

**ANÁLISIS PRELIMINAR DEL COMPORTAMIENTO DE DOS BACTERIAS CON
POTENCIAL BIONCONTROLADOR EN LA CARPOSFERA DE AGUACATE
HASS (*Persea americana* Mill.) EN ETAPA POSTCOSECHA.**

Por

Walter Aldair Morales Acevedo

Universidad de Pamplona

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas

Pamplona, Colombia

2021

ANÁLISIS PRELIMINAR DEL COMPORTAMIENTO DE DOS BACTERIAS CON
POTENCIAL BIONCONTROLADOR EN LA CARPOSFERA DE AGUACATE HASS
(*Persea americana* Mill.) EN ETAPA POSTCOSECHA.

Walter Aldair Morales Acevedo

Trabajo de grado como requisito para optar al título de: Microbiólogo

Tutores

Camilo Ramírez Cuartas

Ing. Agrónomo/Lic. en Filosofía, M.Sc., Ph.D. Universidad de Antioquia.

David Borrego Muñoz

Microbiólogo, M.Sc., Ph.D. Universidad de Antioquia.

Francisco Rodríguez Rincón

Biólogo, M.Sc., Ph.D. Universidad de Pamplona.

Universidad de Pamplona

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas

Pamplona, Colombia

2021

Dedicatoria

A mi familia, al esfuerzo y apoyo de mis padres que han forjado los cimientos de quien soy. A la nona Celmira por esperar este momento, a la memoria de los nonos que no están aquí hoy y al amor de Antonia.

Resumen

El aguacate Hass (*Persea americana* Mill.) por su aporte nutricional y sus propiedades organolépticas es un fruto muy apetecido a nivel mundial, lo que representa un alto impacto económico en su producción. El aumento en la demanda internacional ha incentivado a los países productores como Colombia aumentar su producción y así satisfacer esta necesidad identificando una oportunidad económica. El alcance en el mercado mundial se ha visto limitado por factores como el manejo de las enfermedades postcosecha que llegan a representar pérdidas de hasta el 70%, estas son producidas por agentes fúngicos como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* que causan la antracnosis y pudrición del extremo del tallo (Bowen et al., 2018). Así mismo, se han empleado métodos para combatir la afectación del fruto por medio del empleo de fungicidas de naturaleza química en busca de mejorar la admisibilidad sanitaria, en vista de que se necesitan aprobaciones y certificaciones de diferentes entidades nacionales e internacionales. Sin embargo, el frecuente empleo de estos métodos químicos representa un alza en los costos de producción, desarrollo en la resistencia de los fitopatógenos y la presencia de estos residuos de fungicidas en el fruto como alimento acarrea riesgos para la salud del consumidor y el medio ambiente.

Por lo anterior, en los últimos años se ha impulsado el interés de desarrollar alternativas sostenibles para prevenir y promover la calidad de inocuidad del fruto, esto mediado por el biocontrol con microorganismos denominados agentes de control biológico (BCA) con capacidad antagonista sobre los patógenos inhibiendo su proliferación, que además de esto, pueden inducir de manera indirecta la resistencia en el tejido de la planta huésped y reforzarla contra estos patógenos (Feliziani & Romanazzi, 2016). Bacterias como las del género *Pseudomonas* y *Bacillus* se han convertido agentes de biocontrol atractivos, este último gracias a su capacidad para producir endosporas resistentes y sintetizar compuestos antimicrobianos que controlan una amplia gama de patógenos vegetales (Shafi et al., 2017). Bajo este contexto, se propuso llevar a cabo un análisis preliminar del comportamiento poblacional de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y del aislamiento UA1525 identificado como una especie del género *Pseudomonas* sobre la carposfera de aguacate Hass, aplicando tratamientos de solución de esporas y bacterias; determinando su índice poblacional en un rango de 5 tiempos distribuidos en 15 días, esto, por medio de recuentos en placa a partir de tejidos de 1 cm² repartidos equitativamente en el fruto. De esto, se determinó que estas bacterias no lograron colonizar la carposfera de Aguacate Hass. y que persistieron a través de una proporción de células metabólicamente activas y esporas por menos de 8 días, donde *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp pudo persistir en un índice poblacional mayor que *Pseudomonas* sp. UA1525 gracias a su capacidad de producir endosporas que le permiten sobrevivir a condiciones adversas comportándose de manera fluctuante por su naturaleza al reproducirse en sus etapas del ciclo vegetativo y de esporulación.

Agradecimientos

El eterno agradecimiento siempre será a mis padres, mi madre por darme la vida en todo sentido, hasta el final de sus días y de los míos. A mi padre por sus constantes enseñanzas en la nobleza de su corazón, a mi hermana, mi pequeño hermano y Antonia por incentivar mi motivación.

Quiero agradecer con mucho aprecio a las profesoras Liliana Rojas, Ángela Cajiao y todos los profesores y muchachos del grupo GIMBIO del departamento de microbiología de la Unipamplona por todo el tiempo, apoyo, grandes enseñanzas y momentos que hicieron del semillero de investigación el ambiente más ameno en mi primera cercanía con la ciencia, su investigación y su gente, en especial a mi amigo Criss, con buenos momentos y recuerdos en esos años.

Al profesor Camilo Ramírez por confiar en mí y darme la oportunidad de recibirme en su grupo de investigación, a David Borrego y los demás muchachos de BA&A que además de formar un excelente escenario de pensamientos e intercambio de conocimientos como laboratorio, fueron personas con calidad humana extraordinaria.

También agradecerle al profesor Francisco Rodríguez por su formación académica durante mi curso en el pregrado y su guía en este trabajo de grado.

Tabla de contenido

Resumen.....	i
Tabla de contenido	iii
Lista de figuras	v
Lista de tablas.....	vi
Lista de anexos	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	3
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Cultivo de Aguacate	5
4.2. Taxonomía, clasificación y morfología	6
4.3. Condiciones climáticas y requerimientos edáficos del cultivo.....	7
4.4. Propagación	9
4.5. Fruto de Aguacate	10
4.6. Variedades del aguacate	11
4.7. Desarrollo del fruto y su fisiología postcosecha	12
4.8. Factores de manipulación en postcosecha que afectan la calidad de la fruta....	12
4.9. Plagas y enfermedades del fruto	13
4.9.1. Insectos del fruto.....	13
4.9.2. Enfermedades que afectan el fruto.....	14
4.10. Enfermedades frecuentes en la postcosecha	15
4.11. Control químico de enfermedades	16
4.12. Control biológico	17
4.13 Los agentes de control biológico (BCA) en la comunidad microbiana.....	18
4.14. El género <i>Bacillus</i> spp. como agente de control biológico	18
4.14.1. Mecanismos de acción del género <i>Bacillus</i> spp. como agente biocontrolador	20

4.15. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	21
4.16. El género <i>Pseudomonas</i> spp. y sus mecanismos de acción como agente de control biológico.	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. Diseño experimental	23
5.2. Cepas y material vegetal	23
5.3. Evaluación del marcador de selección en la cepa modelo <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42gfp.....	24
5.4. Confirmación de la identificación a nivel molecular del aislamiento UA1525 ..	24
5.5. Comportamiento poblacional de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42gfp y <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.....	26
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1. Descripción y acondicionamiento de aislamientos bacterianos.....	28
7.2. Evaluación del marcador de selección en la cepa modelo <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42gfp.....	30
7.3. Confirmación de la identificación del aislamiento UA1525.....	31
7.4. Comportamiento poblacional de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42gfp y <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.....	35
8. CONCLUSIONES	43
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	45
10. ANEXOS	56

Lista de figuras

Figura 1. Árbol de Aguacate Hass. (<i>Persea americana</i> Mill.) cultivado en el departamento de Antioquia.	7
Figura 2. Partes del fruto de Aguacate Hass.	11
Figura 3. Frutos de Aguacate Hass. afectados con las enfermedades más frecuentes en la postcosecha.	16
Figura 4. Ciclo reproductivo del género <i>Bacillus</i>	19
Figura 5. Vista morfológica de la macro y microscopía en ampliación total de 1000x de los aislamientos usados en los ensayos del estudio.	29
Figura 6. Vista macroscópica del aislamiento nativo <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en medio de cultivo KB bajo irradiación UV en el transiluminador (Labnet Enduro™ GDS).	30
Figura 7. Patrón de bandeo de amplicones del aislamiento UA1525 en gel de agarosa 1%.	32
Figura 8. Densidad poblacional de células vegetativas y esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.	36
Figura 9. Comportamiento poblacional de <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.	38
Figura 10. Comportamiento poblacional de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp frente a <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.	42

Lista de tablas

Tabla 1. Data del año de arribo del cultivo de <i>Persea americana</i> Mill. en algunos países del mundo.....	5
Tabla 2. Límites máximos de residuos (LMR) de fungicidas comúnmente empleados para controlar <i>L. theobromae</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	17
Tabla 3. Cronograma de actividades realizadas durante la estancia en el grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental BA&A de la Universidad de Antioquia.....	27
Tabla 4. Identificación del aislamiento UA1525 asociado a la rizosfera de aguacate Hass a partir de análisis en las bases de datos GenBank de la NCBI, RDP y EMBL-EBI.	33

Lista de anexos

Anexo 1. Medio de cultivo B de King (KB) (King et al., 1954).	56
Anexo 2. Medio de cultivo Tripticasa de Soja Agar (TSA) Eritromicina.	56
Anexo 3. Recuento en placa de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} por duplicado (en dirección izquierda a derecha) de esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp en el primer tiempo de análisis en medio TSAeri	56
Anexo 4. Recuento en placa de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} por duplicado (en dirección izquierda a derecha) de células totales de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp en el primer tiempo de análisis en medio TSAeri.	57
Anexo 5. Recuento en placa de las diluciones 10^{-2} , de <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en exposición bajo UV en el transiluminador.....	57
Anexo 6. Informes de los recuentos en placa obtenidos en los ensayos del comportamiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp en carposfera de Aguacate Hass.....	58
Anexo 7. Informe final de los ensayos del comportamiento de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp en carposfera de Aguacate Hass.	59
Anexo 8. Informes de los recuentos en placa obtenidos en los ensayos del comportamiento de <i>Pseudomonas</i> sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.	60

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate Hass (*Persea americana* Mill.) es una fruta climatérica y subtropical originada de la parte central de México y algunas zonas del norte de Guatemala, considerada una fruta muy saludable y nutritiva (Rodríguez et al., 2011). A la vista internacional el aguacate es muy apetecido y de gran importancia económica, en este mercado mundial se ha desarrollado un aumento en la demanda, lo que se relaciona con la creciente oferta en la producción. México es el principal productor mundial con aproximadamente el 43%, mientras que Colombia llega al 1.1% (Munhuweyi & Sivakumar, D. 2020). Así mismo, hay deficiencia en los países productores que no alcanzan a satisfacer las necesidades de los países consumidores, por lo Colombia despierta el interés de ser partícipe en exportación de aguacate, aumentando sus áreas de cultivo con el fin de orientar la oferta a destinos como Estados Unidos, los Países Bajos, Francia, Alemania, España, el Reino Unido y China (Arias et al., 2018; Xion & Song 2018; Sandoval et al., 2021). A nivel mundial el comercio de aguacate ha generado grandes ingresos, en el 2018 se generó la suma de USD \$5.6 mil millones, a partir de 6.4 millones de toneladas de producción a nivel mundial, donde 2.4 millones de toneladas de estas se destinaron a exportación (WAMAFSTI).

En Colombia para mayo del 2020, se logró exportar 30.344 toneladas de aguacate Hass. En cifras nacionales según el ministerio de agricultura colombiano, las evaluaciones Agropecuarias Municipales y ASOHOFRUCO estimó que en el país existen cerca de 16.500 productores en aproximadamente 39.172 unidades productivas que tienen como principal actividad económica el cultivo de aguacate, para ese mismo año 2020 se reportó que el área de siembra de Aguacate Hass fue de 26.045 hectáreas, donde el área cosechada fue de 16.772 hectáreas produciendo 167.724 toneladas, equivalente al 26% del total de área sembrada con aguacate en el territorio colombiano, el departamento de Antioquia es quien actualmente se consolida como el mayor poseedor de área nacional sembrada y producción del país (Orrego et al., 2021). Antioquia también ha sido el líder en el mercado exterior a nivel nacional durante el año 2019 y 2020 con aportes de más del 58% de la producción con fines de exportación, notificado también por el ministerio de agricultura por medio de los reportes del Sistema de Información de Aduanas para la investigación de mercados de comercio exterior SISDUAN. El inconveniente más importante que han encontrado los productores colombianos es el manejo de enfermedades postcosecha, la salud del fruto en esta etapa se ve afectada por la antracnosis y pudrición del extremo del tallo causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* (Bowen et al., 2018), estas enfermedades causadas por los agentes fúngicos se han controlado bajo la implementación de fungicidas protectantes de naturaleza química, tras los efectos nocivos que acarrearán consumir frutos contenidos de fungicidas de y los residuos que se depositan en el suelo, emerge una importante estrategia del control de enfermedades del fruto de Aguacate Hass en postcosecha, los agentes de control biológico o BCA, crean antagonismo sobre los patógenos inhibiendo su proliferación, además de esto, pueden inducir de manera indirecta la resistencia en el tejido

