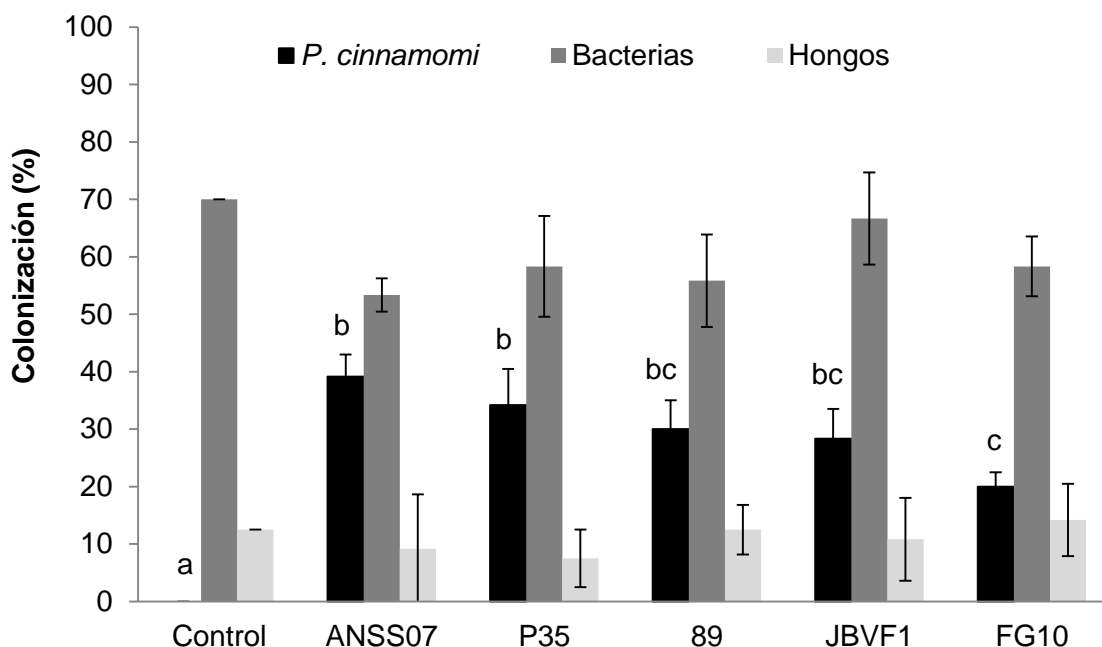
#### **1.3.1 Pruebas de virulencia**

En los análisis realizados para evaluar la capacidad infectiva de los diferentes aislamientos de *P. cinnamomi* se evidenció crecimiento tanto de hongos como de bacterias (Figura 1-1). En el caso de las bacterias fue superior al 50% en todos los

tratamientos. La explicación a esta observación puede relacionarse con las condiciones de mantenimiento del material vegetal bajo condiciones de invernadero. El sustrato utilizado para el desarrollo y crecimiento de las plantas de aguacate no era estéril, y probablemente contenía una elevada carga microbiana en contacto con las raíces que no pudo ser removida completamente con el proceso de desinfección empleado.

El crecimiento micelial de *P. cinnamomi* fue evidenciado en la superficie de las raíces después de 48 horas de contacto. Sin embargo, los porcentajes de colonización fueron inferiores al 50% para cada uno de los aislamientos evaluados (Figura 1-1). Teniendo en cuenta que durante el experimento fueron proporcionadas condiciones para favorecer la infección, los bajos porcentajes obtenidos podrían atribuirse a un tiempo de contacto insuficiente entre la raíz y el patógeno. Igualmente, a la presencia de otros microorganismos que podrían haber exhibido algún tipo de antagonismo natural contra *P. cinnamomi* (Botha et al., 1989; Clarke et al., 2006; Hakizimana, Gryzenhout, Coutinho, & van den Berg, 2011).

**Figura 1-1.** Pruebas de virulencia de aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* y crecimiento de bacterias y hongos en muestras de raíz desprendida. Las letras corresponden a la prueba de comparación de medias de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un porcentaje de confiabilidad del 95%.



Los datos del porcentaje de infección fueron utilizados para realizar las pruebas de normalidad de los residuales y homogeneidad de varianza a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Los resultados indicaron que la prueba de virulencia cumplió con los supuestos. Los aislamientos ANSS07, P35 y 89 mostraron un mayor porcentaje de colonización y por tanto una mayor virulencia (Figura 1-1). Respecto al crecimiento de bacterias y hongos no se evidenció ninguna diferencia estadística significativa entre los tratamientos; sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos hubo una mayor proliferación de bacterias que de hongos en las muestras evaluadas. El crecimiento de las bacterias superó en 20% el crecimiento de los aislamientos de *P. cinnamomi* y en un 50% el crecimiento de los hongos.

Los resultados permitieron confirmar que todos los aislamientos de *P. cinnamomi* pertenecientes a la CIB son patogénicos. Es decir, todos fueron capaces de producir la infección en raíces de aguacate usando la metodología de raíz desprendida. En términos estadísticos, los aislamientos ANSS07 y P35 exhibieron los mayores grados de virulencia, ya que obtuvieron los mayores porcentajes de infección. Estos aislamientos son los más adecuados para realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* que permitan evaluar el

potencial de usar extractos microbianos para su control. Sin embargo, para desarrollar estudios de este tipo se debe realizar primero un tamizaje de la actividad y comportamiento de diferentes bacterias antagonistas a nivel *in vitro* frente al patógeno de interés (Köhl, Postma, Nicot, Ruocco, & Blum, 2011).

El desarrollo de metodologías como la prueba de virulencia aplicada en este estudio son indispensables, ya que permiten conocer la susceptibilidad y resistencia vertical en el hospedante, así como la capacidad infectiva del patógeno para generar la enfermedad. Además, es una prueba sencilla para hacer un tamizaje inicial con el fin de descifrar la tolerancia de diferentes patrones empleados en campo frente a *P. cinnamomi*. No obstante, estos deben ser evaluados posteriormente a nivel de invernadero y campo antes de ser seleccionados como material vegetal promisorio (Botha et al., 1989).

## **2. Capítulo 2. Capacidad antagónica frente a *P. cinnamomi* de bacterias asociadas al microbioma rizosférico de plantas de aguacate**

### **2.1 Antecedentes**

El uso indiscriminado de agroquímicos no solo ha generado deterioro en la salud humana y el ambiente, sino que también ha acelerado la selección de patógenos cada vez más resistentes, convirtiendo el problema fitosanitario en una amenaza crónica (Sierra, Romero, & Orduz, 2012). Esto ha promovido la búsqueda de alternativas viables en la búsqueda de una disminución progresiva del uso de fungicidas y plaguicidas de origen químico. (María Teresa et al., 2014; Morales, 2009). En los últimos años se ha venido generando un alto interés en la implementación de técnicas biotecnológicas para el control biológico de enfermedades transmitidas por el suelo a diferentes variedades de plantas (Bosmans, De Bruijn, De Mot, Rediers, & Lievens, 2016),

Tradicionalmente, las plantas han sido la principal fuente de compuestos naturales (metabolitos secundarios) con aproximadamente 700.000 estructuras reportadas hasta el momento. De estos compuestos el 20% presentan algún tipo de actividad biológica (Berdy, 2005; Calo, Crandall, O'Bryan, & Ricke, 2015). Sin embargo, la obtención de grandes cantidades de estos metabolitos está limitada normalmente por la baja disponibilidad de material vegetal (existe la necesidad de mayores áreas cultivadas para incrementar producción), y por condiciones geográficas y climatológicas específicas para su cultivo. Estas limitaciones impiden alcanzar altos volúmenes de producción de los metabolitos de interés en algunos casos, como lo es la obtención de aceites esenciales (Zabka & Pavela, 2013).

Ante esta problemática, el desarrollo de nuevos productos basados en metabolitos microbianos producidos por bacterias antagonistas se ha convertido en una alternativa potencial. Las bacterias antagonistas son aquellas capaces de interactuar con otros microorganismos, ya sea de la misma o diferente especie, inhibiendo su crecimiento parcial o totalmente o incluso matándolo (Köhl et al., 2011; Sharma, Singh, & Singh, 2009). Los metabolitos microbianos pueden ser igual o más efectivos que un producto natural extraído de plantas pero con mayor facilidad de producción a gran escala (Subramani & Aalbersberg, 2012). Además, comparados con productos sintetizados químicamente suelen ser mucho más específicos y generalmente menos peligrosos para otros organismos (Bosmans et al., 2016; Sierra et al., 2012).