de la planta huésped y reforzarla contra estos patógenos (Feliziani & Romanazzi, 2016). Algunas especies del grupo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes y el género *Bacillus* se han convertido agentes de biocontrol atractivos, este último gracias a su capacidad para producir endosporas resistentes y sintetizar compuestos antimicrobianos que controlan una amplia gama de patógenos vegetales (Shafi et al., 2017). Estudios anteriores realizados *in vitro* usando especies del género *Bacillus* han demostrado el efecto de antagonismo frente a diversidad de fitopatógenos de naturaleza fúngica como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinérea* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Chaurasia et al., 2005; Yuan et al., 2012; Chaves-López et al., 2015; Gao et al., 2017; Lozano, 2017). En aguacate Hass (*Persea americana* Mill.) también se ha estudiado el género *Bacillus*, Guevara et al. (2019) demostró que aislamientos de la rizosfera de aguacate suprimieron mediante ensayos de antagonismo la proliferación de agentes patógenos comunes del aguacate como *C. gloeosporioides* y *Phytophthora cinnamomi* causantes de la antracnosis y pudrición de la raíz respectivamente. Así mismo, Lozano (2017) realizó pruebas con algunas especies de *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, incluyendo cepas modelo *B. subtilis* UA321, *B. amyloliquefaciens* FZB42 y FZB4gfp donde desarrolló pruebas de biocontrol sobre frutos de mango (*Mangifera indica* L.) inoculando la carposfera del fruto para el control de la antracnosis de 3 cepas diferentes de *C. gloeosporioides* alcanzando niveles de reducción en la afectación mayores del 80%. También se ha registrado que *B. amyloliquefaciens* FZB42 ha tenido efectos de promoción de crecimiento y a su vez control biológico de enfermedades en modelos vegetales como tomate, pepino, algodón, tabaco y lechuga (Guel et al., 2008; Wang et al., 2009; Chowdhury et al., 2013, 2015). Por otro lado, Guevara et al. (2019) también expuso en su estudio que especies del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes tuvo gran actividad antimicrobiana contra hongos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* y *Pythium ultimum*. Este grupo de bacterias se han estudiado como agentes de biocontrol teniendo un gran desarrollo metabólico llegando a producir variedad de metabolitos secundarios como antibióticos y sideróforos (Oni et al., 2015; Santoyo et al., 2012). A partir de esto, de los antecedentes del potencial antagonismo que se tienen de estas bacterias y bajo la necesidad de expandir el estudio del comportamiento de microorganismos con interés e importancia de biocontrol, se cree que el control de las enfermedades por parte de géneros como *Bacillus* se puede relacionar con la germinación y prevalencia de las esporas inoculadas, que deberían mantenerse metabólicamente activas durante la enfermedad o llegar a prevenir esta, sumándose con ello la producción de metabolitos secundarios bioactivos. Siendo así, el presente trabajo propone realizar una evaluación preliminar a la persistencia de aislamientos bacterianos como la cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y la cepa nativa de *Pseudomonas* sp. UA1525 pertenecientes a la colección de bacterias del grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental BA&A de la Universidad de Antioquia como potenciales agentes de control biológico BCA que sobreviven y protegen a través del tiempo en la carposfera del fruto de Aguacate Hass con fines de exportación, en busca de aportar estudios que promuevan la optimización del uso y aplicación de estos agentes de control biológico en cultivo para el reemplazo de agroinsumos químicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la colonización y persistencia de dos aislados con potencial biocontrolador en la carposfera de frutos de Aguacate Hass en postcosecha.

2.2. Objetivos específicos

- Describir la dinámica de sobrevivencia de dos aislados con potencial biocontrolador en carposfera de Aguacate Hass en postcosecha.
- Analizar la confirmación de la identificación a nivel molecular del aislamiento nativo UA1525 producto de un estudio previo y que posee potencial biocontrol en carposfera de Aguacate Hass en postcosecha.

3. JUSTIFICACIÓN

La tendencia en aumento del consumo y comercialización de aguacate Hass en el mercado internacional se impulsa por el poder de adquisición del consumidor, así mismo son la madurez, apariencia, sabor, calidad y nutrición del fruto. A partir de esto, en un panorama nacional, el aumento acelerado de las áreas de producción de aguacate en el país con fines de exportación requieren el desarrollo e implementación de tecnologías adecuadas con el fin de planificar y gestionar los cultivos de manera óptima, por esta razón, los desafíos que se presentan en la calidad postcosecha del aguacate, se dan por daños mecánicos durante el procesado, maduración desigual, daño por frío y enfermedades producidas por insectos y microorganismos fitopatógenos (Munhuweyi & Sivakumar, 2020). Este último representa el mayor obstáculo para conseguir la calidad e inocuidad de los frutos de aguacate Hass en el proceso de exportación. Afecciones en el fruto causadas por un agente fúngico llegan a representar el 70% de las pérdidas, entre estas enfermedades la antracnosis y pudrición del extremo del tallo causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* (Bowen et al., 2018) que se pueden adquirir desde el cultivo y evidenciarse durante la etapa de postcosecha desarrollando pudriciones corporales que provocan imperfecciones en las partes comestibles, reduciendo la apariencia y valor, que a su vez, genera rechazos en el mercado internacional que representan graves pérdidas económicas del aguacate de exportación (Munhuweyi & Sivakumar, 2020). El manejo de estas enfermedades involucra una prevención o un tratamiento en donde el gobierno colombiano busca a través del Instituto Colombiano Agropecuario ICA mejorar la admisibilidad sanitaria del producto, en vista de que se necesitan aprobaciones y certificaciones de diferentes entidades nacionales e internacionales, se trabaja en orientar y consolidar estrategias que permitan lograr el cumplimiento de los requisitos con énfasis en el control fitosanitario y manejo cultural adecuado demandados por el mercado internacional (Ministerio de Agricultura, 2020). La regulación a nivel nacional está regida por las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) otorgada por el ICA que busca reducir los riesgos biológicos en la producción, cosecha, procesamiento

y acondicionamiento hortofrutícola por medio de la gestión del riesgo y prevención en los cultivos de Aguacate Hass contando con herramientas necesarias para evitar contaminaciones en los frutos durante su producción (Parra & Serrano, 2017).

A raíz de esta problemática, las enfermedades postcosecha del aguacate se han ido controlando con la aplicación de diferentes fungicidas de naturaleza química, a pesar de que hoy en día estos fungicidas sintéticos en campo pueden llegar a ser el método más eficaz para controlar enfermedades postcosecha en frutas y hortalizas, constantes solicitudes de consumidores, el interés de la comunidad científica y la industria de los alimentos han motivado la emergencia de alternativas frente al tratamiento de origen químico y así producir y comercializar frutos libres de residuos de fungicidas sintéticos ya que estos llegan a repercutir en la salud del consumidor, donde en algunos casos la aplicación de fungicidas postcosecha ya no está permitida debido a varias restricciones normativas. Adicional a esto, se quiere evitar una excesiva dependencia de los fungicidas dada la aparición de cepas patógenas resistentes a uno o varios fungicidas que desalientan el uso repetitivo, por lo que se hace muy necesario integrar estos sistemas alternativos al control químico en pre y postcosecha siendo igual o más efectivos en extender la salud del fruto del aguacate con fines de exportación. La alternativa de mayor relevancia en investigación busca integrar o reemplazar los tratamientos químicos convencionales son los agentes de control biológico que sean accesibles, de bajo costo, con información sobre dosis, tiempo de exposición, época, número de aplicaciones y su mecanismo de acción en contra de los fitopatógenos (Feliziani & Romanazzi, 2016; Herrera et al., 2020; Munhuweyi & Sivakumar, 2020). Esta es la razón por la cual se propuso realizar ensayos con microorganismos como los pertenecientes al género *Bacillus* y *Pseudomonas* cuyo potencial de control biológico se ha visto respaldado con antecedentes en gran variedad de microorganismos patógenos y en diferentes modelos vegetales buscando aportar estudios que ayuden a promover el uso de estos fungicidas de naturaleza biológica y su optimización en el reemplazo de los insumos químicos, que a su vez ayudaría alcanzar la admisibilidad sanitaria en los mercados internacionales, por lo que se crea una cuestión y es ¿Pueden los aislamientos de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y UA1525 perteneciente a *Pseudomonas* sp. como potenciales agentes de control biológico colonizar y persistir en la carposfera de aguacate Hass? De esta manera se busca una protección al fruto y también ampliar el campo de información científica acerca del comportamiento de estos microorganismos y sus interacciones biológicas *in vitro* para que en base a esto se puedan posteriormente optimizar aplicaciones en campo, pensando en el aprovechamiento biotecnológico.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Cultivo de Aguacate

El aguacate tiene como origen a América, a esta especie se le considera que dio origen al aguacatero proveniente de la zona montañosa que se sitúa en el occidente de México que data del año 291 a.C y Guatemala, su distribución natural recorre desde México hasta Perú, pasando por toda Centroamérica, Colombia, Venezuela y Ecuador (Hiti-Bandaralage et al., 2017; Tamayo et al., 2008). En México se han encontrado fósiles de aguacate con más de 8.000 años de antigüedad, esto da una idea de que los primeros pobladores de Centro y Suramérica, allí domesticaron el árbol centurias atrás del arribo de los europeos a tierras americanas en el año 6.400 a.C (Hiti-Bandaralage et al., 2017). La etimología de la palabra aguacate proviene de la lengua azteca “nahuatl”, el fruto lo comparaban con un testículo por su forma y posición en el árbol y usaban la palabra “ahuacatl” la cual fue usada por primera vez por Francisco Cervantes de Salazar en la obra “México en 1554”. Su nombre anglo es “Avocado” y esta deriva de la palabra en español “abogado” que es adaptada de la palabra de origen azteca. El cultivo se ha domesticado desde la edad precolombina inicialmente por los Aztecas y distribuido desde México hasta Suramérica, en el periodo colonial esta especie fue llevada a las Antillas, Brasil y el Sur de Europa en los siglos XVI y XVII, en el siglo XIX se introdujo a Hawái, La Florida y California. En el caso de Sudáfrica, Argentina e Israel iniciaron los cultivos a nivel comercial en la primera mitad del siglo XX. Posterior a la conquista europea en América el aguacate se diseminó a otros lugares del mundo (Tamayo et al., 2008).

A lo largo del tiempo, esta fruta ha arribado y ha sido cultivada en todo el mundo y debido a su elevada aceptabilidad sensorial y valor nutricional, ha originado considerable atracción en la industria alimentaria de diferentes países (Valdiviezo, 2021), por lo que se tiene en cuenta la historia del aguacate en diferentes países dispersos en el mundo.

Tabla 1. Data del año de arribo del cultivo de *Persea americana* Mill. en algunos países del mundo.

País	Año	País	Año	País	Año
España	1600	Senegal	1824	Filipinas	1890
Jamaica	1650	Singapur	1830	India	1892
Cuba	1700	Florida	1833	Zanzíbar	1892
Ghana	1750	California	1848	Malí	1892
Barbados	1751	Asia	1850	Malasia	1900
Islas Mauricio	1780	Austria	1850	Sudáfrica	1904
Madagascar	1802	Chile	1850	Nueva Zelanda	1910
Brasil	1809	Uganda	1856	Israel	1924
Hawái	1810	Egipto	1870	Turquía	1932

(Fuente: Tamayo et al., 2008).

4.2. Taxonomía, clasificación y morfología

El árbol de Aguacate pertenece al reino *Plantae*, familia *Lauraceae*, orden *Laurales*, género *Persea* y especie *Persea americana* Mill. Este tiene tres razas hortícolas o ecológicas: mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*, M), guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*, G) y antillana (*P.americana* var. *americana*, A). La familia de las Lauráceas la cual está formada por 52 géneros y 3.500 especies, es una de las familias más antiguas de las dicotiledóneas (Alberti et al., 2018; Yasir et al., 2010). El género *Persea* es la única especie frutal con gran importancia comercial dentro de la familia y se conforma por 150 especies que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales principalmente en zonas cálidas de América, Islas Canarias y Asia en donde existen alrededor de 80 especies (Tamayo et al., 2008).

El árbol de *P. americana* es frondoso, siempre verde y de tamaño mediano a grande, en condiciones naturales puede llegar a medir entre 9 a 20 metros de altura, con una copa extensa en donde puede llegar a unos 25 metros de diámetro cuando el árbol es adulto (Tamayo et al., 2008; Araujo et al., 2018). La raíz es muy ramificada, las raíces secundarias y terciarias se distribuyen de manera superficial con una extensión de 60 cm en donde la raíz principal llega a superar un metro de profundidad. El aguacate no llega a formar pelos radiculares muy visibles y se pueden encontrar micorrizas. En cuanto al tallo crece de forma cilíndrica, erecto y leñoso que se ramifica; Este tiene una corteza áspera y las ramas pueden ramificarse con patrones extensivo, intensivo o ambos (Tamayo et al., 2008).

Las hojas del árbol se clasifican en perennes, aunque hay variedades que pueden llegar a perder sus hojas por poco tiempo antes de la floración (Yasir et al., 2010), las hojas pueden llegar a medir entre 8 y 40 cm de largo por 3 a 10 cm de ancho, su forma varía entre elíptica, ovalada, redondeada, cordiforme y lanceolada, el margen puede ser ondulado o entero y la forma del ápice puede llegar a ser agudo u obtuso (Tamayo et al., 2008). El haz de las hojas a menudo es de coloración entre rojizas y verdes cuando son jóvenes, cuando maduran llegan a ser suaves, correosas y de color verde, donde su envés es de un verde opaco; poseen de 4 a 10 pares de nervaduras laterales, estas hojas están dispuestas en espiral y brotan en racimos (Tamayo et al., 2008; Yasir et al., 2010).

Cada árbol de *P. americana* tiene la capacidad de generar hasta un millón de flores en donde solo entre 0.01% y 1% se transforma en fruto, es decir que solo una de cada mil de estas flores, esto por la abscisión de numerosas flores y frutos en desarrollo; por otro lado, un solo árbol puede llegar a producir hasta mil aguacates por año (Araujo et al., 2018; Litz et al, 2007). Las flores varían su color entre verde amarillento, crema, café y rojo con un diámetro de 1 a 1.3 cm (Yasir et al., 2010); se agrupan en una panícula o racimos y son hermafroditas, en donde particularmente se aplica el concepto tradicional de floración bajo protoginia, las flores se abren en dos momentos diferentes, primero como flor femenina y posteriormente los órganos masculinos, de esta manera se evita la autofertilización (Litz et al, 2007; Tamayo et al., 2008). Para la primera cosecha del árbol de aguacate se debe esperar cerca de cinco

años, esto a partir de las semillas en donde se obtienen cerca de 50 frutos y esta producción va aumentando a medida que transcurre el tiempo. Una producción máxima por árbol se obtiene después de 10 años y como se mencionó anteriormente cada árbol puede producir cerca de mil frutos. Si los árboles son injertados, la producción de frutos se puede adelantar hasta 2 años donde la reproducibilidad y calidad se garantizan, así mismo el árbol de aguacate tiene la capacidad de crecer en diferentes condiciones y esto dependerá de su variedad, en condiciones de invierno, climas secos subtropicales, zonas tropicales frescas y regiones de gran altitud, pero no lo hará en condiciones desérticas (Zafar & Sidhu, 2011; Araujo et al., 2018).

Figura 1. Árbol de Aguacate Hass. (*Persea americana* Mill.) cultivado en el departamento de Antioquia.



(Fuente: Autor)

4.3. Condiciones climáticas y requerimientos edáficos del cultivo

En el cultivo de aguacate se deben tener en cuenta múltiples factores, estos resaltan la importancia de una adecuada elección del terreno donde se establecerá una plantación, con esto se evita una baja productividad causada por alguna eventualidad climática o problemas a partir del suelo.