En la mayoría de los casos el modo de acción mediante el cual un antagonista actúa en un determinado ecosistema no es totalmente claro. Sin embargo, se sabe que uno de los mecanismos determinantes en las relaciones antagónicas es la producción de compuestos activos o antibiosis (Bertrand et al., 2014). Muchos de estos compuestos son producidos a partir del metabolismo secundario de los microorganismos y son considerados de gran interés para el ser humano por poseer propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales, inmunosupresoras, antiparasitarias, herbicidas e insecticidas, entre otras (Bertrand et al., 2014; Sierra et al., 2012).

El 12% de los metabolitos microbianos reportados son utilizados en el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos (Bertrand et al., 2014). Entre los diferentes grupos de microorganismos, las bacterias antagonistas son consideradas ideales para atacar patógenos de suelo debido a su rápido crecimiento, fácil manejo y rápida colonización de la rizósfera (Bosmans et al., 2016; Sharma et al., 2009). No obstante, en el proceso de selección de una cepa con potencial para el control biológico de fitopatógenos, como *P. cinnamomi* Rands, debe ser realizado a través de un tamizaje inicial de actividad a nivel *in vitro* (Köhl et al., 2011).

Un tamizaje antimicrobiano permite medir la susceptibilidad de microorganismos frente a compuestos bioactivos (Rojas, García, & López, 2005). Igualmente, permite la clasificación de estos microorganismos como resistentes, intermedios o susceptibles (Kalemba & Kunicka, 2003). Entre los métodos de tamizaje más empleados se encuentran difusión en agar, inhibición del crecimiento micelial y microdilución en caldo.



La de difusión en agar es el más utilizado por su sencillez y rapidez (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966; Rojas et al., 2005), permite estimar el grado de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo mediante la formación de halos de inhibición en agar. La microdilución en caldo utiliza una suspensión de células bacterianas normalizadas en medios líquidos estandarizados que contiene diferentes concentraciones del extracto evaluado. Por su parte, el método de inhibición del crecimiento micelial emplea la microdilución en agar como una medida de acercamiento para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los patógenos del ensayo (Cos, Vlietinck, Berghe, & Maes, 2006).

Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue determinar la capacidad antagónica de bacterias asociadas al microbioma rizosférico de plantas de aguacate frente al aislamiento de *P. cinnamomi* P35.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Microorganismos y medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos fueron agar Tripticasa de Soya (TSA), Agar Papa-Dextrosa (PDA), Caldo TSB y Caldo Sabouraud. Todos marca Merck®. Se seleccionó el aislamiento de *P. cinnamomi* P35 para los ensayos subsecuentes, ya que presentó una capacidad infectiva adecuada. Aunque este aislamiento no tuvo diferencia estadística significativa en términos de virulencia con el aislamiento ANSS07, P35 era de mayor interés para el grupo de investigación por haber sido objeto de estudio en trabajos anteriores (S. Ramírez et al., 2015). Los aislamientos fueron mantenidos en agar PDA a 21°C comprobando su pureza través de microscopía antes de ser usados.

### **2.2.2 Aislamiento de Microorganismos**

Para la obtención de los microorganismos antagonistas se realizaron muestreos en fincas aguacateras ubicadas en el Municipio de Anserma, departamento de Caldas y en el Oriente Antioqueño, Colombia. Se tomaron raíces nutricionales y suelo a partir de árboles de aguacate aparentemente sanos. De cada finca, y en forma de zig-zag, se muestrearon entre cinco y ocho árboles. Las muestras fueron colocadas y transportadas en bolsas

plásticas debidamente rotuladas y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Las raíces se lavaron con agua destilada estéril para luego ser cortadas en fragmentos de 0,5 cm. Los fragmentos obtenidos fueron colocados en Agar TSA y PDA por duplicado. Las condiciones de incubación fueron 21°C durante 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron las colonias bacterianas que crecieron sobre la superficie del medio de cultivo y se subcultivaron en un medio nuevo empleando la siembra por agotamiento en TSA. Cada aislamiento fue codificado con la sigla “AED” en el caso de los endófitos y “ARP” en el caso de los microorganismos del rizoplasma. Los aislamientos fueron mantenidos en agar blando a 4°C monitoreándolos constantemente y comprobando su pureza a través de técnicas de tinción y microscopía antes de usarlos.

### **2.2.3 Ensayos de antagonismo in vitro**

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante la técnica de cultivos duales en caja de petri (Cundom, de Gaiad, de Castañón, de Arriola, & Coutinho, 1999), enfrentando a *P. cinnamomi* P35 con los aislamientos bacterianos obtenidos previamente (numeral 2.2.2). Para determinar el efecto inhibitorio de los aislamientos sobre el fitopatógeno se tomaron cajas de petri que contenían medio de cultivo PDA. Cada caja se dividió en cuatro cuadrantes, en cada uno de ellos se ubicó un potencial antagonista a 1 cm del borde de la caja y en el centro se ubicó un fragmento de agar de 5 mm con el fitopatógeno crecido por 8 días. Adicionalmente se empleó un control de crecimiento de cada uno de los fitopatógenos sin antagonistas. Se midió el halo de inhibición alrededor de los potenciales antagonistas cada 24 h durante 8 días. El grado de inhibición fue cuantificado en escala de 0 a 3 (0 = sin halo de inhibición, 1= halo de 0.1 a 1 cm, 2= halo de 1 a 2 cm, 3=halo de 2 a 4 cm). Todos los procedimientos se realizaron por triplicado y con una repetición en el tiempo.

### **2.2.4 Cinética de producción de metabolitos extracelulares con capacidad antagonista**

Se preparó un inóculo de 100 mL en caldo TSB de la bacteria a ser crecida y se incubó durante 24 h a 26°C y 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 200 µL y se agregaron a cajas petri que contenían agar PDA y agar TSA y fueron esparcidos por toda la superficie con un asa de digrasky estéril. Estas se rotularon debidamente y se incubaron a 26°C. Posteriormente se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 48, 72, y 96 horas de cultivo, por

aislamiento y medio de cultivo. Todos los procedimientos se realizaron por duplicado (Bosmans et al., 2016).

### **2.2.5 Extracción de los metabolitos extracelulares**

Las cajas petri a los diferentes tiempos de crecimiento fueron extraídas empleando acetato de etilo según la técnica de Garbeva con algunas modificaciones (Garbeva, Silby, Raaijmakers, Levy, & de Boer, 2011). El agar fue cortado en fragmentos más pequeños y se realizaron dos extracciones con el solvente en una proporción 2:1 solvente y agar respectivamente. Posteriormente se recuperó la fase orgánica y se eliminó el solvente en un evaporador rotativo asistido por vacío para obtener los respectivos extractos. Los extractos obtenidos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación.

### **2.2.6 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos**

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos frente a *P. cinnamomi* se realizó por medidas de densidad óptica a 595 nm, empleando microplacas estériles de 96 pozos (Granada, Rueda, & Peláez, 2014; S. Ramírez et al., 2015) y un lector de microplacas BioRad modelo 680XR. Para esto se preparó una suspensión de fragmentos de micelio de *P. cinnamomi* en tubos plásticos de 50 mL con 20 mL de medio Sabouraud y perlas de vidrio. La suspensión se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^4$  fragmentos/mL por conteo en cámara de Neubauer. En cada pozo de la microplaca se adicionaron 140  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo Sabouraud, 10  $\mu\text{L}$  del extracto y 50  $\mu\text{L}$  de inóculo para un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Se realizaron 8 diluciones sucesivas de 1 en 2 hasta evaluar 8 diluciones del extracto.

Los extractos se evaluaron por cuadruplicado en cada uno de los ensayos, incluyendo su réplica y sus respectivos controles. Las microplacas fueron incubadas durante 7 días a  $21^{\circ}\text{C}$  y su lectura se realizó al inicio y final del experimento con el propósito de obtener un delta de la densidad óptica de cada pozo. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja a la cual no hubo crecimiento significativo de *P. cinnamomi*.

### 2.2.7 Caracterización molecular de los microorganismos con mayor potencial

Las bacterias cuyos extractos presentaron las CMI más bajas frente a *P. cinnamomi* fueron identificadas en género. Para ello se obtuvo DNA a partir de cultivos axénicos y se amplificó la región 16s del DNA ribosomal. Los amplicones fueron secuenciados y se realizó un BLAST en GenBank.

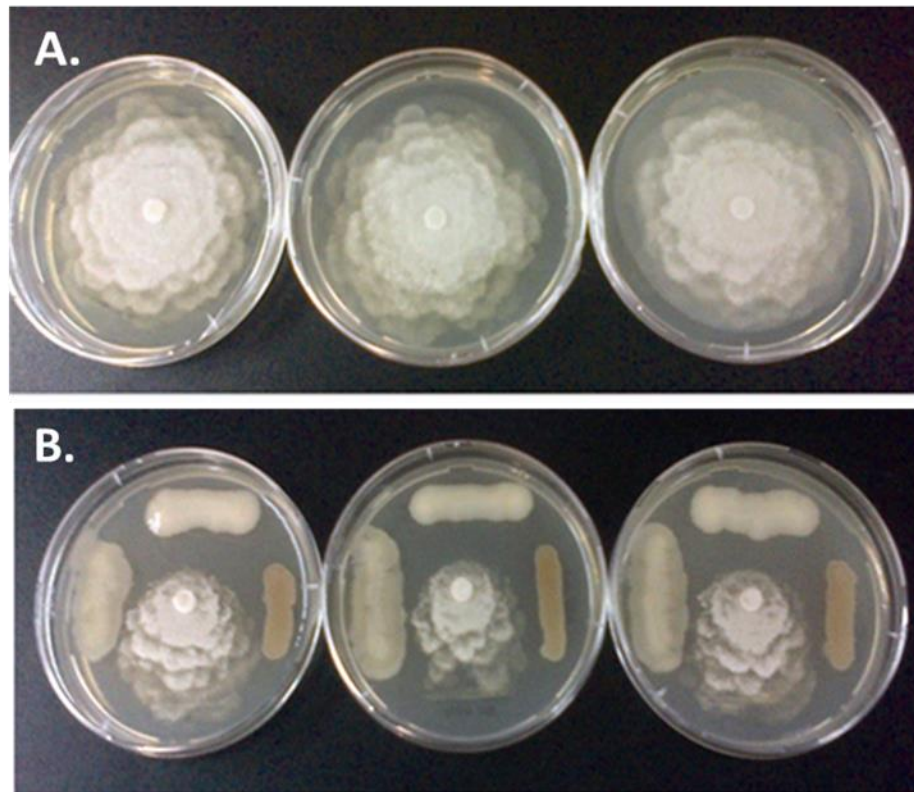
## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Ensayos de antagonismo in vitro

Se obtuvieron 63 aislamientos bacterianos a partir de raíces nutricionales de árboles de aguacate aparentemente sanos. Los 63 aislamientos bacterianos fueron utilizados para realizar ensayos de antagonismo frente a *P. cinnamomi* (Tabla 2-1). El 40% de los aislamientos presentó algún tipo de inhibición frente a *P. cinnamomi* (25 aislamientos), de los cuales el 11% (7 aislamientos) correspondía a los aislamientos que mostraron el mayor grado de inhibición frente a este patógeno.

Estos resultados corroboran la afirmación de que en el suelo y la rizósfera se encuentran una gran variedad de microorganismos antagonistas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos. La producción de metabolitos secundarios (incluyendo antibióticos y compuestos volátiles) se encuentran entre los mecanismos de inhibición más utilizados por bacterias antagonistas (Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Barka, 2005). Algunos autores sugieren que el antagonismo también está mediado por la competencia de nutrientes entre el antagonista y el agente patogénico, (Ahemad & Kibret, 2014; Compant et al., 2005; Garbeva et al., 2011; Saharan & Nehra, 2011). No obstante, los mecanismos involucrados en la producción son complejos y dependen en gran medida de la presión natural a la que es sometido un aislamiento en particular (Alippi & Reynaldi, 2006; Wulff et al., 2002).

**Figura 2-1.** Ensayos de antagonismo por cultivo dual (tres repeticiones por ensayo). **A.** Control de *P. cinnamomi* **B.** Inhibición de *P. cinnamomi* frente a cuatro aislamientos bacterianos diferentes.



### 2.3.2 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos

Los aislamientos AED34, AED38, AED45, AED56 y AED57 mostraron grado de inhibición tres (3) para *P. cinnamomi* al igual que para otros patógenos de interés comercial para el aguacate como *Colletotrichum* sp. y *Phomopsis* sp. (estos datos no se muestran). Adicionalmente, en los ensayos *in vitro*, AED38 y AED56 mostraron los menores valores de CMI pasadas las 12 horas de cultivo (281 y 163 mg/L, respectivamente). La cinética de producción de metabolitos en PDA y TSA de los aislamientos AED38 y AED56 fue evaluada. Su selección se realizó con base en su alta capacidad para inhibir *P. cinnamomi in vitro* y su rapidez para proliferar en el agar. Adicionalmente, su morfología fue diferente a los aislamientos AED34, AED45 y AED57. Los extractos de AED38 y AED56 se obtuvieron a las 0, 12, 24, 48, 72, y 96 horas de cultivo y se evaluó la concentración mínima inhibitoria de cada extracto frente a P35 en microplacas de 96 pozos.

**Tabla 2-1.** Rango de inhibición en ensayos de antagonismo de cada uno de los aislamientos obtenidos en los muestreos en el Municipio de Anserma, departamento de Caldas y el Oriente Antioqueño, Colombia.

<b>Nivel de inhibición de bacterias frente a <i>P. cinnamomi</i> de aguacate por ensayos de cultivo dual</b>	
<b>Aislamiento Bacteriano</b>	<b><i>Phytophthora cinnamomi</i>.</b>
ARP 25	0
ARP 26.2	0
ARP 27	0
ARP 28	2
ARP 28.1	0
ARP 29	0
ARP 30	0
ARP 30.1	1
ARP 30.2	0
ARP 31	0
AED 11	3
AED 12	1
AED 13	0
AED 14	0
AED 15	0
AED 15.1	2
AED 15.2	2
AED 15.3	1
AED 16	0
AED 16.1	2
AED 17	0
AED 18	0
AED 19	0
AED 20	0
AED 21	0
AED 21.1	1
AED 21.2	0
AED 22	1
AED 23	0

---

AED 24	0
AED 25	0
AED 26	0
AED 27	0
AED 28	0
AED 29	0
AED 30	0
AED 30.1	0
AED 31	0
AED 31.1	1
AED 32	0
AED 33	2
AED 34	3
AED 35	1
AED 36	0
AED 37	0
AED 38	3
AED 39	3
AED 40	0
AED 41	1
AED 42	1
AED 43	0
AED 44	1
AED 45	3
AED 46	2
AED 47	0
AED 48	0
AED 50	0
AED 52	0
AED 53	0
AED 54	1
AED 55	0
AED 56	3
AED 57	3

---

**Tabla 2-2.** Evaluación de cinéticas de producción y concentraciones mínimas inhibitorias frente a *P. cinnamomi* P35 de los extractos obtenidos a partir de AED38 y AED56.

Tiempo (horas)	AED38		AED56	
	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	TSA	PDA	TSA	PDA
0	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición
12	Sin inhibición	281,1	Sin inhibición	163,9
18	Sin inhibición	316,7	Sin inhibición	356,7
24	208,3	432,4	Sin inhibición	667,6
48	403,3	477,8	Sin inhibición	687,5
72	290,2	416,7	266,7	423,6
96	336,8	387,5	245,0	252,8

Para ambos aislamientos la producción de compuestos activos capaces de inhibir el crecimiento *P. cinnamomi* fue favorecida en medio PDA. En este medio se registró inhibición del patógeno pasadas 12 h de cultivo, con una CMI menor respecto a las demás horas evaluadas. En el caso de TSA la actividad fue evidente después de 24 h o 72 h de cultivo para AED38 y AED56, respectivamente. Lo anterior, pudo haberse dado ya que, a menudo en la literatura hay reportes de que la producción de metabolitos secundarios por bacterias es activada cuando el crecimiento es limitado por la cantidad de carbono, nitrógeno, fosfatos y otras fuentes clave de nutrientes (Tyc, Song, Dickschat, Vos, & Garbeva, 2016). Para este trabajo el medio de cultivo PDA era quien contenía menos fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento de ambos aislamientos bacterianos. Además, en la literatura también se encuentran reportes donde confirman que la composición y la concentración de nutrientes pueden afectar una gran cantidad de mecanismos complejos en la regulación genética de muchas bacterias, desencadenando así la producción de diferentes metabolitos secundarios activos en la naturaleza (Tyc et al., 2016). Sin embargo, no hay que descartar que factores ambientales tales como la temperatura, pH, humedad y luz pueden ser clave a la hora de producir compuestos con actividad inhibitoria frente a diferentes patógenos (Tyc et al., 2016).