4.3.1. Temperatura. Depende de la altitud, por lo que se hace necesario conocer el lugar en donde se planea establecer el cultivo y también la influencia de la época del año y la posición

de la tierra con respecto al sol, esto también depende de la variedad de *P. americana*, para así seleccionar la adecuada y garantizar su máximo desarrollo. La temperatura en donde el cultivo se desarrolla de manera normal oscila entre 17°C a 24°C y para un óptimo desarrollo se alcanza con una temperatura de 20°C. De manera general el árbol de aguacate requiere de entre 10°C a 17°C como temperatura mínima y de 28°C a 33°C como su máximo de temperatura. De las tres razas que se han mencionado, la raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* se adapta a climas muy fríos, puede llegar a soportar temperaturas de hasta 2.2°C con una óptima en el rango de 5°C a 17°C. *Persea nubigena* var. *guatemalensis*, que es la raza guatemalteca se adapta a las condiciones de las zonas subtropicales que tienen una temperatura óptima de 4°C a 19°C y la raza Antillana *Persea americana* var. *americana* a temperaturas entre 18°C a 26°C. No obstante, antes de que se establezca el cultivo se debe tener en cuenta los datos anteriores de la zona para evitar problemas con las exigencias térmicas de madurez y calidad (Tamayo, 2008; Bernal, 2016; Sánchez et al., 2001; INTAGRI 2019).

4.3.2. Humedad relativa. El aguacate se adapta a climas húmedos y semihúmedos, donde se adapta muy bien bajo condiciones de humedad atmosféricas bajas. Entre las tres razas mexicana, guatemalteca y antillana respectivamente tienen mejor adaptación en el sentido de menor a mayor humedad (Tamayo, 2008).

4.3.3. Precipitación. Se necesitan lugares con régimen de lluvias entre 1.000 a 2.000 mm de lluvia por año. En las tres razas los requerimientos difieren, la raza mexicana necesita precipitaciones sobre 1.500 mm/año, la raza guatemalteca menos de 1.500mm/año y el caso de la raza antillana necesitan menos de 1.000 mm/año (Tamayo, 2008; INTAGRI, 2019). La época productiva se puede prolongar por medio de riegos localizados en donde se puede aumentar el rendimiento hasta un 30% mejorando así mismo las cualidades organolépticas del fruto, no obstante, el cultivo de aguacate es muy sensible al encharcamiento y puede llegar a producirse asfixia radicular que favorece el desarrollo de *Phytophthora cinamomni* quien es responsable de la pudrición en raises (INIA, 2011).

4.3.4. Viento. Teniendo en cuenta que las ramas del árbol de aguacate son muy frágiles y pueden romperse con facilidad, el terreno que se usará para el cultivo debe contar con una protección al viento, por ejemplo, el uso de cortinas rompevientos. El viento no puede ser constante ni alcanzar velocidades superiores de 20 km/hora, de esta manera evitar la ruptura de las ramas, caída de frutos y flores, reducción de la humedad que impide la formación de frutos y la deshidratación que impide la fecundación. (Tamayo, 2008; Bartolí & Ángel, 2008).

4.3.5. Altitud. El aguacate se puede cultivar a partir del nivel del mar hasta 2.500 msnm, aunque se recomienda un rango de altitud de entre 800 y 2.500 msnm evitando enfermedades radiculares (Bartolí & Ángel, 2008). Entre las tres razas que se han tratado la mexicana se adapta a pisos técnicos fríos que son superiores de los 2.000 msnm; la raza guatemalteca tiene un rango de adaptación en altitudes de entre 800 a 2400 msnm situada en pisos fríos

moderados; por otro lado, la raza antillana se sitúa en un piso cálido, donde se puede adaptar a altitudes de 0 hasta 800 msnm (Tamayo, 2008).

En lo que respecta al aguacate y sus requerimientos edáficos, este cultivo necesita suelos muy bien drenados debido a que sus raíces son susceptibles a problemas a nivel de raíz como la asfixia radicular (Tamayo, 2008). Las diferentes características del suelo como el contenido de materia orgánica se requieren en porcentajes de 2.5 a 5%. La textura debe ser liviana para favorecer el sistema radicular denso y ramificado del aguacate, a pesar de que tiene la capacidad de adaptarse a una gran variedad de suelos, el óptimo debe ser de consistencia media, el caso de los suelos arcillosos no se ve conveniente por la deficiencia en el drenaje y los suelos arenosos requieren un programa de riego y fertilización intensos. La profundidad va de la mano con la textura con relación a la cantidad de agua que puede retener el árbol, estos necesitan un suelo moderadamente profundo por sus raíces superficiales. El aguacate con una profundidad de 30 a 40cm puede producir cosechas de manera abundante. En términos de pH el árbol de aguacate toma los nutrientes de manera óptima a niveles de 5.5 a 7, por otro lado, es muy sensible a la salinidad, los valores normales de conductividad eléctrica deben ser menores a 2 o 3 dS/m, si se sobrepasan estos niveles se puede producir quemaduras en las puntas y bordes de las hojas (Bartolí & Ángel, 2008; Tamayo, 2008; INIA, 2011).

4.4. Propagación

Existen diferentes métodos de propagación del aguacate, se puede de una forma sexual por medio de las semillas o de manera vegetativa a partir de estacas, *in vitro* o efectuada por injertos. Este último se usa para la propagación en plantaciones comerciales para asegurar precocidad, homogeneidad y calidad de la fruta, este injerto puede ser por enchapado lateral, yema, la cual puede ser en escudete o parche y de hendidura de una variedad mejorada para un mayor rendimiento y calidad, se introduce sobre una planta criolla o regional que tenga la capacidad de resistir condiciones adversas como sequias, salinidad o enfermedades como la pudrición radicular causada por el Oomycete *Phytophthora cinnamomi* que también afecta el desarrollo, longevidad y producción de las plantas la cual es denominada portainjertos o patrón, estos pueden ser oriundos de semillas o clonales (Tamayo, 2008; Alberti et al., 2018; Rojas et al., 2012).

Este método puede llevarse a cabo en vivero o en el sitio definitivo de la plantación, no obstante, se recomienda realizar la propagación en vivero, el injerto se aplica cuando el tallo del portainjerto o planta patrón tiene por lo menos 1 cm de diámetro y está a 10 cm de la base. El ambiente del lugar debe ser fresco y aireado para lograr una buena unión a nivel vascular entre el portainjerto y el injerto. Entre los diferentes métodos de injerto donde el más difundido o practicado es el injerto de unión lateral, también es muy común usar con buenos resultados el injerto de púa terminal y por otro lado se practica el injerto por hendidura que no resulta con el mismo éxito que las demás. Las púas o varetas a injertar deben provenir

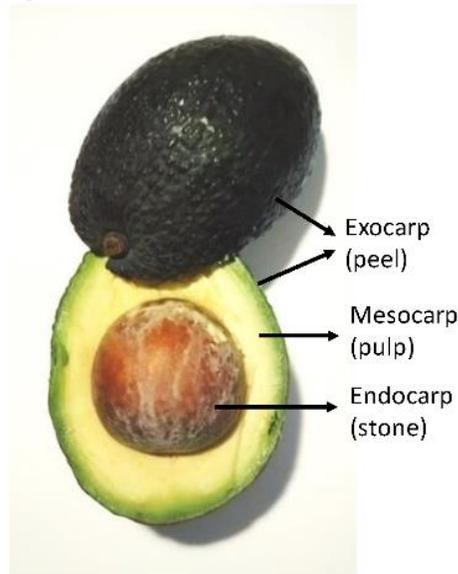
de árboles seleccionados y que representen la variedad que se ha escogido, se recomienda elegir púas de diferentes grosores para contar con un material adaptable a los diámetros de los patrones. El injerto de unión lateral se realiza a una altura del portainjerto aproximada de entre 20 a 30 cm procurando que el cambium, el cual es la franja de células que da lugar tanto a xilema como floema del injerto o vareta y el portainjerto queden en contacto. Posterior a esta unión cubierta con cinta, entre 4 a 8 semanas se elimina progresivamente la parte superior del patrón, finalmente cuando el injerto obtenga una altura de 20 a 25 cm se podrá trasplantar de invernadero al campo definitivo (Tamayo, 2008; Bartolí & Ángel, 2008; INTAGRI, 2018).

4.5. Fruto de Aguacate

El fruto de *P. americana* es una baya que puede variar de piriforme, globosa, obovada o claviforme dependiendo de la variedad, está conformada por una sola semilla grande que se rodea por una pulpa mantecosa. La piel o corteza del fruto es variable en grosor y textura, entre ser muy lisa y luego papilada o con prominencias, ahuecada, lustrosa, opaca, estriada, lobulada, rugosa, surcada o abollada. Su color en la madurez puede ser verde, verde claro u oscuro, amarillento, negro, morado o rojizo, esto según su variedad (Yasir et al., 2010; Araujo et al., 2018). Puede llegar a pesar desde 120 g a 2.5 kg y su fructificación puede darse en frutos solitarios o en racimos (Tamayo, 2008).

La composición nutricional del aguacate es conocida por el alto contenido nutricional y beneficios para la salud, este fruto contiene de 12 a 30% de lípidos, 1.5 a 3% en proteínas, contenido de carbohidratos entre 0.8 y 4.8%, cenizas en rango de 0.8 y 1.5%, entre 1.4 y 3% de fibra y aporte de energía entre 140 y 228 kcal por aguacate. Todas estas características le dan a este fruto grandes posibilidades de aumentar su consumo en la dieta humana (Bartolí & Ángel, 2008; Araujo et al., 2018). Haciendo referencia en su alto contenido de lípidos, es muy importante al compararse con otras frutas, el aguacate es rico en lípidos polares como glicolípidos y fosfolípidos (Ranade & Thiagarajan, 2015). Dentro de los aceites vegetales, el del aguacate contiene grandes niveles de ácidos grasos monoinsaturados como los ácidos oleico y palmitoleico, en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico proporcionan niveles bajos, caso contrario de la cantidad significativa de ácido palmítico y eicosenoico siendo ácidos grasos saturados (Duarte et al., 2016). La cantidad de minerales contenidos en el fruto de aguacate es muy abundante, se incluyen el potasio, fósforo, calcio, sodio y magnesio, en cantidades menores de 1 mg el hierro y zinc. Otra gran ventaja en cuanto al aporte nutricional de esta fruta es el aporte vitamínico, β -caroteno, vitamina E, ácido ascórbico, retinol, tiamina niacina, piridoxina, riboflavina y ácido fólico las cuales tienen relevancia para la salud y bienestar del consumidor (Zafar & Sidhu, 2011; Araujo, et al., 2018; Duarte et al., 2016). Cabe resaltar que la composición de las frutas en general varía dependiendo de la variedad, el grado de maduración, el clima, la composición del suelo y los fertilizantes que se usen.

Figura 2. Partes del fruto de Aguacate Hass.



(García et al., 2020).

4.6. Variedades del aguacate

El fruto de aguacate presenta diferentes características dependiendo de la variedad, tanto como su forma, peso, coloración y tamaño, al igual influyen las condiciones climáticas y prácticas agrícolas durante el cultivo. En la actualidad se han llegado a identificar más de 500 variedades de aguacate, pero la mayoría no tiene éxito en su producción comercial (Yahia & Woolf, 2011). Como se ha mencionado en anteriores veces, a nivel botánico el aguacate se clasifica en tres grupos o razas como lo son la mexicana, guatemalteca y la antillana, esto para resaltar que actualmente las variedades que más se comercializan son basados en cultivos híbridos como por ejemplo el aguacate de variedad Hass, el cual es un híbrido guatemalteco-mexicano (Cowan & Wolstenholme, 2016; Araujo, et al., 2018).

4.6.1. Variedad de Aguacate Hass, es el principal cultivar a nivel mundial, originario de Habra Heights, California a responsabilidad de Rudolph G. Hass quien a partir de una semilla establecida en el siglo XX con mayor cercanía a progenie guatemalteca y se piensa que proviene del antiguo cultivar Lion (Tamayo, 2008). Esta variedad híbrida posee un 10 a 15% de las características de la raza mexicana y el restante, 85 a 90% de la raza guatemalteca, esta variedad es autofértil, aun así, se obtienen mejores resultados cuando se poliniza con las variedades Fuerte y Ettinger (Bartolí & Ángel, 2008). Los frutos son de tamaño mediano con forma oval o piriforme con un peso promedio entre 150 y 400g con un largo de 8 a 10cm. La cascara o exocarpo es gruesa y con textura rugosa con una coloración verde que se oscurece hasta el negro al madurar, esta coloración es normal en el proceso y ayuda como

indicador natural de la madurez del consumo. La pulpa tiene una coloración amarilla con textura cremosa y sin fibras con una semilla pequeña y esférica adherida a este mesocarpio, adicional a esto el contenido de grasa de esta pulpa puede ir desde el 17% hasta el 21%. La relación de la cascara, semilla y pulpa es de 8.5, 11.5 y 72 % respectivamente, en Colombia bajo condiciones del clima moderadamente frías que van de 1.800 a 2.600 m.s.n.m son las mejores para la siembra de esta variedad de aguacate (Tamayo, 2008; Araujo, et al., 2018; Zafar & Sidhu, 2018).

4.7. Desarrollo del fruto y su fisiología postcosecha

Dentro del crecimiento, desarrollo y maduración, el aguacate Hass es un fruto climatérico, este particularmente no produce etileno mientras está adherido al árbol, es decir, madura solo en el momento posterior a su cosecha, no obstante, la producción de etileno en la postcosecha y durante la maduración puede presentar niveles muy altos. Los frutos se cosechan cuando se están maduros pero verdes y firmes, cuando se recolecta inmaduro, el fruto madurará de una forma no adecuada, caso contrario si se recolecta mucho tiempo después de la maduración, este se va descomponer rápido posterior a la cosecha (Herrera et al., 2017).

El proceso de maduración del aguacate por su climaterio implica cambios metabólicos que se inician por la producción hormonal del etileno, esto causa una alta tasa de respiración y se encarga de alterar la bioquímica y fisiología de la fruta, como se evidencia en el ablandamiento de la pulpa y cambios tanto en la coloración como en el sabor. Algunos parámetros de calidad y almacenamiento para la cosecha mencionan que se debe alcanzar un mínimo en variedad Hass de 21.5% en materia seca en la pulpa o mesocarpio, humedad relativa de entre 90 a 95%, una temperatura optima de refrigeración de 5.5°C y un rango en la tasa de respiración de 10 a 100mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹ con producción de etileno a 20 °C > 100 μL C₂H₄kg⁻¹ h⁻¹ (Yahia & Woolf, 2011; Zafar & Sidhu, 2018).