Los aislamientos antagonistas AED38 y AED56 fueron identificados como *Serratia* sp. mediante ADN ribosomal 16s después de conocer su actividad frente a *P. cinnamomi*. El género *Serratia* sp. ha sido caracterizado como productor de sustancias de interés biotecnológico (Khoa, Giàu, & Tuán, 2016). Muchos de sus miembros se han distinguido



---

como bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), controladores de hongos fitopatógenos, y otros han mostrado potencial de acción antibacteriana (Khoa et al., 2016). Esto ha despertado el interés en implementar el género *Serratia* como agentes de biocontrol para diferentes enfermedades en plantas (Cheol, 2013). Sin embargo, las condiciones de producción de compuestos bioactivos deben ser esclarecidas para lograr rendimientos de producción adecuados.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que los microorganismos antagonistas aislados de la rizósfera de plantas de aguacate tienen un alto potencial para ser explotados como controladores biológicos. Sin embargo, es necesario realizar una futura identificación de los aislamientos *Serratia* sp. (AED38) y *Serratia* sp. (AED56) a nivel de especie y la caracterización de sus metabolitos, con el propósito de confirmar si la producción de estos compuestos activos, con capacidad antioomycete frente a *P. cinnamomi*, está relacionada con la especie o dependen más de las condiciones medioambientales a las que se encontraban expuestos.

# **3. Capítulo 3. Evaluación de la efectividad de los extractos extracelulares en la protección de plántulas de aguacate frente a la pudrición de raíz generada por *P. cinnamomi***

## **3.1 Antecedentes**

En Colombia el cultivo de aguacate ha venido creciendo de forma exponencial durante la última década, permitiendo al país ubicarse entre los principales productores a nivel mundial (Yabrudy, 2012). Sin embargo, este crecimiento y desarrollo progresivo del cultivo se ve amenazado por diferentes enfermedades que limitan su producción. Entre estas, la pudrición de la raíz generada por el oomicete *Phytophthora cinnamomi* Rands se encuentra entre las más importantes. (Damm et al., 2010; Fierro Corrales, 2011; Horta et al., 2008; Rookes et al., 2008). Su incidencia puede ser devastadora, infectando hasta el 90% de las plantas en los cultivos de aguacate (Bernal et al., 2008; Ciro et al., 2006).

A nivel mundial, el control de *P. cinnamomi* se ha basado en la aplicación de agroquímicos como sales de fosfitos, fosetil aluminio y metalaxil lo que ha favorecido la selección de patógenos resistentes y la degradación del ambiente (Akinsanmi & Drenth, 2013; Scott, Barber, & Hardy, 2015). Sin embargo, el uso de compuestos provenientes de fuentes naturales representa una alternativa para disminuir progresivamente su uso. En este sentido, los extractos microbianos provenientes de microorganismos antagonistas demuestran un gran potencial de actividades biológicas. Muchos de los microorganismos antagonistas se encuentran asociados como endófitos a plantas sanas, lo que otorga

ciertas características de interés que le dan la posibilidad a la planta hospedera de defenderse de posibles ataques por patógenos o estreses abióticos (María Teresa et al., 2014; Morales, 2009).

La investigación sobre las propiedades de control biológico de bacterias antagonistas se ha centrado principalmente en el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y PGPR. No obstante, poco se sabe sobre la actividad de bacterias antagonistas aisladas de diferentes partes de la planta y su papel ecológico en las interacciones que forman. Este desconocimiento representa una oportunidad para la búsqueda de aislamientos con potencial en el control biológico de enfermedades (Tokpah et al., 2016). Es por eso que este estudio tuvo como propósito evaluar la efectividad de los extractos extracelulares obtenidos a partir de bacterias antagonistas en la protección frente a la pudrición de raíz generada por *P. cinnamomi* en plántulas de aguacate.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Microorganismos y medios de cultivo**

Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* se usó el aislamiento de *P. cinnamomi* codificado como P35 debido a los resultados obtenidos en el capítulo 1. Los aislamientos bacterianos empleados fueron *Serratia* sp. (AED38) y *Serratia* sp. (AED56) debido a la capacidad inhibitoria obtenida frente a *P. cinnamomi* (62,5 mg/L en ambos casos) y otros patógenos de aguacate en los ensayos *in vitro* (Rango de inhibición 3). El aislamiento P35 fue mantenido en agar PDA a 21°C y los aislamientos *Serratia* sp. (AED38) y *Serratia* sp. (AED56) en agar blando a 4°C. Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microorganismos fueron agar Trypticase de Soya (TSA), Agar Papa-Dextrosa (PDA), Caldo TSB, Caldo Sabouraud y Caldo VK. Todos marca Merck®.

### **3.2.2 Obtención y extracción de los extractos microbianos de AED38 y AED56.**

Para cada uno de los aislamientos se preparó un inóculo de 100 mL en caldo TSB y se incubó durante 24 h a 26°C y 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 200 µL y se agregaron a cajas petri que contenían 20 mL de agar PDA y fueron esparcidos por toda

la superficie con un asa de digrasky estéril. Las cajas de petri se rotularon debidamente y se incubaron a 26°C durante 24 h, ya que había mayor rendimiento en producción del extracto por mililitro que a las 12 h. Posteriormente, el agar fue cortado en fragmentos más pequeños y se realizaron dos extracciones con acetato de etilo en una proporción 2:1 según la técnica de Garbeva con algunas modificaciones (Garbeva et al., 2011). Finalmente, se recuperó la fase orgánica y el solvente fue eliminado por rotavaporación. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -70°C hasta su evaluación.

### **3.2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos**

La evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *P. cinnamomi* de los extractos obtenidos se realizó por medidas de densidad óptica a 595 nm, empleando microplacas estériles de 96 pozos (Granada et al., 2014; S. Ramírez et al., 2015) y un lector de microplacas BioRad modelo 680XR. Para esto se preparó una suspensión de fragmentos de micelio de *P. cinnamomi* en tubos plásticos de 50 mL con 20 mL de medio Sabouraud y perlas de vidrio. La suspensión se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^4$  fragmentos/mL por conteo en cámara de Neubauer. En cada pozo de la microplaca se adicionaron 140  $\mu$ L de medio de cultivo Sabouraud, 10  $\mu$ L del extracto y 50  $\mu$ L de inóculo para un volumen total de 200  $\mu$ L. Se realizaron diluciones sucesivas de 1 en 2 hasta evaluar 12 concentraciones del extracto.

Los extractos se evaluaron por cuadruplicado en cada uno de los ensayos, incluyendo su réplica y sus respectivos controles. Las microplacas fueron incubadas durante 7 días a 21°C y su lectura se realizó al inicio y final del experimento con el propósito de obtener un delta de la densidad óptica de cada pozo.

### **3.2.4 Pruebas de toxicidad de los extractos microbianos producidos en PDA sobre un modelo de Rábano (*Raphanus sativus*)**

Se empleó la metodología de Ticona (1998) con algunas modificaciones. Se tomaron semillas de rábano (*Raphanus sativus*), se lavaron con agua de grifo y se desinfectaron con hipoclorito al 1% y alcohol al 70% por 1 min. Luego se lavaron tres veces con agua estéril. Seguidamente se prepararon las diferentes concentraciones del extracto

microbiano a probar: 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, y 7.81 mg/L. Posteriormente se tomaron cajas petri que contenían papel filtro estéril y a cada una de ellas se le adicionaron 20 semillas junto con 2 mL de agua estéril y 10 % de metanol para el caso del control y 2 mL para los tratamientos con diferentes concentraciones del extracto microbiano. Cada tratamiento estaba compuesto por cuatro repeticiones cada una con 20 semillas. Todas las cajas fueron selladas para evitar la pérdida de humedad. Por último se incubaron a 26°C bajo condiciones de oscuridad. Pasados 2 días de incubación del montaje se tomó nota de la germinación de semillas por tratamiento y pasados 5 días se midió el peso fresco de cada una de las repeticiones en una balanza analítica. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar la toxicidad del extracto microbiano (Ticona, Nieta, Irahola, & Gimenez, 1998).

### **3.2.5 Efectividad de los extractos extracelulares *in vivo***

El aislamiento *P. cinnamomi* P35 fue seleccionado para realizar pruebas *in vivo* (capítulo 1). Como antagonista se utilizó el aislamiento microbiano *Serratia* sp. (AED38), el cual exhibió una CMI (62,5 mg/L) frente a *P. cinnamomi* en ensayos *in vitro* (numeral 2.2.6). Las plantas de aguacate se obtuvieron a partir de semillas de un solo árbol tradicionalmente usado como portainjertos. Las semillas se hicieron crecer en bolsas plásticas conteniendo 2 kg de sustrato no estéril (suelo y cascarilla de arroz en proporción 5:1, enmienda 25 g, fertilizante triple 15 25g) y se mantuvieron en invernadero hasta su uso (5 meses). Posteriormente, se les retiró el suelo y fueron lavadas con agua de grifo con el objetivo de eliminar los residuos de suelo adheridos a las raíces. Las plantas se introdujeron en frascos de vidrio de 400 mL.

La efectividad de los extractos fue evaluada a través de un arreglo factorial completamente aleatorizado. Se evaluaron tres tratamientos (extracto de AED38 a tres concentraciones diferentes), un control absoluto, un control de infección, un control positivo que consistió en un producto comercial a base de Fosetil aluminio. Tanto los controles como los tratamientos consistieron de tres unidades experimentales con cinco plántulas cada una para un total de 90 plantas (6x3x5=90).

Cada tratamiento consistió de una solución conformada por 350 mL de agua de grifo reposada, 10 mL de suspensión del patógeno (4,5 mg peso seco/mL) y 500 µL del extracto microbiano para alcanzar concentraciones de 60 mg/L (1xCMI); 120 mg/L (2xCMI) y 180 mg/L (3xCMI). En el control absoluto se adicionaron 360 mL de agua de grifo reposada. El control de infección consistió en 350 mL de agua y 10 mL de una suspensión micelial de *P. cinnamomi* P35 (4,5 mg peso seco/mL) crecido en medio VK y fragmentado con ayuda de un ultraturrax. Para el control positivo se adicionaron 350 mL de agua de grifo reposada, 10 mL de la suspensión del *P. cinnamomi* P35 y 500 µL del fungicida comercial para alcanzar una concentración de 0,5 mg/L (Zilberstein & Pinkas, 1987).

Finalmente, las plantas fueron mantenidas bajo observación durante diez (10) días hasta la aparición de los primeros síntomas. El daño se evaluó de acuerdo a una escala reportada por Horsfall y Barratt con modificaciones (Horsfall, J. G., and Barratt, R. W. 1945): donde cero (0) indica que no se evidenció ningún síntoma; uno (1), decaimiento de las hojas; dos (2), enrollamiento de las hojas en el tercio superior; tres (3), enrollamiento de las hojas en el tercio medio, cuarto (4), enrollamiento de las hojas en el tercio inferior, y quinto (5), marchitez de la planta. Posteriormente se midió el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ver Ecuación 3.1), para determinar el grado de afectación causada por *P. cinnamomi* (Fernández-Aguilar, Oyervides-García, & Espinoza-Velázquez, 2012; Shaner & Finney, 1977). Por último, se realizó una ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey.

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \quad (3.1)$$

Donde:  $Y_i$  es la proporción de la enfermedad en la  $i$ -ésima observación;  $(t_{i+1} - t_i)$  es el tiempo entre dos lecturas;  $i$  es el número de observaciones, y  $n$  es el número de evaluaciones.

Finalmente, se realizó un proceso de reaislamiento del patógeno en cada una de las plantas tratadas (Koch, 1876) con el propósito de determinar si el marchitamiento estaba asociado a la infección generada por *P. cinnamomi*. Las raíces fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, lavadas con agua estéril y

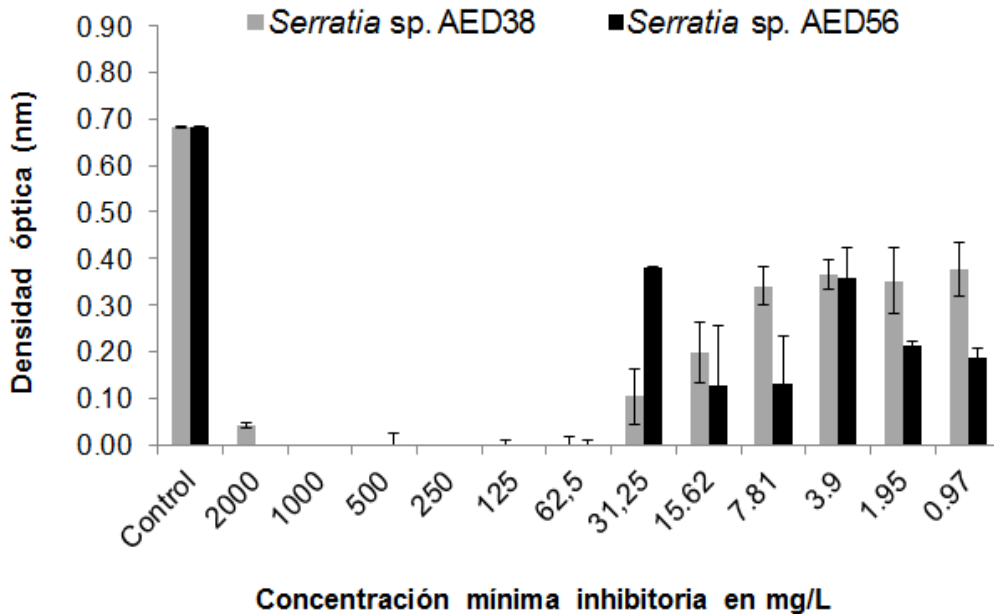
posteriormente sumergidas en etanol al 70% durante 1 min. Por último se realizaron tres lavados adicionales con agua estéril. Cada raíz se cortó en segmentos de 3 mm y sus fragmentos fueron sembrados en PDA PARBH (Preparación en el anexo 1), para favorecer el desarrollo de *P. cinnamomi*.

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos

La CMI frente a *P. cinnamomi* fue de 62,5 mg/L tanto para el aislamiento AED56 como para AED38 (Figura 3-1). Sin embargo, AED38 mostró mayor velocidad de crecimiento y productividad de extracto por volumen de medio, por lo que fue seleccionado para la realización de pruebas posteriores.

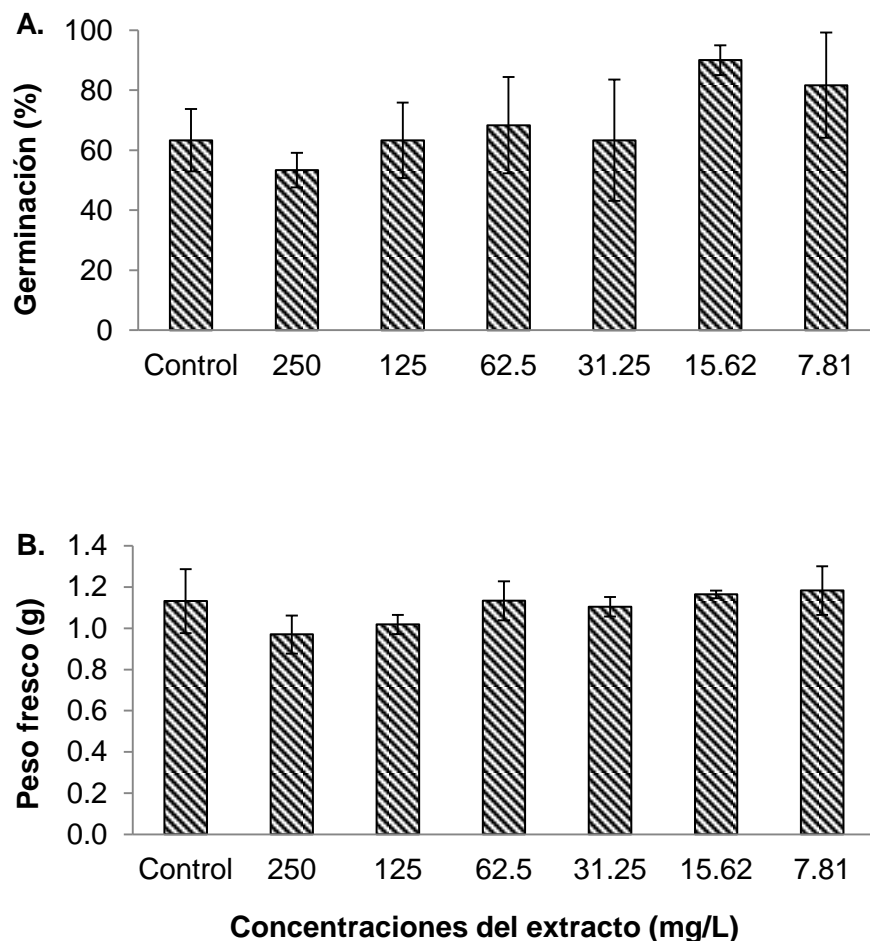
**Figura 3-1:** Concentración mínima inhibitoria de *Serratia* sp. AED38 y *Serratia* sp. AED56 frente a *P. cinnamomi*.