4.8. Factores de manipulación en postcosecha que afectan la calidad de la fruta

Las perdidas postcosecha en aguacate más importantes son causadas por daño mecánico donde las frutas de variedad de piel lisa son más propensas a padecer de lesiones físicas durante la manipulación y el transporte, el daño que se produce por la fricción causa oxidación del tejido hasta volverse necrótico, los cortes que se pueden producir en medio de la manipulación rompen esta protección provocando que se acelere la pérdida de agua y exponiendo el tejido al ambiente exterior, también se incluyen los trastornos fisiológicos como el daño por el frio y aceleración del metabolismo interno que puede causar el aumento en los niveles de respiración resultando el mal desarrollo de sabores y olores. La descomposición por insectos y algunos microorganismos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* quien causa la antracnosis, una de las principales enfermedades de pudrición en la postcosecha (Yahia & Woolf, 2011; Zafar & Sidhu, 2018).

4.9. Plagas y enfermedades del fruto

El aguacate tiene una alta aceptabilidad en la dieta a nivel mundial y en Colombia, al ser un fruto tan apetecido y las propiedades alimenticias que posee demandan una gran responsabilidad en la toma de decisiones de tipo fitosanitarias en el manejo de las plagas y enfermedades al ser un producto que se consume directamente como alimento fresco, por ende, la sanidad de un cultivo comercial y con finalidad de exportación como el aguacate es importante su control. Presencia de insectos o ácaros, diferentes microorganismos como bacterias, hongos o virus inciden sobre las distintas etapas de los cultivos en donde las afectaciones más evidentes son en la etapa de maduración del fruto (Bartolí & Ángel, 2008).

4.9.1. Insectos del fruto

Los insectos asociados al fruto de aguacate tienen gran importancia económica ya que afecta los rendimientos y la calidad del fruto a cosechar, adicional a esto estas plagas son vectores y transmisoras de enfermedades, no obstante, existen algunos insectos que presentes en los cultivos no representan peligro y afectación en la producción. A continuación, se presentan insectos que atacan directamente el fruto de aguacate.

4.9.1.1. Pasador del fruto de aguacate, *Stenoma catenifer* Walsingham (Lepidoptera: Stenomidae). En su estadio adulto son polillas pequeñas que poseen alas anteriores con coloración pardo amarillento que se cruzan y tienen puntos oscuros. Esta polilla deposita los huevos sobre la corteza del fruto, estos huevos son transparentes semiesféricos y pequeños. En el estadio larval son blancas que con el tiempo pasan a ser verde cenizo con franjas transversales de color rosado sobre el dorso y poseen quitinosa en los segmentos torácico y abdominal. Cuando recién eclosionan estas larvas penetran el fruto a través de la pulpa formando galerías hasta llegar a la semilla y la perforan, allí completan su desarrollo para posteriormente abandonar el fruto y transformarse en pupa (Lynce, 2015).

Este insecto generalmente se presenta cuando inicia la fructificación en los huertos llegando a provocar pérdidas de hasta el 60% de la cosecha en algunos huertos, la sintomatología que se presenta inicialmente es la detección de la presencia del insecto al identificar sus excrementos en los frutos que se eliminan a través de los orificios provocados por las larvas, de igual forma se presentan halos blancos característicos en estas zonas (Tamayo, 2008; Cardona & Urrea, 2020).

4.9.1.2. Picudo o Barrenador del aguacate, *Hielipus lauri* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Se considera como la plaga de mayor impacto económico en la exportación de *Persea americana* variedad Hass en Colombia (Zapata et al., 2018). Es un cucarrón de color negro brillante con dos bandas amarillas en su dorso que posee un pico curvado cuando es adulto, estos realizan un agujero rompiendo la corteza del fruto y parte de la pulpa en donde depositan sus huevos, en este proceso llegan hasta la semilla y la destruyen llegando a producir pudrición secundaria de la pulpa y semilla. Posterior a la oviposición al nacer las

larvas se introducen en la semilla donde estas se alimentan durante todo su estadio (Tamayo, 2008; Bernal et al., 2013; Lynce, 2015).

Este escarabajo ataca el aguacate cuando el cultivo está en producción temprana y el tiempo seco favorece su proliferación, la sintomatología se aprecia en los frutos caídos o descompuestos que aun cuelgan del árbol, aquí se puede sospechar de la presencia de la plaga. Adicional a esto las afectaciones se caracterizan por la aparición de escoriaciones en forma de media luna en el fruto, esta produce la podredumbre de la pulpa y la parcial o total de la semilla que ocasiona la caída del fruto (Tamayo, 2008).

4.9.2. Enfermedades que afectan el fruto

Al igual que las plagas tienen un mayor impacto económico, por el tipo de daño que producen en los cultivos las restricciones cuarentenarias que esto trae para la exportación.

4.9.2.1. La roña (*Sphaceloma perseae* Jenk.), es una enfermedad común en los cultivos de aguacate colombianos, es favorecida por las abundantes precipitaciones y altos niveles de humedad relativa en el ambiente. Este hongo afecta las hojas y los frutos deteriorando su calidad, la roña puede verse favorecida si hay presencia de trips que exponen más el cultivo a la entrada del patógeno. Variedades como la Hass se han visto muy afectadas y se han reportado en departamentos como Antioquia, Cundinamarca, Risaralda, Caldas y Quindío. Los síntomas en el fruto se expresan por lesiones redondas o irregulares con una coloración para o café presentando también una apariencia corchosa y erupentes, estas pueden unirse y aumentar la afectación del fruto. Cabe resaltar que la roña llega a lesionar la superficie y no llega a afectar la pulpa (Tamayo, 2008).

4.9.2.2. Mancha negra del fruto (*Cercospora purpurea* Cooke), enfermedad que en condiciones altas de precipitación y plantaciones con deficiencias nutricionales o débiles es más severa. Particularmente este hongo produce infecciones latentes y solo se manifiesta en los frutos en la etapa postcosecha llegando a causar pérdidas de hasta el 2% si se tiene un mal almacenamiento donde la lesión se puede tornar de color gris o negra que se genera por la esporulación del hongo causando la enfermedad a tal punto de deteriorar la pulpa (Tamayo, 2008; Cardona & Urrea, 2020).

4.9.2.3. Pudrición del fruto por *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer*), esta pudrición es una enfermedad que se ha detectado en su mayoría de los cultivos antioqueños. *R. stolonifer* se considera como fitopatógeno débil en la postcosecha, aun así, puede llegar a provocar pérdidas del 30% al deteriorar la calidad del aguacate bajo condiciones de mal almacenamiento, adicional a esto, se favorece el ataque del hongo en frutos que se cosechan sin pedúnculo. Los síntomas que se presentan pueden presentarse cuando hay altos niveles de humedad, donde se puede observar la aparición de un moho de color gris en el punto de inserción del pedúnculo, el hongo ocasiona una pudrición de color café que llega a invadir la

casaca y la pulpa del fruto de manera progresiva hasta cubrirlo en su totalidad (Tamayo, 2008).

4.9.2.4. Pudrición del fruto por *Dothiorella* (*Dothiorella* Sacc.), esta enfermedad se ha detectado en etapa de postcosecha al deteriorar el fruto, este hongo produce infecciones latentes y solo se manifiesta en la postcosecha. La sintomatología es muy parecida a la causada por *R. stolonifer*, a excepción que en los ataques por *Dothiorella* sp. no se presenta un crecimiento micelial sobre el fruto ni la unión del pedúnculo, aquí se observa un necrosamiento en los haces vasculares en su interior (Tamayo, 2008).

4.9.2.5. Antracnosis del fruto (*Glomerella cingulata*, anamorfo de *Colletotrichum gloeosporioides*), la antracnosis es de amplia distribución y de gran importancia económica, este hongo puede llegar afectar los árboles produciendo muerte descendente. *C. gloeosporioides* ocasiona una pudrición en los frutos de aguacate en el campo y puede perdurar hasta la postcosecha al permanecer latentes estas infecciones. A nivel nacional se ha detectado en gran amplitud del territorio, por ejemplo, en departamentos como Antioquia, Cesar, Caldas, Cundinamarca, Quindío, Tolima, Córdoba y Tolima.

El hongo inicia afectando la unión del pedúnculo cuando se empieza a formar el fruto causando lesiones de color café o pardas oscuras que pueden provocar la caída prematura del fruto, esto se promueve en condiciones de humedad relativa alta, lluvias frecuentes y por lesiones mecánicas hechas por insectos. Este fitopatógeno penetra la epidermis y puede permanecer latente hasta la maduración, en la postcosecha los síntomas se presentan como manchas de tamaño variable, de color café claro y levemente deprimidas en el centro, esta lesión puede avanzar cubriendo gran parte del fruto. Adicionalmente también causa una pudrición a nivel de la pulpa donde el hongo puede llegar a colonizar la semilla (Tamayo, 2008; Bartolí & Ángel, 2008).

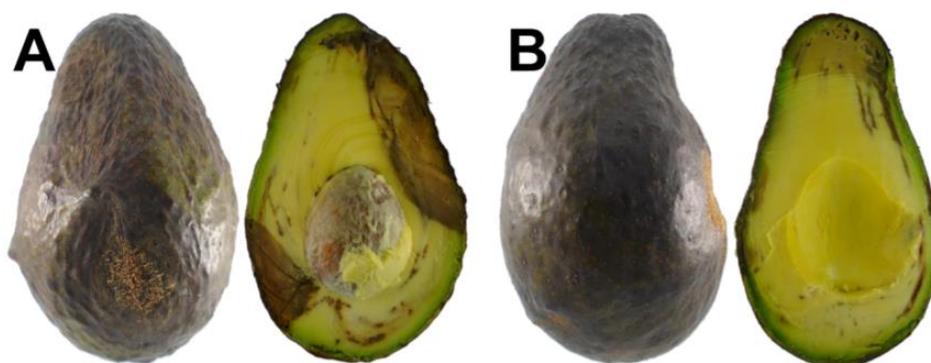
4.9.2.6. Pudrición del fruto (*Lasiodiplodia theobromae* o *Botryodiplodia theobromae*), produce secamiento descendente, pudre las raíces y retrasa el desarrollo de los árboles. Su afectación en el fruto es ocasional, cuando es el caso *L. theobromae* causa la pudrición del fruto, observándose lesiones en la inserción del pedúnculo con una coloración café que avanza gradualmente, posteriormente se puede identificar crecimiento micelial del hongo que también afecta con una pudrición interna avanzando por toda la pulpa hasta afectarlo completamente (Tamayo, 2008).

4.10. Enfermedades frecuentes en la postcosecha

La calidad y desarrollo del fruto postcosecha es de gran importancia, en base a lo anteriormente mencionado y haciendo énfasis en esta etapa posterior a la cosecha normalmente y en alta frecuencia se presentan daños de antracnosis causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* quien ataca en el momento en que el aguacate inicia el reblandamiento de su pulpa presentando manchas de color negro y oxidación en la

pulpa hasta causar una pudrición total, otro hongo presente en la postcosecha es *Lasiodiplodia theobromae* produciendo también una pudrición, pero localizada en el pedúnculo avanzando hasta cubrir la totalidad del fruto (Bartolí & Ángel, 2008) y el ablandamiento acelerado de los frutos causada por la infección de las especies *Fusarium solani* y *Fusarium sambucinum* (Yahia & Woolf, 2011; Herrera et al., 2020).

Figura 3. Frutos de Aguacate Hass. afectados con las enfermedades más frecuentes en la postcosecha.



A. Frutos con síntomas de antracnosis; y B. Pudrición peduncular ocasionado por *Colletotrichum* spp. y *Lasiodiplodia theobromae*, respectivamente (Herrera et al., 2020).

4.11. Control químico de enfermedades

En la búsqueda de mantener la calidad del aguacate durante los procesos de empaque, almacenamiento y transporte hasta el consumo en la postcosecha y teniendo en vista los niveles de pérdida en esta etapa a cargo en su mayoría por hongos patógenos, surgieron los fungicidas sintéticos con el objetivo de erradicar estos fitopatógenos del fruto a fin de encajar en las regulaciones de exportación (Everett, 2019). Algunos agroquímicos que se recomiendan en el cultivo de aguacate como fungicidas contra *L. theobromae* y *C. gloeosporioides* para controlar la antracnosis son Azoxystrobin, Azoxystrobin + fludioxonil, Piraclostrobina, Sulfato de cobre y Tiabendazol (APEAM, 2016; Herrera et al., 2020). No obstante, a nivel internacional el parlamento europeo con el reglamento 396/2005 y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO mediante el Codex alimentario establecieron los límites máximos de residuos de pesticidas (LMR), que busca prevenir que altas concentraciones de estos residuos se propaguen en altos niveles de manera que pueden llegar afectar la salud con repercusiones carcinogénicas y genotóxicas, por ende, el tratamiento que se ha llevado a cabo en los últimos tiempos por medio de agentes químicos se quiere reducir por parte de los productores, agencias reguladoras, comunidad científica y los mismos consumidores tienen gran interés en consumir estos frutos libres de

residuos químicos, por esta razón es necesario integrar sistemas alternativos para el control de plagas y enfermedades en postcosecha (Feliziani & Romanazzi, 2016; Herrera et al., 2020).

Tabla 2. Límites máximos de residuos (LMR) de fungicidas comúnmente empleados para controlar *L. theobromae* y *C. gloeosporioides*.

Fungicida	LMR
Azoxystrobin	0.7 mg/kg
Fludioxonil	1.5 mg/kg
Tiabendazol	15 mg/kg
Carbendazim	5 mg/kg

(Fuente: Codex alimentario, 2019)

4.12. Control biológico

El biocontrol de enfermedades de las plantas por medio de la aplicación de microorganismos se considera como una de las alternativas más factibles y deseables en el manejo de plagas en la agricultura, ya que de esta manera se puede establecer un control de manera adecuada y dentro de los conceptos de la agricultura sostenible (Bettiol et al., 2014). Los denominados BCA por sus siglas en inglés “Biological Control Agents”, que traducida al español son agentes de control biológico son microorganismos antagonistas que principalmente son bacterias, levaduras y hongos que actúan sobre los patógenos que causan deterioro en la postcosecha. De manera indirecta los BCA llegan a competir con los patógenos por el espacio y la disponibilidad de nutrientes, también sobre la planta pueden inducir o aumentar la resistencia contra infecciones de patógenos. En la interacción directa tienen la capacidad de parasitar o crear antibiosis con la producción de metabolitos secundarios sobre estos patógenos, los hiperparásitos invaden eliminando el micelio, esporas y estructuras en reposo de los hongos fitopatógenos y en el caso de bacterias patógenas radican su población celular. (Feliziani & Romanazzi, 2016; Köhl et al., 2019)

La acción de los microorganismos antagonistas se basa principalmente en su habilidad de colonizar rápidamente la superficie de la fruta y heridas que pueda tener esta, persistiendo allí en niveles efectivos, su capacidad de superar al patógeno en la adquisición de nutrientes y la capacidad de sobrevivir y desarrollarse bajo una amplia gama de condiciones ambientales. Por otro lado, también se considera que un agente de control biológico debe poseer unas características óptimas como ser genéticamente estable, ser efectivo en bajas concentraciones, tener exigencias mínimas en requerimientos nutricionales, tener la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, ser efectivo contra una amplia gama de microorganismos patógenos, que sea fácil de manipular, de fácil producción en medios de

cultivo de bajo costo, que sea compatible con otros procesos, no ser patogénico en su hospedero y que no produzca algún tipo de elemento como metabolitos secundarios que repercutan en el consumo humano (Bautista 2006).

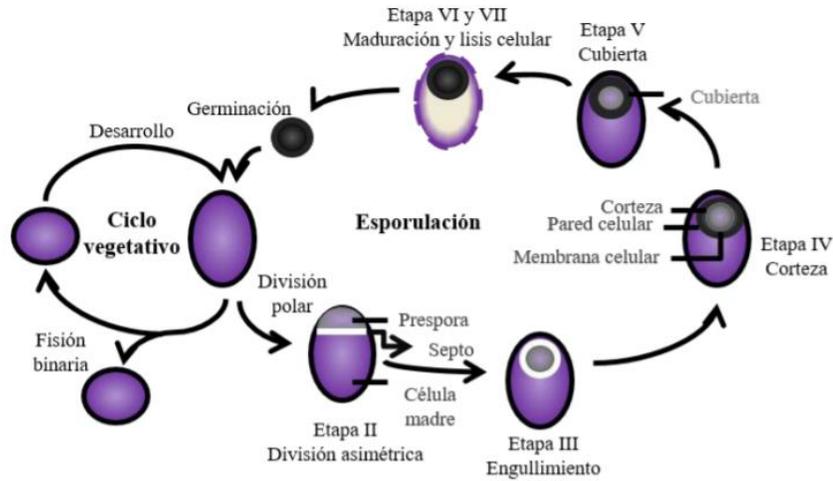
4.13 Los agentes de control biológico (BCA) en la comunidad microbiana

La eficacia de cualquier BCA depende del número de células microbianas involucradas y en la expresión de los genes involucrados en el control biológico de patógenos. La eficacia, así como la estabilidad de un BCA a lo largo del tiempo depende también de la estructura microbiana residente después de la aplicación de BCA. La colonización exitosa de un microorganismo en una comunidad microbiana depende de la disponibilidad de nutrientes, las condiciones abióticas y hospedantes y la estructura e historia microbiana residente. Es por esto, que se introducen BCA en una comunidad microbiana compleja donde una red de interacción ecológica como comensalismo, mutualismo, amensalismo, competencia y parasitismo ocurre entre microorganismos. La persistencia de BCA es fundamental para su eficacia. Existen muchos factores importantes a la hora de un buen biocontrol, como es la concentración de BCA, el tiempo de aplicación y la estructura del microbioma residente. Para mantener BCA en grandes cantidades en la comunidad de residentes se deben hacer aplicaciones repetidas o adicionar moléculas específicas para fomentar la supervivencia. Lo que se tiene muy claro hasta ahora, es que el microbioma de la planta puede tener un impacto potencial en la eficacia de los BCA, debido a las interacciones que se presentan, afectando el fenotipo del biocontrol (Razack, 2021).

4.14. El género *Bacillus* spp. como agente de control biológico

El género *Bacillus* se reportó por primera vez en el año 1872 por Cohn, lo describió como bacterias que producen endosporas resistentes al calor, estas especies de *Bacillus* pertenecen al filo Firmicutes y a la familia Bacillaceae, en el que actualmente se incluyen dentro del género más de 336 especies (Villareal et al., 2018). Estas bacterias gram positivas en forma de bastón son catalasas positivas, formadoras de endosporas y con metabolismo aerobio o anaerobio facultativo, poseen movilidad flagelar y un tamaño que varía entre 0.5 a 10 μm . El óptimo crecimiento de estas bacterias está en un pH neutro con intervalos amplios de temperatura de crecimiento, en su mayoría las bacterias de este género son mesófilas comprendiendo rangos de entre 30 a 45°C. Las endosporas que producen tienen forma oval o cilíndrica, estas se producen como mecanismo de resistencia, adicional a esto, este género logra una rápida colonización y multiplicación, con distribución en un gran número de ecosistemas y teniendo una alta capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles (Fira et al., 2018; Pedraza et al., 2020).

Figura 4. Ciclo reproductivo del género *Bacillus*.



El ciclo reproductivo del género *Bacillus* se conforma por una fase donde se genera la célula vegetativa, la cual es la forma de reproducción en condiciones favorables mediante fisión binaria y la otra fase donde se produce la formación de endosporas junto con las vegetativas, estas como estrategia de supervivencia ante condiciones limitantes o de estrés (Villareal et al., 2018).

La ecología del género *Bacillus* es muy amplia, ya que este grupo de bacterias son muy ubicuas, tienen la capacidad de habitar una gran variedad de nichos como lo son el suelo, el agua y el aire, incluyéndose también las superficies de las plantas y su rizosfera, gracias a su habilidad de formar endosporas lo cual le confiere resistencia, potencia su aislamiento en esta variedad de hábitats (Tejera et al., 2011). No obstante, el suelo es considerado el reservorio principal de este género bacteriano, ya que la mayoría de especies de *Bacillus* son saprofitas que usan una gran variedad de sustratos orgánicos presentes en estos ambientes terrestres, siendo el suelo una matriz muy compleja en el establecimiento funcional de especies microbianas y de gran diversidad genética (Villareal et al., 2018). Según Vargas et al. (2000) algunas especies de *Bacillus* tienen la capacidad de desarrollarse en el suelo en magnitudes cultivables de entre 3 a 6 unidades logarítmicas por gramo de peso fresco de suelo, aun así, son escasos los seguimientos que se le han dado a la dinámica y diversidad poblacional en entornos rizosféricos y carposfera, por ejemplo, en el suelo tienen respuesta a la fertilidad al igual que los exudados de las raíces de las plantas, por estas razones de interacción se han visto estas bacterias como capaces de asociarse de manera endófito y en procesos simbióticos con potencial inoculante microbiano (Villareal et al., 2018).

La actividad antagónica que poseen estas especies contra microorganismos fitopatógenos que atacan a los cultivos agrícolas como algunos cereales, frutas y verduras de gran importancia han sido ampliamente estudiadas en la mitigación de la incidencia de las enfermedades de relevancia agrícola, algunas de estas son *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B.*

licheniformis (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Las características más relevantes desde el nivel biotecnológico de las especies de *Bacillus* es la diversidad del metabolismo secundario que llegan a producir sustancias antagonistas, estas especies pueden evitar el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos por medio de diferentes mecanismos como la expresión de antibióticos, sideróforos, toxinas, enzimas líticas y hasta inducir de manera sistémica en la planta huésped resistencia. Algunos ejemplos son *B. subtilis* que tiene hasta el 5% de su genoma dedicado a la síntesis de metabolitos secundarios con naturaleza de compuestos antimicrobianos, otra especie asociada a las plantas es *B. amyloliquefaciens* FZB42, que tiene involucrado aproximadamente el 8% de su genoma en la producción de bacteriocinas, lipopéptidos, policétidos y sideróforos, que a la vez muestra propiedades que promueven el crecimiento vegetal (Tejera et al., 2011; Chowdhury et al., 2013; Fira et al., 2018).

Adicionalmente a las diferentes características aprovechables que tienen algunas especies del género *Bacillus* que se han mencionado, por parte de organismos como la FDA (Food and Drug Administration) tienen asignación de GRAS (Generally Recognized As Safe) como organismos seguros para la salud y el ambiente para su comercialización y uso (Olmos & Paniagua, 2014; Pedraza et al., 2020).

4.14.1. Mecanismos de acción del género *Bacillus* spp. como agente biocontrolador

Dentro de las bacterias benéficas como las especies de *Bacillus* existen varios mecanismos de acción que se aplican en el desarrollo del control biológico sobre organismos fitopatógenos, estos mecanismos están modulados por las interacciones que se establecen entre el hospedero, el fitopatógeno, el agente biocontrolador, las comunidades bacterianas establecidas o residentes y el ambiente. Con la gran habilidad que tienen estas bacterias para colonizar tejidos, se desarrollan la competición de manera muy eficiente por el espacio y nutrientes disponibles, la fuerte actividad antagónica sobre fitopatógenos por medio de la producción de compuestos antimicrobianos y la capacidad de inducir a la resistencia de la planta huésped como respuesta a ser menos susceptible a infecciones. El mecanismo con mayor relevancia en las especies de *Bacillus* para el control biológico es la antibiosis, respaldada por el conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas del género (Droby & Chalutz, 1994; Lozano, 2017).

4.14.1.1. Antibiosis

Las sustancias antimicrobianas están definidas como un grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son producidos por microorganismos, estos ejercen una actividad inhibitoria en el crecimiento y proliferación de otros microorganismos, gracias a los estudios que se han desarrollado a partir de la secuencia del genoma de diferentes especies de *Bacillus* se permitió hallar la presencia entre 4 a 8.5% de genes asociados a la síntesis de estos compuestos antimicrobianos (Raaijmakers et al., 2002; Aleti et al., 2015; Lozano, 2017), las

sustancias antimicrobianas producidas por estas especies se pueden clasificar según su naturaleza en: péptidos de síntesis ribosomal, pequeñas moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal (NRPs) y policétidos (PK) (Pedraza et al., 2020).

Dentro de esta clasificación mencionada, los péptidos sintetizados ribosomalmente se encuentran muy distribuidos en la naturaleza y son conocidos como bacteriocinas, Rea et al. (2011) los clasificó en lantibióticos de tipo A, tipo B y lantibióticos peptídicos, estos compuestos tienen la capacidad de inhibir bacterias grampositivas por formación de poros en las membranas citoplasmáticas como la Subtilina y Ericina, del mismo grupo la inhibición de biosíntesis de pared celular por parte de la Mersacidina e inhibición de bacterias gram positivas causada por Subtilosina A y Sublacina. Dentro de los compuestos no peptídicos o policétidos (PKs), se conforman los poliketidos como la Dificidina, Bacilena y Macrolactina; los fosfolípidos como la Bacilicina que posee capacidad inhibitoria contra bacterias gram positivas y hongos no filamentosos (Raaijmakers et al., 2010; Ramírez, 2010; Chowdhury et al., 2015; Lozano, 2017; Pedraza et al., 2020).

El grupo de compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* spp. con mayor estudio e importancia en su desarrollo son los péptidos que no son sintetizados ribosomalmente o mejor conocidos como lipopéptidos, moléculas bioactivas contra un rango amplio de microorganismos fitopatógenos y se clasifican en Surfactinas, Iturinas y Fengicinas (Pedraza et al., 2020). El grupo de Surfactinas son heptapéptidos con una alta capacidad biosurfactante poseen ácido graso β -hidroxi junto a entre 13 y 15 átomos de carbonos. Las Iturinas, conformadas por la Iturina A, Micobsutilina y Bacilomicina, son heptapéptidos que se unen a una cadena de ácido graso β -amino con una longitud de 14 a 17 carbonos, particularmente estos compuestos tienen arraigada una actividad contra gran variedad de hongos. Por último, las Fengicinas relacionadas a la inhibición de hongos filamentosos son decaapéptidos que se ensamblan a una cadena de ácido graso β -hidroxi con longitudes entre 14 y 18 carbonos (Moyne et al., 2001; Romero et al., 2007; Villegas-Escobar et al., 2013; Zeriuoh et al., 2014; Lozano, 2017).

4.15. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp

Las rizobacterias formadoras de endosporas y aerobias que pertenecen a *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* se conocen por su rendimiento en el biocontrol dirigido contra patógenos en plantas de cultivo. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 es una gram positiva que es aplicada a una amplia variedad de plantas hospedantes, en el control biológico es muy eficaz contra patógenos bacterianos y fúngicos (Borriss et al., 2011; Fan et al., 2011). La secuencia completa de su genoma estuvo disponible en el 2007 (Chen et al., 2007) donde se describe un genoma de 3.918 kb, revelando un gran potencial para producir metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos con más del 8.5% de su genoma dedicado a sintetizarlos por vías donde no se involucran los ribosomas (Chowdhury et al., 2015). Estudios realizados *in vitro* como los de Chen et al. (2006, 2009) y Scholz et al. (2011, 2014)

mostraron que la actividad bacteriana por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 es causada por la síntesis no ribosómica de los policétidos, bacilicina y bacteriocinas sintetizadas ribosómicamente. Mientras que Koumoutsi et al. (2004) mostraron que la gran actividad antifúngica directa se debe a la síntesis no ribosómica de lipopéptidos como las Surfactinas destacándose en este grupo la Bacilomicina D y la familia de las Fengicinas.

El etiquetado de *B. amyloliquefaciens* FZB42 con la proteína verde fluorescente GFP de la medusa *Aequoria victoria*, la cual es un valioso marcador molecular con décadas de estudio (Errampali et al., 1999). Con una copia del gen *gfp* enlazada con el promotor P_{spac} y flanqueada por las secuencias terminales amyE de FZB42 se vinculó de manera estable mediante recombinación homóloga en el cromosoma de esta bacteria promotora de crecimiento, Fan et al. (2011) diseñó de esta manera un mutante que emitía fluorescencia encontrándola como ideal para el estudio de la colonización de esta bacteria modelo en plantas bajo condiciones ambientales.