### 3.3.2 Pruebas de toxicidad de los extractos microbianos

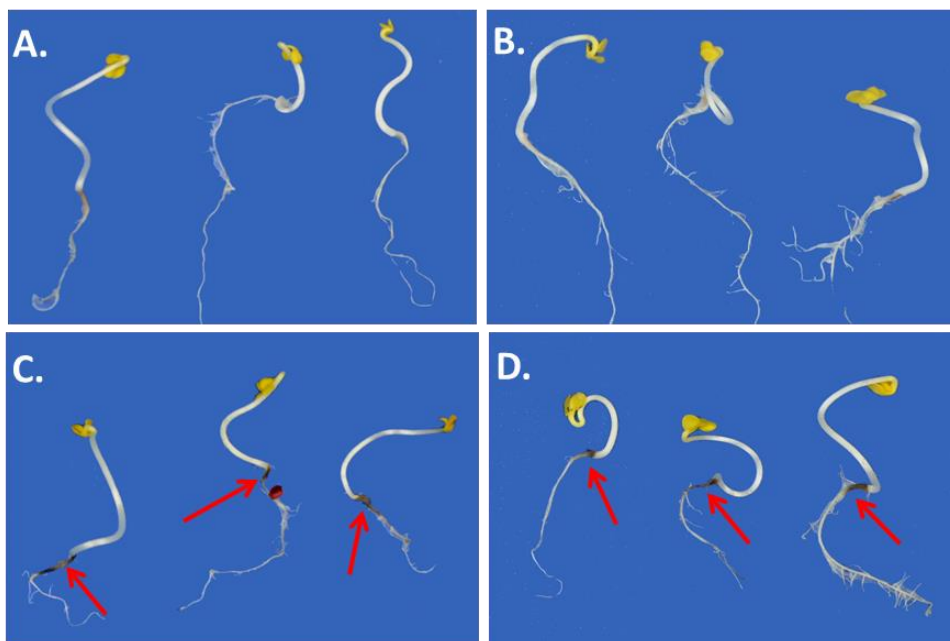
Estas evaluaciones se realizaron con el propósito de encontrar una concentración adecuada del extracto microbiano para los ensayos sobre plántulas de aguacate. Para esto se empleó un modelo de semillas de rábano (*Raphanus sativus*). El porcentaje de germinación y el peso fresco en las semillas de rábano no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 3-2). Este resultado sugiere que el extracto producido por *Serratia* sp. (AED38) no es fitotóxico para este modelo en las concentraciones evaluadas. Sin embargo, se observó un ligero necrosamiento en las raicillas a concentraciones de 250, 125 y 62.5 mg/L (Figura 3-3).

**Figura 3-2.** Fitotoxicidad de los extractos de *Serratia* sp. AED38 sobre rábano (*Raphanus sativus*). **A.** Porcentaje de germinación. **B.** Peso fresco de las semillas germinadas a los 5 días del ensayo. El ensayo no mostro diferencias estadísticamente significativas.





**Figura 3-3.** Imágenes de la fitotoxicidad del extracto *Serratia* sp. (AED38) en semillas de rábano (*Raphanus sativus*). **A.** Control. **B.** 62,5 mg/L. **C.** 125 mg/L. **D.** 250 mg/L.



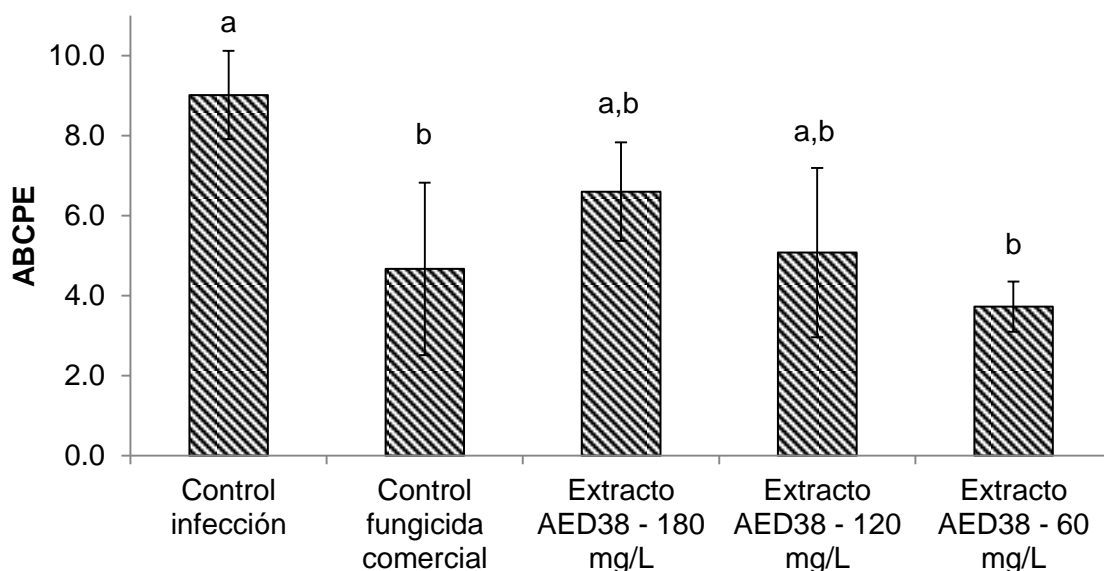
### 3.3.3 Efectividad de los extractos extracelulares *in vivo*

En la Figura 3-4 se muestran los resultados obtenidos en la determinación del ABCPE a los diez (10) días de seguimiento. El control absoluto y las plantas de aguacate tratadas con el extracto de AED38 (60 mg/L) correspondieron al menor valor de ABCPE alcanzado en el experimento, mostrando que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Estos resultados concuerdan con lo observado *in vitro*, donde el extracto mostró una CMI alrededor de 60 mg/L. Adicionalmente, a esta concentración no hubo necrosamiento de raíz (Figura 3-3).

El ABCPE evidenció que el extracto producido por AED38 es capaz de proteger las plantas de aguacate frente a la infección de *P. cinnamomi* (Figura 3-4). Cinco días después de inoculadas las plantas comenzaron a exhibir síntomas de la enfermedad (Figura 3-5). Los síntomas foliares fueron evidentes en todos los tratamientos evaluados excepto el control absoluto, el control positivo y las plantas tratadas con el extracto a una concentración de 60 mg/L. El decaimiento de las hojas del tercio superior evidenciado en plantas tratadas en concentraciones de 180 y 120 mg/L pudo estar relacionado con toxicidad del extracto (Figura 3-4). Después de realizar el reaislamiento del patógeno,

para cumplir con los postulados de Koch, *P. cinnamomi* fue aislado solo a partir del control de infección confirmando una posible toxicidad del extracto a concentraciones superiores a 60 mg/L. Estos resultados podrían sugerir que el necrosamiento observado en las raicillas de rábano en concentraciones de 180 y 250 mg/L pudo estar asociado a una toxicidad leve generada por extracto.

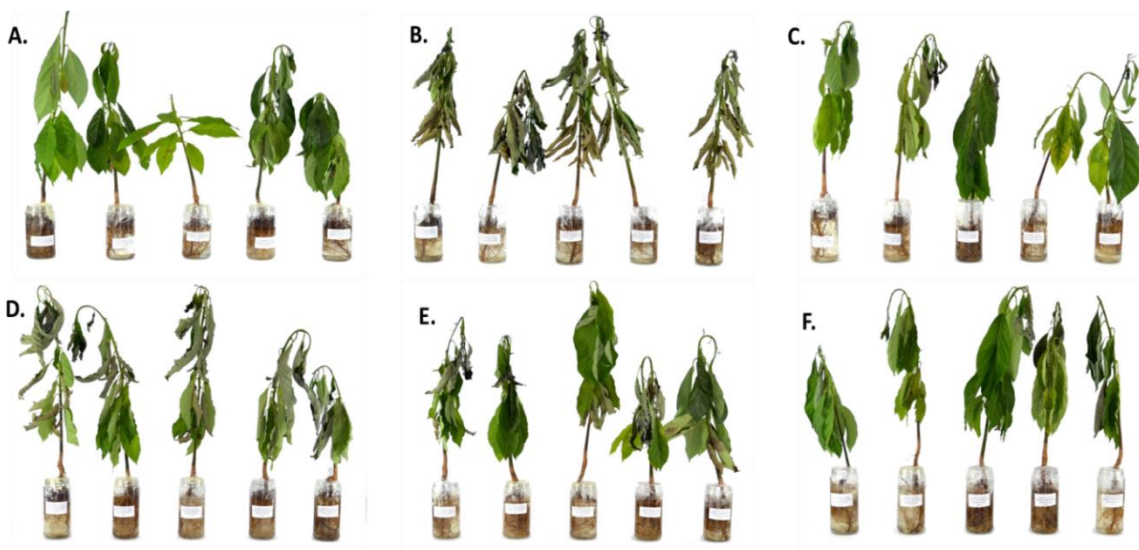
**Figura 3-4.** Área bajo la curva del progreso de la infección de *P. cinnamomi* en plántulas de aguacate. Escala utilizada: 1. decaimiento de las hojas; 2. enrollamiento de las hojas en el tercio superior; 3. enrollamiento de las hojas en el tercio medio, 4. enrollamiento de las hojas en el tercio inferior; 5. marchitez de la planta. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 95%.