4.16. El género *Pseudomonas* spp. y sus mecanismos de acción como agente de control biológico.

El género *Pseudomonas* comprende el grupo de bacterias gramnegativas, en forma de bastón, rectas o ligeramente curvadas con flagelos polares. Habitan en ecosistemas acuáticos y el suelo, no forman esporas y la temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Requieren un pH ácido y no crecen en pH < a 4,5. Son catalasa positivas y quimioorganotróficas, con un metabolismo estrictamente aeróbico. Su clasificación taxonómica esta subdividida como Proteobacterias, α , β , y γ . Actualmente hay más de 10 géneros en Pseudomonadales en los que se incluyen *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Xanthomonas* y *Ralstonia* (Pérez, 2015; Sah, 2021).

Pseudomonas está ampliamente estudiada en cuando a la producción de metabolitos secundarios bioactivos, generando efectos positivos en las plantas, entre lo que se conocen el control biológico de enfermedades, promoción de crecimiento y la inducción de resistencia sistémica. Las especies con mayor implicación en el proceso de biocontrol incluyen a *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. syringae*. La biosíntesis de metabolitos secundarios en *Pseudomonas* está regulada por el sistema de transducción de señales de dos componentes GacS/GacA. Los componentes que están implicados en el biocontrol por las cepas de *Pseudomonas* son fenazinas, floroglucinoles, pioluteorinas, pirrolnitrinas, lipopéptidos cíclicos, cianuro de hidrógeno, enzimas líticas y compuestos volátiles orgánicos. Estos compuestos, como el caso de las fenazinas, se encargan de inhibir el crecimiento microbiano ya sea por la interrupción de la replicación del ADN, alteración en las reacciones redox y daño en la membrana. *Pseudomonas* también produce sideróforos, como la piocianina que tiene la capacidad de secuestrar Fe³⁺ en la rizosfera, lo limita la disponibilidad de este nutriente para los patógenos (Dimkic, 2022).

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño experimental

En el presente estudio se planteó un diseño completamente aleatorizado en bloques de tiempo. El cual consistió en la aplicación de tres tratamientos con la inoculación por aspersión de esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp, células bacterianas del aislamiento *Pseudomonas* sp. UA1525 y como control sin inoculación, agua destilada estéril (ADE). Con el fin de evaluar la colonización y persistencia poblacional de dos aislamientos con potencial control biológico sobre la carposfera de aguacate Hass en 5 tiempos distribuidos en 15 días, donde se dispuso de un total de 25 frutos de Aguacate Hass como unidades experimentales que incluyen dos repeticiones en el ensayo del tratamiento con *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y una sola repetición para *Pseudomonas* sp. UA1525 que tuvieron condiciones ambientales homogéneas. En el análisis estadístico, las variables a medir fueron la densidad poblacional, que en el caso de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp al ser un microorganismo esporulado se midieron células totales y esporas producidas bajo choque térmico, calculando las células vegetativas por medio de la diferencia de estas dos, mientras que para *Pseudomonas* sp. UA1525 se midió su población bacteriana, de esta manera se hizo el seguimiento a los tratamientos aplicados a través del tiempo, estas poblaciones halladas por medio de recuento en placa a partir de diluciones seriadas de una suspensión de tejidos de la carposfera.

5.2. Cepas y material vegetal

Los experimentos se realizaron por medio de inóculos, suspensiones de esporas de aislamientos de la cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y suspensiones bacterianas de la cepa nativa UA1525, ambas pertenecientes a la colección de cepas del grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental BA&A de la Universidad de Antioquia, en el caso de *B. amyloliquefaciens* FZB42 con la etiqueta gfp fue proporcionada a la colección por medio del Dr. Rainner Borris (Humboldt - Universität zu Berlin, ABiTEP GmbH) (Fan et al., 2011) y el aislado UA1525 se originó de estudios desarrollados en un proyecto en el marco de regalías por parte del grupo de investigación en el 2017 con título “Desarrollo y oferta de materiales certificados de aguacate para Antioquia con calidad genética, fisiológica y sanitaria”, por medio de secuenciación de próxima generación (NGS) buscaron determinar grupos bacterianos en la rizosfera de plantaciones con diferentes niveles de fertilidad de Aguacate Hass provenientes del Oriente y Norte antioqueño, a partir de aquí se obtuvieron aislamientos de grupos bacterianos reportados con potencial biotecnológico y control biológico de fitopatógenos, entre estos grupos se hallaron *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

A ambos aislamientos se les realizó una previa verificación de su morfología macro en medio de cultivo TSA y microscópica bajo tinción de gram, así como concentración y pureza

mediante conteo en placa con un posterior ajuste de la concentración a 1×10^8 esporas/mL y 1×10^8 bacterias/mL para *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y UA1525 respectivamente. Los frutos de Aguacate Hass (*Persea americana* Mill.) fueron adquiridos de cultivos situados en los departamentos de Antioquia y Quindío, donde estos presentaron fisiología normal y saludable, sin ningún rasgo de enfermedad ni herida, así mismo no fueron tratados previamente con algún tipo de fungicida protectante.

5.3. Evaluación del marcador de selección en la cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp.

Teniendo en cuenta que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp posee dos marcadores de selección de antibiótico, Eritromicina y Lincomicina (Fan et al., 2011), se realizó siembra por agotamiento en medio de cultivo tripticasa de soja agar (TSA) con adición de Eritromicina a concentración de $1 \mu\text{g/mL}$. Paralelamente se realizaron siembras por agotamiento con la cepa silvestre de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 con el objetivo de contrastar y evidenciar la posesión del casete del marcador de selección de la cepa modelo usada, de esta manera se identificó con mayor facilidad el crecimiento único del microorganismo inoculado inicialmente en los recuentos posteriores en medio de cultivo con adición de antibiótico.

5.4. Confirmación de la identificación a nivel molecular del aislamiento UA1525

A partir de los resultados de los estudios desarrollados previamente por parte del grupo de investigación en BA&A de la Universidad de Antioquia referente al aislamiento UA1525, se procedió a realizar su identificación a nivel molecular bajo la especulación de ser parte del grupo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes y así llegar de manera más concisa a su especie.

5.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN del aislamiento UA1525 se llevó a cabo empleando el kit DNeasy® blood and tissue kit de QIAGEN® siguiendo las indicaciones del fabricante para la purificación de ADN de bacterias gram negativas. Se recolectó colonias bacterianas en medio TSA en un microtubo centrifugando durante 10 minutos a 7500 rpm en la centrifuga universal de alta capacidad y refrigerada Labnet Hermler Z400 K. Seguidamente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en $180 \mu\text{L}$ de tampón ATL. Siguiendo el protocolo de "SpinColumn", para aplicar la lisis, esta suspensión se adicionó $20 \mu\text{L}$ de Proteinasa K mezclando mediante vórtex y llevando a incubar a 56°C por 2 horas con agitaciones intermitentes de vórtex cada 30 minutos para dispersar la muestra. Seguidamente se adicionaron $200 \mu\text{L}$ de Buffer AL y otros $200 \mu\text{L}$ de Etanol a la muestra con una agitación por vórtex intermedia en las adiciones. Posterior a esto, se transfirió la muestra en la columna de centrifugación DNeasy Mini posicionada en un tubo de recolección de 2 ml, llevándose a

centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto desechando el tubo colector. La columna de centrifugación se introdujo en un nuevo tubo de recolección y se adicionó 500µL de Buffer AW1 llevándose a centrifugación durante 1 minuto a 8000 rpm descartando en este paso también el tubo de recogida. Se colocó la columna nuevamente en otro tubo de recolección y se adicionó 500µL de Buffer AW2 seguido de una centrifugación a 14000 rpm por 3 minutos y se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga para pipetear 100µL de tampón AE directamente sobre la membrana, esto se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto repitiéndose este paso nuevamente.

5.4.2. Amplificación de la región del ADNr 16S por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa.

El ADN extraído fue usado como molde para amplificar mediante PCR el gen 16S ribosomal con los primers universales 8F (5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´) y 1492R (5´GGTTACCTTGTTACGACTT3´) (Turner et al., 1999). La mezcla de reacción de PCR se preparó con 1µL de ADN producto de la extracción, 0.25µL de Taq ADN polimerasa recombinante GoTaq® G2 Flexi (Promega), 5µL del Buffer 5X Colorless GoTaq® Flexi (Promega), 1.5 µL de solución de MgCl₂ 25 mM (Promega), 2.5µL de dNTPs y 0.27µL de cada uno de los primers, en 25µL de volumen final.

Las condiciones de reacción en el termociclador (Bio-Rad modelo T100™) tuvo un ciclo de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguidos de 31 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a 57°C por 45 segundos y un ciclo de 70°C por 2 min y al final, un ciclo de extensión por 8 min. A partir del producto de PCR se tomó un volumen de 3 µL para analizarlo mediante electroforesis, usando un buffer de carga Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega) y un marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™) en gel de agarosa de 1% (p/v) usando buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X suplementado con 3µL de bromuro de etidio (10mg/mL). Finalmente, la visualización de las bandas se realizó sobre un transiluminador con luz UV (Labnet Enduro™ GDS) donde el tamaño del amplicón esperado fue de 1484pb.

5.4.3. Secuenciación e identificación

El producto de PCR del aislamiento fue secuenciado en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur Website: www.macrogen.com) por medio del método Sanger. La secuencia nucleotídica obtenida por los primers 8F (5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´) y 1492R (5´GGTTACCTTGTTACGACTT3´) (Turner et al., 1999) fue tratada manualmente con el software BioEdit (Hall, 1999), la secuencia del gen ARNr 16S en cuestión fue analizada bioinformáticamente por alineamiento local básico, mediante la herramienta BLAST usando megablast (algoritmo de secuencias muy similares) contrastándose con las bases de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (www.ncbi.nlm.nih.gov), Proyecto de base de datos ribosomal RPD (rdp.cme.msu.edu/html/) y del laboratorio europeo de biología molecular EMBL-EBI.

5.5. Comportamiento poblacional de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.

La metodología para la evaluación del comportamiento poblacional en *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp se basó en el protocolo estipulado por Lozano (2017) con algunas modificaciones.

Frutos de aguacate Hass que fueron recibidos sin algún síntoma de afección microbiana o mecánica fueron desinfectados en su superficie con lavados mediante inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1% y abundante agua destilada estéril seguido de un secado con servilletas estériles. Posteriormente los frutos de aguacate Hass fueron asperjados con 12 mL de una solución de esporas a una concentración de 1×10^8 esporas/mL en el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* BZB42gfp y esta misma concentración de bacterias/mL del aislado *Pseudomonas* sp. UA1525, como control sin inóculo también se asperjaron frutos con 12 mL de agua destilada estéril. Luego de asperjados y secados los frutos se depositaron de manera aleatoria en canastas de embalaje y en los días 1, 3, 5, 8 y 15 posterior a la inoculación. Tomando un fruto por cada tratamiento, se estimó las poblaciones bacterianas totales, esporuladas y vegetativas. A partir de los frutos se tomaron cuatro porciones de tejidos de aproximadamente 1 cm^2 en los cuatro puntos cardinales del fruto usando una cuchilla estéril, estos tejidos se introdujeron en bolsas de polipropileno estériles contenidas de 5 mL de agua destilada estéril y se maceraron de forma mecánica durante 2 minutos para su homogenizado. Previo a la estimación de los recuentos en placa se recolectó de la muestra macerada una alícuota de 2 mL para someterla a ultrasonido o sonicación con ayuda del sonicador Elmasonic Easy a 35°C durante 5 minutos con el fin de agitar y separar las partículas celulares. Posterior a esto y para la estimación de bacterias totales (esporas y vegetativas) de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp, a las muestras homogenizadas se realizaron diluciones seriadas (1:10) y una alícuota de 100 μL de las tres últimas diluciones fueron plateadas en medio de cultivo TSA con adición de Eritromicina (TSAeri) $1 \mu\text{g/mL}$. La proporción de células esporuladas se obtuvo mediante tratamiento de choque térmico usando un minitermostato de baño seco digital AccuBlock™ a 80°C por 15 minutos de los tubos que contenían las diluciones seriadas, al igual que las alícuotas de bacterias totales, estas se platearon 100 μL en TSA Eritromicina $1 \mu\text{g/mL}$. Las cajas de Petri fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y los conteos se hicieron basados en las morfologías típicas de las colonias de interés, teniendo en cuenta las estimaciones temporales para cada aislado. De la misma manera se realizó el tratamiento para la bacteria *Pseudomonas* sp. UA1525 a excepción de que solo se hizo el proceso de sonicación sin choque térmico y el plateado se realizó en medio de cultivo Agar B de King (BK) que permite la producción de fluoresceína o pioverdina, que es fluorescente bajo luz ultravioleta en algunas cepas de *Pseudomonas*. El plateado del control se realizó en ambos medios de cultivo mencionados anteriormente, TSAeri y BK para tener en cuenta un control para ambos microorganismos.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 3. Cronograma de actividades realizadas durante la estancia en el grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental BA&A de la Universidad de Antioquia.