De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la aplicación de extractos extracelulares utilizados para prevenir o disminuir efectos de enfermedades en plantas de interés comercial es eficaz, ya que se logra ver una disminución de los efectos físicos causados por el patógeno. Hasta este punto de la investigación, estos resultados pueden considerarse positivos porque a futuro este tipo de extractos podría representar una alternativa más amigable con el ambiente que el uso de agroquímicos comerciales para el control de enfermedades. Los agroquímicos han sido utilizados por décadas en el control de patógenos como *P. cinnamomi* y, aunque han sido efectivos en el control de

enfermedades, han favorecido el deterioro de suelos, la microbiota natural y el desarrollo de resistencia microbiana (María Teresa et al., 2014; Morales, 2009).

**Figura 3-5.** Plantas de aguacate al finalizar el experimento de actividad *in vivo*. **A.** Control Absoluto: plantas sin infectar con P35. **B.** Control de infección: plantas inoculadas con P35. **C.** Control positivo: plantas inoculadas con P35 + fungicida comercial (concentración final 0,5 mg/L). **D.** Tratamiento extracto AED38 (180 mg/L). **E.** Tratamiento extracto AED38 (120 mg/L). **F.** Tratamiento extracto AED38 (60 mg/L).



Es por lo anterior que el uso de sustancias activas en la última década ha sido de interés para algunos investigadores. Sin embargo, ha sido difícil encontrar metabolitos microbianos que tengan un amplio espectro de actividad frente a los principales patógenos de interés comercial en el aguacate. Es por esto, que se hace necesario implementar una búsqueda de microorganismos antagonistas que produzcan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Sharma et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la efectividad de los metabolitos secundarios producidos por bacterias antagonistas en medio sólido, al igual que ha sido reportado por otros investigadores. Garbeva y colaboradores obtuvieron extractos a través de enfrentamientos duales con diferentes bacterias y demostraron la capacidad inhibitoria de *Pseudomonas fluorescens* frente a *Rhizoctonia solani*, *Mucor hiemalis* y *Trichoderma harzianum* (Garbeva et al., 2011); Sierra-García y colaboradores demostraron, a través de ensayos de difusión en agar, el potencial de bacterias del

género *Bacillus* para producir compuestos con actividad antibacteriana, antifúngica e insecticida (Sierra et al., 2012); Khoa y colaboradores utilizaron *Serratia nematodiphila* para la obtención de extractos metabólicos capaces de inhibir *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, adicionalmente demostraron que estos extractos no eran tóxicos para las plantas de arroz en las concentraciones utilizadas (Khoa et al., 2016).

No obstante, aunque se ha descubierto una parte importante de los metabolitos secundarios bacterianos y su actividad biológica frente a otros microorganismos, todavía hay mucho por develar en términos de por qué, cuándo y dónde las bacterias de la rizósfera producen estos metabolitos secundarios (Tyc et al., 2016). De igual manera, es difícil imitar las condiciones ambientales tan diversas y cambiantes que probablemente ayudarían a la producción de estos metabolitos activos a nivel de laboratorio (Garbeva & De Boer, 2009). Es por esto que la ejecución de estudios para potencializar el uso de metabolitos bacterianos capaces de inhibir el desarrollo de microorganismos patogénicos es cada vez más pertinente. Igualmente, deben buscarse alternativas que permitan la producción de estos compuestos a gran escala para incrementar la eficiencia y rentabilidad del proceso con el objetivo de hacerlos cada vez más atractivos en términos comerciales (Berdy, 2005; Subramani & Aalbersberg, 2012).

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Los resultados de este trabajo permiten concluir que la metodología de raíces desprendidas es eficaz para evaluar la capacidad infectiva de aislamientos de *P. cinnamomi*. De los aislamientos evaluados, los codificados como ANSS07 y P35, correspondientes al oriente y suroeste Antiqueño, respectivamente, presentaron los mayores porcentajes de infección. La técnica de raíces desprendida podría ser efectiva para evaluar otro tipo de características, como resistencia o tolerancia en el hospedero, ya sea frente a *P. cinnamomi* o frente a otros patógenos de interés.

En este estudio se observó que los microorganismos antagonistas aislados de la rizósfera de plantas de aguacate tienen un alto potencial para ser explotados como controladores biológicos. Como los aislamientos *Serratia* sp. (AED38) y *Serratia* sp. (AED56) que mostraron tener la capacidad para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* P35, según los resultados obtenidos a nivel *in vitro*. No obstante, es necesario realizar una futura identificación de estos aislamientos a nivel de especie y la caracterización de sus metabolitos con el propósito de confirmar si la producción de estos compuestos activos con capacidad antioomycete frente a *P. cinnamomi* está relacionada con la especie o dependen más de las condiciones medioambientales a las que se encontraban expuestos. De igual manera, cabe mencionar que el medio de cultivo que se emplea para la producción de estos compuestos con actividad también ejerce una presión sobre ellos.

El aislamiento antagonista *Serratia* sp. (AED38) fue capaz de producir metabolitos lo suficientemente activos para inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* P35 en plántulas de aguacate. Estos resultados fueron comparables a los de un fungicida sintético comercial, lo que convierte a este extracto en candidato potencial para el desarrollo de nuevos biopesticidas como agente de control biológico.

## 4.2 Recomendaciones

La mayoría de especies que se reportan del genero *Serratia* sp. son conocidas como patógenos humanos. Para futuros estudios se recomienda evaluar la toxicidad de los extractos producidos por *Serratia* sp. AED38 en líneas celulares con el propósito de investigar más a fondo sus efectos en la salud humana y animal.

Como una alternativa sostenible para el uso de estos extractos como futuros controladores biológicos, sería apropiado realizar estudios que permitan incrementar la producción de los compuestos activos. Este tipo de estudios permitirían la evaluación de rendimientos y rentabilidades de implementar procesos de producción en mayor escala. Adicionalmente, deben implementarse procesos de semipurificación y purificación que permitan identificar los compuestos activos.

## A. Anexo A: Preparación medio PDA PARBH o PDA con antibióticos

1. Pesar 39 g de PDA marca merck y disolver en un erlenmeyer con 1 litro de agua destilada.
2. Autoclavar y dejar a temperar por unos minutos sin dejar solidificarse.
3. Agregar los antibióticos y fungicidas preparados de la siguiente forma.

Reactivo	Concentración	Cantidad	Solvente	Cantidad de solvente
PCNB	4 mg/L	4 mg	Acetona	20 mL
Ampicilina	5 mg/L	5 mg	Agua	20 mL
Rifampicina	0.2 mg/L	0.2 mg	Agua	20 mL
Benomil	0.4 mg/L	0.4 mg	Agua	20 mL
Hymexazol	25 mg/L	70 $\mu$ L	Agua	-

4. Mezclar bien y servir en cajas petri.
5. Dejar gelificar y guardar en nevera a 4°C hasta su posterior uso en el laboratorio.

## B. Anexo B: Preparación medio VK

Reactivo	Concentración para 1000 mL	Concentración para 200 mL
Glicerol	5 g	1 g
Extracto de levadura	10 g	2 g
Corn Starch	10 g	2 g
Corn Steep Solids (Maisquellwasser)	10 g	2 g
CaCO <sub>3</sub>	10 g	2 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL	200 mL

Antes de autoclavar el medio de cultivo ajustar pH a 6.5



## Referencias

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20.
- Akinsanmi, O. A., & Drenth, A. (2013). Phosphite and metalaxyl rejuvenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Crop Protection*, 53, 29-36. doi:10.1016/j.cropro.2013.06.007
- Alippi, A. M., & Reynaldi, F. J. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(3), 141-146. doi:10.1016/j.jip.2005.12.002
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites - A personal view. *JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, 58(1), 1-26.
- Bernal, J. A., Diez, C. A., Tamayo, P., Cordoba, O. d. J., & Londoño, M. E. (2008). *Tecnología para el cultivo del aguacate* (Corpoica. Ed.): Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de investigación La Selva, Ríonegro, Antioquia, Colombia.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001
- Bosmans, L., De Bruijn, I., De Mot, R., Rediers, H., & Lievens, B. (2016). Agar composition affects in vitro screening of biocontrol activity of antagonistic microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 7-9.
- Botha, T., Wehner, F. C., & Kotze, J. M. (1989). An evaluation of in vitro screening techniques for determining tolerance of avocado rootstocks to *Phytophthora cinnamomi*. *SA Avocado Growers' Assn. Yrbk*, 12, 60-63.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040

- Cañas, G. G. P., Galindo, L. L. F., Arango, I. R., & Saldamando, B. C. I. (2015). Diversidad genética de cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 129-143.
- Chalfoun, S. M. (2010). Biological control and bioactive microbial metabolites: A coffee quality perspective. *Ciencia e Agrotecnología*, 34(5), 1071-1085.
- Cheol, K. Y., Gyeong P.J., Hui, H.S., Jun, O.B., Am, K.S., Song, N.H., (2013). U. C. Nat.
- Ciro, D., Rendon, K., & Navarro, R. (2006). Reconocimiento de la pudrición de raíces (*Phytophthora cinnamomi*) en aguacate (*Persea americana*) en Antioquia. *Rev Universidad Católica de Oriente*, 22, 41-51.
- Clarke, B. B., White Jr, J. F., Hurley, R. H., Torres, M. S., Sun, S., & Huff, D. R. (2006). Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90(8), 994-998.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Cundom, M. A., de Gaiad, M., de Castañón, M. A. M., de Arriola, S. A. G., & Coutinho, M. (1999). Actividad Antagónica in vitro de Hongos Saprofitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE. Actas.
- Damm, U., Baroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O'Connell, R., Weir, B., . . . Cannon, P. F. (2010). Colletotrichum: Species, ecology and interactions. *Journal of Microbiology and Antimicrobials - Fungus*, 2, 161-165.
- Del Castillo, M., J., Cárdenas, M., Pinzón, A., Castañeda, A., Bernal, A. J., & Restrepo, S. (2013). Developing a taxonomic identification system of *Phytophthora* species based on microsatellites. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(2), 88-95. doi:10.1016/j.riam.2012.11.002
- Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., & Irwin, J. A. G. (2006). Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 147-159.
- Fernández-Aguilar, R., Oyervides-García, A. L.-B., & Espinoza-Velázquez, S. (2012). Respuesta de Cuatro Genotipos de Maíz Tropical al Achaparramiento Ocasionado por *Spiroplasma kunkelli*. *Comité Editorial*, 9(3), 81.
- Fierro Corrales, D. (2011). Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán.
- Firáková, S., Šturdíková, M., & Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biología*, 62(3), 251-257. doi:10.2478/s11756-007-0044-1

- Garbeva, P., & De Boer, W. (2009). Inter-specific Interactions Between Carbon-limited Soil Bacteria Affect Behavior and Gene Expression. *Microbial Ecology*, 58(1), 36-46. doi:10.1007/s00248-009-9502-3
- Garbeva, P., Silby, M. W., Raaijmakers, J. M., Levy, S. B., & de Boer, W. (2011). Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME journal*, 5(6), 973-985.
- Garnica, D. P., Pinzón, A. M., Quesada-Ocampo, L. M., Bernal, A. J., Barreto, E., Grünwald, N. J., & Restrepo, S. (2006). Survey and analysis of microsatellites from transcript sequences in *Phytophthora* species: Frequency, distribution, and potential as markers for the genus. *BMC Genomics*, 7. doi:10.1186/1471-2164-7-245
- Godinho, V. M., Gonçalves, V. N., Santiago, I. F., Figueredo, H. M., Vitoreli, G. A., Schaefer, C. E. G. R., . . . Rosa, L. H. (2015). Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*. doi:10.1007/s00792-015-0741-6
- Granada, S. D., Rueda, A., & Peláez, C. A. (2014). Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanum phureja*) crops. *Summa Phytopathologica*, 40(3), 212-220.
- Hakizimana, J. D., Gryzenhout, M., Coutinho, T. A., & van den Berg, N. (2011, 2011). *Endophytic diversity in Persea americana (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against Phytophthora cinnamomi*.
- Horta, M., Sousa, N., Coelho, A. C., Neves, D., & Cravador, A. (2008). In vitro and in vivo quantification of elicitin expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73(1), 48-57.
- Hoyos, P. A., De León, C., Gayosso, E. M., Barquera, M. d. I. C. E., Alvarado-Rosales, D., & Jiménez, A. L. (2015). Totipotencialidad en plántulas de aguacate en la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*(2), 361-373.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- Khoa, N. Đ., Giàu, N. Đ. N., & Tuấn, T. Q. (2016). Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, 103, 1-10.
- Koch, R. (1876). Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57(1), 1-12.
- Lopez, H. (2004). HONGOS DEL SUELO EN EL CULTIVO DE AGUACATE. LIMA, PERU.
- Ludwig-Müller, J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters*. doi:10.1007/s10529-015-1814-4

- María Teresa, R.-C., Rosaura, V.-G., Elda, C.-M., & Ernesto, G.-P. (2014). The avocado defense compound phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl) is induced by arachidonic acid and acts via the inhibition of hydrogen peroxide production by pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 87(0), 32-41. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.05.003
- Mejía, A. (2010). *Cadena Productiva del Aguacate en Colombia*. Consejo Nacional del Aguacate. Paper presented at the Memorias del II Encuentro de la cadena productiva del aguacate.
- Morales, J. (2009). *Enfermedades de importancia económica en el cultivo de aguacate*. Paper presented at the III Congreso Latinoamericano del aguacate, Medellín.
- Morgan, B. R., & Shearer, B. L. (2013). Soil type and season mediated *Phytophthora cinnamomi* sporangium formation and zoospore release. *Australasian Plant Pathology*, 42(4), 477-483. doi:10.1007/s13313-013-0201-7
- O'Gara, E., Howard, K., McComb, J., Colquhoun, I. J., & Hardy, G. E. S. J. (2015). Penetration of suberized periderm of a woody host by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 64(1), 207-215. doi:10.1111/ppa.12244
- Pegg, K. G., Whiley, A. W., Saranah, J. B., & Glass, R. J. (1985). Control of phytophthora root rot of avocado with phosphorus acid. *Australasian Plant Pathology*, 14(2), 25-29. doi:10.1071/APP9850025
- Páez, F. A. R., Salazar, V. G., Acosta, J. G. G., & López, P. A. O. (2016). Caracterización molecular, análisis morfológico y colonización micorrízica en la rizósfera del aguacate (*Persea americana* Mill) en Caldas, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(4).
- Pérez-Jiménez, R. M. (2008). Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol*, 2, 1-24.
- Ramírez Gil, J. G., Castañeda Sánchez, D. A., & G., M. O. J. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 61(1), 50-61. doi:10.1590/S0034-737X2014000100007
- Ramírez, G. J. G., Castañeda, S. D. A., & Morales, O. J. G. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 61(1), 50-61. doi:10.1590/S0034-737X2014000100007
- Ramírez, S., Arias, J. D., Bedoya, J. C., Rueda, E. A., Sánchez, C. Y., & Granada, S. D. (2015). Metabolites produced by antagonistic microbes inhibit the principal avocado pathogens in vitro. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 58-63.
- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*.
- Rookes, J. E., Wright, M. L., & Cahill, D. M. (2008). Elucidation of defence responses and signalling pathways induced in *Arabidopsis thaliana* following challenge with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), 151-161. doi:10.1016/j.pmpp.2008.08.005

- Ríos, C. D., & Tafur, R. R. (2003, 2003). *Varietades de aguacate para el trópico: caso Colombia*.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*.
- Scott, P. M., Barber, P. A., & Hardy, G. E. S. J. (2015). Novel phosphite and nutrient application to control *Phytophthora cinnamomi* disease. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 431-436. doi:10.1007/s13313-015-0365-4
- Serrano, M. S., de Vita, P., Rebollo, P. F., & Sánchez, M. E. (2011). Control de la podredumbre radical de encinas mediante fertilizantes inorgánicos II: efecto "in vitro" del Ca y el K en la capacidad infectiva de " *Phytophthora cinnamomi*". *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 37(1), 109-118.
- Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051-1056.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205-221.
- Sierra, G. I. N., Romero, T. M., & Orduz, P. S. (2012). DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INSECTICIDA DE EXTRACTOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELO. *Actualidades Biológicas*, 34, 5-19.
- Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), 571-580. doi:10.1016/j.micres.2012.06.005
- Tamayo, P. J. (2007). Enfermedades del Aguacate. *Revista Politecnica*, 1(4), 51-70.
- Ticona, V., Nieta, M., Irahola, P., & Gimenez, A. (1998). Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. *Biofarbo*, 6(6), 11-16.
- Tokpah, D. P., Li, H., Wang, L., Liu, X., Mulbah, Q. S., & Liu, H. (2016). An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. *Biological Control*, 103, 21-29. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.009
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*.
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., & Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 51(5), 574-584. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x
- Yabrudy, J. (2012). *El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano*. (171). Cartagena: Banco de la República.

- Zabka, M., & Pavela, R. (2013). Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*(6), 1051. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.076
- Zentmeyer, G. A. (1980). *Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes*.
- Zilberstein, M., & Pinkas, Y. (1987). Detached root inoculation--a new method to evaluate resistance to *Phytophthora* root rot in avocado trees. *Phytopathology*, 77(6), 841-844.