ACTIVIDAD	AGO				SEP				OCT				NOV				DIC		
	Semana				Semana				Semana				Semana				Semana		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	
Diagnostico fitopatológico por taxonomía microscópica de muestras radiculares, foliares y de tallo de aguacate Hass.	X	X	X																
Identificación molecular de aislados bacterianos de la colección BA&A.		X	X	X															
Diagnostico fitopatológico y estimación de proporción de afectación fitopatológica en muestras radiculares de aguacate Hass.			X	X	X														
Revisión bibliográfica de la aplicación de bacterias ACC desaminasa como PGPR en variedades de Crisantemo (<i>Chrysanthemum</i>) como proyecto inicial.	X	X	X	X	X	X													
Recuento bacteriano total y de esporas con aislamiento de bacterias en un producto bioformulado.					X	X	X												
Identificación molecular de aislados bacterianos a partir de un producto bioformulado.							X	X											
Diagnostico fitopatológico por taxonomía microscópica de esquejes ornamentales (i.e. <i>Aster</i> , <i>Craspedia</i> , <i>Gypsophila</i> y <i>Verónica</i>)							X	X	X										
Identificación molecular de aislados bacterianos pertenecientes al género <i>Bacillus</i> .								X	X	X									
Preparación de material, inóculos y seguimiento a recuentos microbianos INBACTER.					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Revisión bibliográfica del proyecto de evaluación dinámica poblacional de dos bacterias en Aguacate Hass (<i>Persea americana</i> Mill.)							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Planteamiento del diseño experimental del proyecto de evaluación dinámica poblacional de dos bacterias en Aguacate Hass (<i>Persea americana</i> Mill.)								X	X										
Acondicionamiento de las cepas <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp y UA1525 usadas en el trabajo de grado.								X	X			X	X						
Identificación molecular del aislamiento UA1525 usada en el trabajo de grado.												X	X	X					
Recepción de frutos de Aguacate Hass usados en el trabajo de grado.									X				X						
Preparación del material requerido para el desarrollo del trabajo de grado.									X	X	X	X	X	X	X	X			
Aplicación de los tratamientos bacterianos en los frutos de aguacate Hass como unidades experimentales.											X				X				

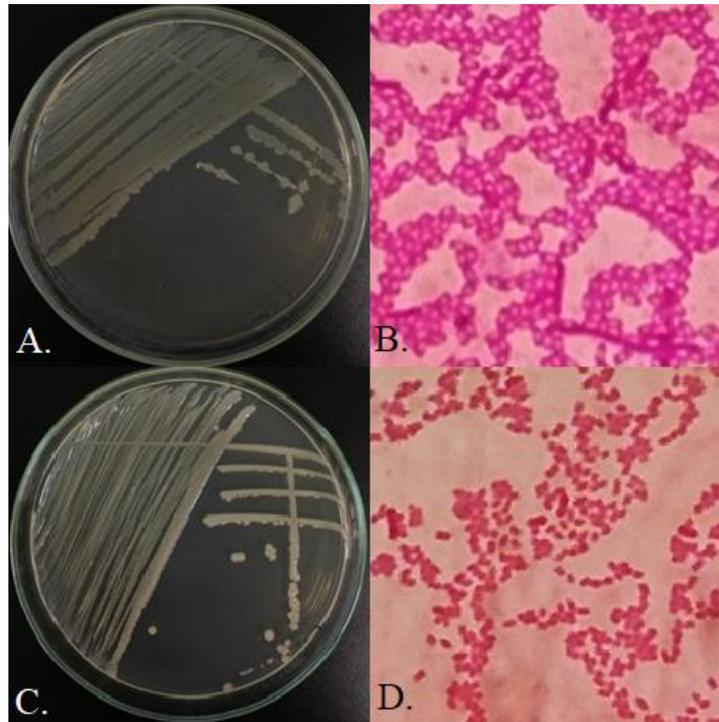
Estimación de recuentos bacterianos sobre la carposfera de aguacate Hass usados en el trabajo de grado.												X	X	X		X	X	X	
Análisis y redacción del trabajo de grado.								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Entrega de avances del escrito del trabajo de grado.															X			X	
Diagnostico fitopatológico por taxonomía microscópica de muestras foliares y de tallo de Hortensia (<i>Hydrangea</i>).													X	X	X				
Identificación molecular de aislados bacterianos de la colección BA&A incluyendo la cepa UA1525 usada en el trabajo de grado.															X	X			
Diagnostico fitopatológico por taxonomía microscópica de muestras radiculares y de tallo de Hortensia (<i>Hydrangea</i>).															X	X	X		
Identificación molecular de aislados bacterianos de muestras foliares y de tallo de Hortensia (<i>Hydrangea</i>) y de la colección BA&A.																X	X		
Diagnostico fitopatológico por taxonomía microscópica de muestras vegetales.																	X	X	
Aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno y que solubilizadores de fosforo a partir de productos bioformulados.																	X	X	
Apoyo en capacitación de producción vegetal La Estrella.																	X		

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Descripción y acondicionamiento de aislamientos bacterianos

Los aislamientos PGPR seleccionados de la colección del grupo de investigación en Bacteriología Agrícola y Ambiental BA&A de la Universidad de Antioquia, por su potencial de control biológico pertenecientes a *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525 se replicaron a partir de su conservado bajo congelación en medio de cultivo TSA. Posterior a su incubación se inspeccionó la morfología macro y microscópica (Figura 5) de cada uno de los aislados, de esta manera, se corroboró en primera instancia la estabilidad y correspondencia de los aislamientos a partir de los crioviales conservados a -80°C.

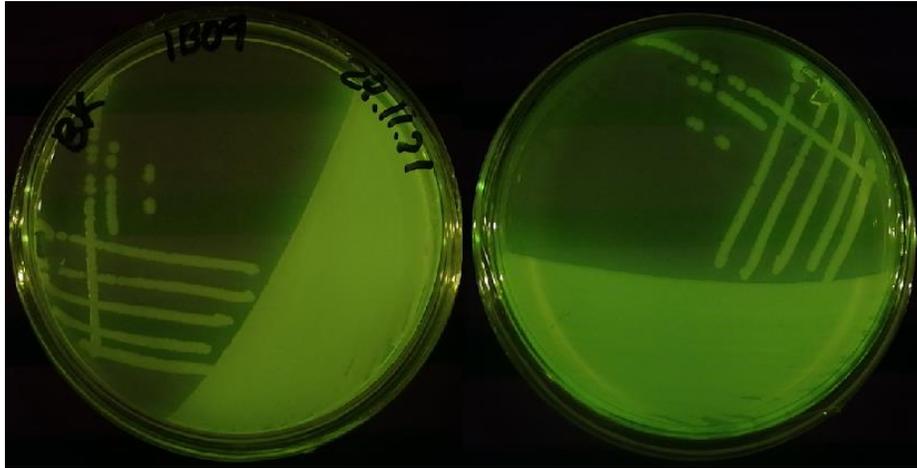
Figura 5. Vista morfológica de la macro y microscopía en ampliación total de 1000x de los aislamientos usados en los ensayos del estudio.



A y B. Morfología macroscópica y microscópica con una ampliación total de 1000x de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp; y C y D. Morfología macroscópica y microscópica con una ampliación total 1000x del aislado *Pseudomonas* sp. UA1525. Para este análisis fueron cultivados en medio de cultivo TSA (Fuente: Autor).

Tras aplicar tinción de gram para cada uno de los aislamientos se obtuvo tanto morfología macroscópica como microscópica típica para cada uno de estos géneros bacterianos. En el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp se observó bacilos gram positivos con formación de esporas internas (Figura 5; B), estas endosporas les confieren a las especies de *Bacillus* la capacidad de resistencia a condiciones adversas, así mismo, la diseminación y prevalencia en los ecosistemas (Villareal et al., 2018). Por otro lado, en el aislado UA1525 se identificaron bacilos gram negativos en forma de bastón corto (Figura 5; D). A raíz de que el aislamiento nativo codificado como UA1525 tuvo procedencia de la rizosfera de aguacate Hass y determinado como parte del grupo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes gracias al estudio de secuenciación de próxima generación (NGS) hecho previamente por el grupo de investigación BA&A, se verificó en primera medida mediante siembra en medio de cultivo diferencial para *Pseudomonas* spp. King B agar (KB) (King et al., 1954) con el objetivo de acercarse al posible grupo bacteriano perteneciente.

Figura 6. Vista macroscópica del aislamiento nativo *Pseudomonas* sp. UA1525 en medio de cultivo KB bajo irradiación UV en el transiluminador (Labnet Enduro™ GDS).



(Fuente: Autor)

A través del medio de cultivo KB se permitió la detección de la síntesis de pioverdina o también conocida como fluoresceína, pigmento producido por algunas especies de *Pseudomonas* gracias a la presencia de sulfato de magnesio aportando cationes necesarios para la activación de esta pioverdina produciendo una coloración amarilla-verdosa fluorescente en el medio de cultivo (King et al., 1954). De esta forma, se podría dar con el indicio de que probablemente si se trata de una especie de *Pseudomonas* spp. fluorescente como se estableció en el estudio hecho por el grupo de investigación en el 2017. Teniendo en cuenta que para llegar a una identificación de género y especie más exacta se requiere de métodos moleculares como la comparación de secuencias a partir del ARN ribosomal 16S, a las especies que producen pigmentos fluorescentes son denominadas “*Pseudomonas* fluorescentes” (Álvarez et al., 2016)

7.2. Evaluación del marcador de selección en la cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp.

Por otro lado, con el fin de mostrar la estabilidad de la cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp poseedora del marcador de selección a antibióticos como Eritromicina (Fan et al., 2011) y su cultivo en medio de cultivo TSA con adición de este antibiótico a concentración de 1µg/mL en los posteriores ensayos, se contrastó con la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 silvestre que no posee este marcador de selección, la cepa diseñada y etiquetada con gfp y poseedora del gen del marcador de selección a tolerancia a antibióticos, entre los que se encuentra Eritromicina creció sobre el medio de cultivo a diferencia de la cepa wilt type de *B. amyloliquefaciens* FZB42, siendo inhibido su

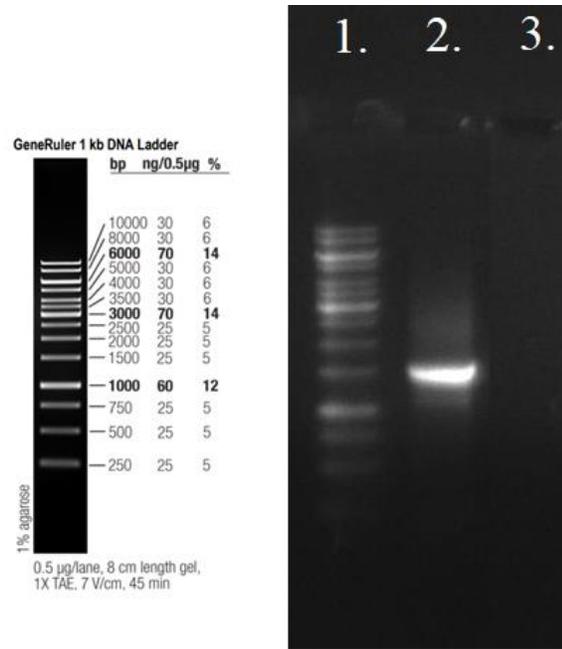
crecimiento en el medio de cultivo contenido de antibiótico. De esta manera también se aseguró que posterior a la inoculación, se estuvo haciendo el recuento de esta cepa en los experimentos del seguimiento al crecimiento poblacional sobre la carposfera del fruto por parte de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp.

7.3. Confirmación de la identificación del aislamiento UA1525

Como fue mencionado anteriormente, este aislado codificado como UA1525 se clasificó en el grupo de las *Pseudomonas* spp. fluorescentes por medio del secuenciamiento de próxima generación (NGS), gracias a esto, el grupo de investigación en el 2017 pudo determinar los grupos bacterianos, incluyéndose aquellos que no son cultivables en el laboratorio presentes en las rizosferas de aguacate Hass muestreadas en ese entonces y originarias del territorio antioqueño, esto, en busca de caracterizar la diversidad de dos grupos asociados al microbioma de sistemas productivos agrícolas como las bacterias aerobias formadoras de endospora BAFE y las *Pseudomonas* spp. Fluorescentes, que tienen implicaciones importantes no solo desde el punto de vista biológico, sino también biotecnológico, dado que el potencial agrícola e industrial podría estar influenciado por su ecología y diversidad. En el estudio previo, las comunidades totales de bacterias fueron caracterizadas por medio de (NGS), un método que permite determinar todos los grupos bacterianos presentes y no solo aquellos cultivables en laboratorio. Estos análisis originados de plantaciones de Aguacate Hass con diferentes niveles de fertilidad revelaron una alta diversidad de bacterias rizosféricas, con más de 20 phyla, 70 órdenes, 130 familias y 170 géneros bacterianos, muchos de ellos de reconocida importancia en la ecología del suelo. Dentro de cada una de las comunidades totales de las plantaciones muestreadas, en el 2017 se evaluó el porcentaje de las bacterias benéficas en estudio (BAFE y *Pseudomonas* spp. fluorescentes), las cuales poseen un alto potencial biotecnológico.

A partir de estos aislamientos obtenidos y almacenados en la colección de cepas del grupo BA&A y ya que no se tenía con precisión la identificación de algunas de las especie ubicadas en el grupo de *Pseudomonas* sp. fluorescentes, se quiso confirmar a nivel molecular mediante amplificación de la región del ADN_r 16S por reacción en cadena de la polimerasa PCR, este polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* presenta un alto grado de conservación y proporciona el suficiente polimorfismo interespecífico para ayudar a diferenciar e identificar el aislamiento en cuestión (Bou et al., 2011). Los amplicones sometidos a electroforesis (Figura 7) presentaron un patrón de bandeo cercano a las 1500 pb en referencia con el marcador de peso molecular y donde también se tuvo en cuenta la corrida electroforética de un control de reacción el cual demostró no tener alguna interferencia en esta misma.

Figura 7. Patrón de bandeos de amplicones del aislamiento UA1525 en gel de agarosa 1%.



Los pozos para la corrida electroforética en gel de agarosa 1% se distribuyeron de la siguiente manera: 1. Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™); 2. Producto de PCR del aislamiento UA1525; y 3. Control de reacción de PCR (Fuente: Autor).

Posterior a esta amplificación, el producto de PCR se envió a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur Website: www.macrogen.com) para su secuenciación a través del método Sanger, donde se trató bioinformáticamente la secuencia recibida y al ser tratada manualmente mediante el software BioEdit (Hall, 1999) se obtuvo la secuencia consenso:

“>UA1525

TACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGC
CTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGTCTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCT
GTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
AGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAG
TTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTA
CGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAT

Al ser analizada por alineamiento local básico, mediante el algoritmo de secuencias muy similares megablast de la herramienta BLAST fue contrastada en primera instancia con

GenBank del NCBI, adicional a esto, también se usó la base de datos curada RDP (rdp.cme.msu.edu/html/) la cual es una de las principales bases de datos de secuencias de ADNr, no sólo 16S, sino también 23S de procariontas y la base de datos del laboratorio europeo de biología molecular EMBL-EBI (www.embl.org/).

Tabla 4. Identificación del aislamiento UA1525 asociado a la rizosfera de aguacate Hass a partir de análisis en las bases de datos GenBank de la NCBI, RDP y EMBL-EBI.

Aislamiento	Longitud de la secuencia	Bases de datos			Conclusión
		NCBI	RDP	EMBL-EBI	
UA1525	644 pb	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Género: <i>Pseudomonas</i>

Análisis de la secuencia obtenida a partir de la amplificación de la región ARNr 16S del aislamiento UA1525, tratada manualmente con el software BioEdit (Hall, 1999) contrastada en la base de datos GenBank de la NCBI por alineamiento local básico mediante la herramienta BLAST (algoritmo megablast), al igual que la base de datos curada RDP y EMBL-EBI con una longitud de consulta de 644pb (Fuente: Autor).

La secuencia del aislamiento UA1525 tuvo resultados dentro del análisis taxonómico a través del contraste con la base de datos GenBank de la NCBI que indicaron que posee un 100% de identidad en el 100% de su longitud con secuencias parciales del gen 16S de ARN ribosómico pertenecientes a las especies del género *Pseudomonas* como *P. monteilii*, *P. putida* y *P. viridiflava*. Este mismo análisis al aplicarse en la base de datos EMBL-EBI también indicó la similitud del 100% en el 100% de la secuencia con el gen 16S de ARN ribosómico de especies del género *Pseudomonas*, *P. putida*, *P. monteilii* y *P. aeruginosa*. Por otro lado, al realizar el análisis a esta secuencia del aislamiento UA1525 en la base de datos curada RDP indicó que su ubicación taxonómica pertenece al género *Pseudomonas* y encontrándose una puntuación máxima de seqmatch con especies como *P. plecoglossicida* y *P. monteilii*.

A pesar de que los resultados de los diferentes análisis taxonómicos concluyeron que el aislamiento UA1525 pertenece al género *Pseudomonas*, no alcanzan a discernir con mayor confianza entre la posible especie de este, ya que existe estrecha semejanza en los porcentajes de identidad y de cobertura, lo que lleva a una identificación fallida más allá del género, en referencia a los resultados anteriormente registrados por medio de NGS con la asignación de

este aislamiento dentro del grupo de las *Pseudomonas* spp. fluorescentes. En este punto, se puede llegar a dudar sobre el poder resolutivo que tiene el análisis del gen 16S de ARN ribosomal en especies del género *Pseudomonas*, algunos autores como Pon Antona (2016) en su estudio de caracterización taxonómica de nuevas cepas del género *Pseudomonas*, indicó que la secuenciación del gen ARNr 16S usado para la identificación de especies del género *Pseudomonas* no es suficientemente discriminatorio para que llegue a tener alta resolución debido a que este presenta muy pocos polimorfismos entre especies de este género y el ritmo evolutivo es lento. Sin embargo, otros genes “housekeeping” como los genes *gyrB* y *rpoD*, que sintetizan la girasa B y la subunidad D de la RNA polimerasa, respectivamente lo que llega a permitir un mayor nivel de resolución en la identificación de especies dentro del género *Pseudomonas*. Estos genes poseen un ritmo de evolución más rápido y un poder más discriminatorio que los que posee el gen ARNr 16S (Yamamoto et al., 2000; Mulet et al., 2010; Scotta et al., 2012). Por lo que se debe realizar un análisis taxonómico del aislamiento en cuestión teniendo en cuenta otros genes más resolutivos, donde estudios como el de Matthijs et al. (2013) evidenció que el análisis en genes como *oprI* y *oprL*, que codifican la lipoproteína I de la membrana externa y la lipoproteína asociada a peptidoglicano OprL, respectivamente, pueden llegar a ser igual de confiables como la clasificación basada en secuencias de genes ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* de Mulet et al. en 2010 empleados en la identificación taxonómica de especies del género *Pseudomonas*.

En ese orden de ideas y teniendo en cuenta que los anteriores resultados no pudieron definir una especie concisa para el aislamiento UA1525 dada la semejanza en los porcentajes de identidad y cobertura, llevan a que en este caso solo se pueda afirmar que el aislamiento UA1525 pertenece al género *Pseudomonas*, las especies del género *Pseudomonas* son bacilos móviles gram negativos, sin producción de spora y que algunas llegan a producir pigmentos fluorescentes como se evidenció anteriormente bajo radiación UV en medio BK (Elomari et al., 1997; Anzai et al., 2000; Lalucat et al., 2020). Estas especies desde el punto de vista del control biológico constituyen una combinación de diferentes mecanismos que ejercen esta actividad antagonista, en estos se incluyen la supresión directa frente a una variedad de patógenos como hongos, bacterias y nematodos que afectan los cultivos de gran importancia económica y a su vez induce la resistencia de la planta (Pérez et al., 2015), la capacidad que tiene este género de bacterias para producir compuestos antimicrobianos, polisacáridos y sideróforos es de vital importancia en el biocontrol, *Pseudomonas* spp. en los últimos años ha sido muy conocido y estudiado por su potencial inhibiendo a fitopatógenos y sus enfermedades (Santoyo et al., 2012). Estudios en el grupo de *Pseudomonas putida* al cual pertenece *P. monteilii* realizados por Sun et al. en el 2017 con la cepa *P. putida* A1 en plantas de tomate mostró la capacidad de formar biopelículas *in vitro* y así mismo el desarrollo de la actividad antimicrobiana contra algunas bacterias fitopatógenas como *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. o.* pv. *oryzicola* y *X. citri* subsp. *citri* en donde se redujo el grado de afectación por estos patógenos. Por otro lado, en el mismo año 2017 Sandhya et al. analizaron en un ambiente de estrés por sequía en maíz los rasgos de promoción de crecimiento y la actividad antifúngica de 39 aislamientos, donde de las 10

cepas con potencial PGPR se identificó a *P. monteilii* quien demostró el manejo de enfermedades y su promoción al crecimiento de la planta bajo estrés.

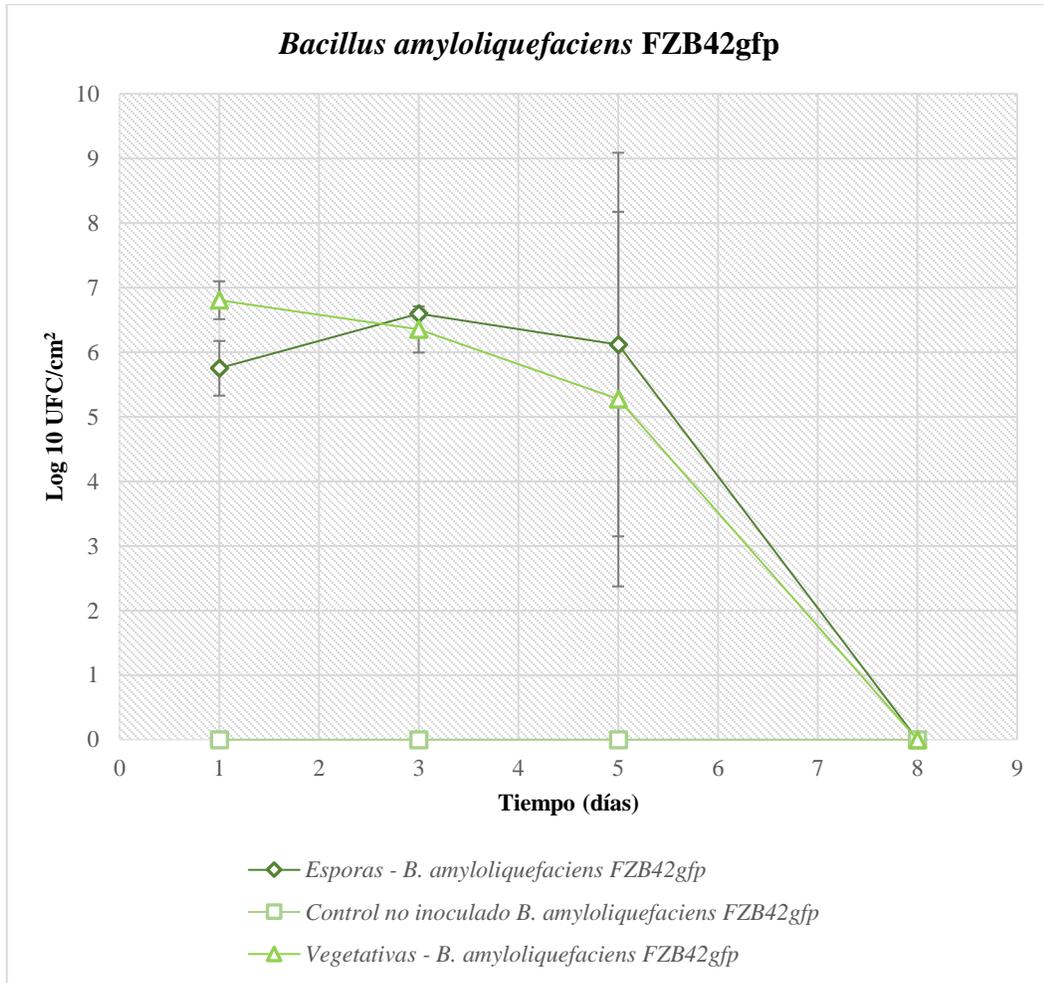
Haciendo referencia más específica al marco en el que se ha desarrollado este estudio, el cual se quiso evaluar microorganismos que protejan el fruto de aguacate Hass de sus típicos agentes patógenos en la etapa postcosecha como el causante de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*, la cepa *Pseudomonas monteilii* se vio referenciada en el estudio, el cual se basó en la evaluación de la capacidad PGPR de aislamientos de gran variedad de especies de *Pseudomonas* a partir de la rizosfera de café (*Coffea arabica* L.) para hacerle frente a hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, aquí uno de los aislados fue identificado a través de la secuencia del ADNr 16S como *Pseudomonas monteilii* que presentó inhibición máxima mediante antagonismo directo de estos dos patógenos mencionados con porcentajes de 70 y 72% respectivamente, adicional a esto, esta cepa también logró evidenciar la producción de fitohormonas como el Acido indolacético (IAA) y Acido giberélico o también conocida como Giberelina (GA3), al igual que producción de sideróforos y enzimas líticas (Kejela et al., 2017)

7.4. Comportamiento poblacional de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.

En la disposición de los frutos de aguacate Hass inoculados por aspersión y su posterior evaluación de la densidad poblacional a través del tiempo de los tratamientos microbianos aplicados fue medido mediante recuentos en placa en medios de cultivo específicos como lo fueron TSAeri y KB de manera estratégica, *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp al poseer un marcador de selección de tolerancia a Eritromicina tuvo la capacidad de crecer en el medio TSAeri donde se inhibió la microbiota acompañante que en este estudio no fue de interés al momento de realizar los recuentos (ver anexo 3 y 4). Para contrastar e identificar las colonias correspondientes a *Pseudomonas* sp. UA1525 se realizaron recuentos en medio KB que fueron expuestos a radiación UV para observar las colonias que transmitieron fluorescencia con ayuda del transiluminador (ver anexo 5), de esta manera se aseguró que en los diferentes tiempos en los que se hizo el ensayo se contó el microorganismo inoculado inicialmente desde el tiempo 0.

La evaluación de la densidad poblacional a través del tiempo de las dos bacterias analizadas se expresó en UFC/cm², esto, partiendo de la idea que los recuentos que se realizaron representaron lo contenido en los 5mL de suspensión entre los 4 tejidos que se tomaron y fueron suspendidos, asumiendo así, que todas las células estuvieron en la superficie, estimando el número de colonias en cada área de 1 cm² de aguacate Hass inspeccionada, incluyendo de esta misma manera los respectivos controles no inoculados (ver anexos 6, 7 y 8).

Figura 8. Densidad poblacional de células vegetativas y esporas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.



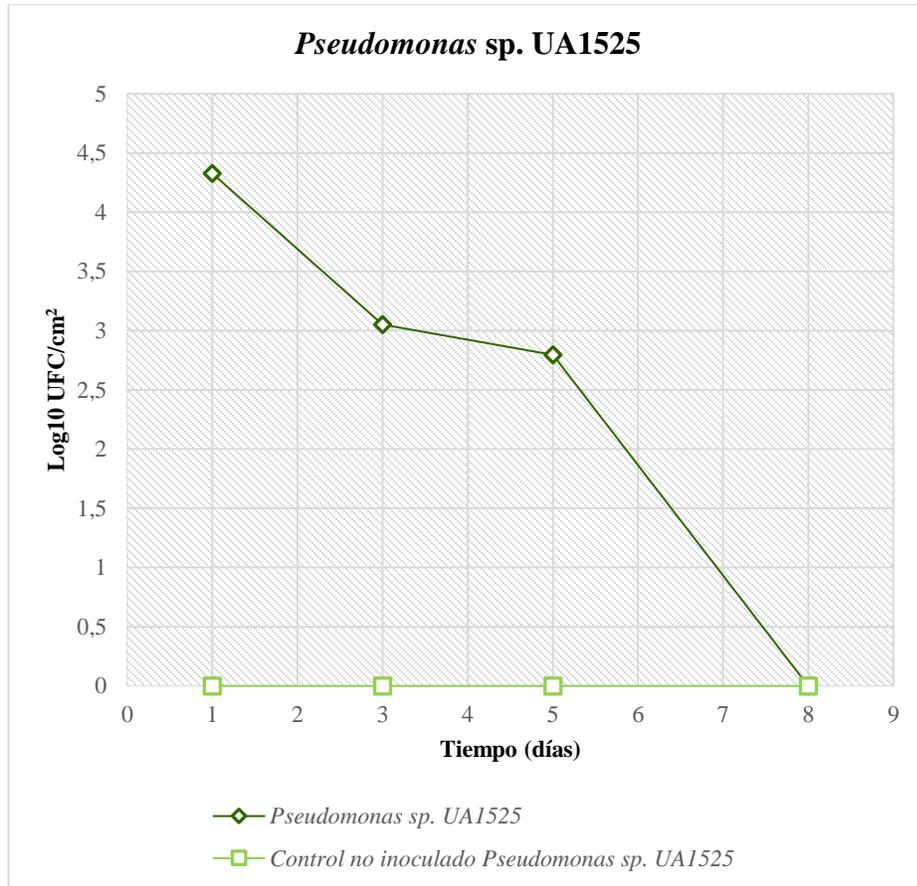
Comportamiento poblacional de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp sobre la carposfera de aguacate Hass. Cada uno de los frutos fue asperjado con una solución de esporas ajustada a una concentración de 10^8 esporas/mL. En cada tiempo un fruto fue procesado tomando 4 fracciones de tejido de 1 cm^2 , estos tejidos en conjunto se suspendieron en agua destilada estéril. La concentración de células vegetativas y esporas (choque térmico) se estimó a partir de diluciones seriadas y conteos en placas de TSAeri, la proporción de células vegetativas se calculó a partir de la sustracción entre el recuento de las células totales y esporas. Los puntos correspondientes en la gráfica hacen referencia al promedio de las UFC/cm² del total de dos frutos en los dos experimentos en donde también se muestran las desviaciones estándar producto de las repeticiones realizadas cada tiempo de análisis que expresaron la densidad poblacional de células vegetativas y esporas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp (Fuente: Autor).

El tratamiento aplicado con esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp se midió a partir de los recuentos obtenidos cada uno de los días establecidos, como se vio evidenciado en la figura 8, desde el primer día postinoculación la población se redujo hasta en dos

unidades logarítmicas referente a las células vegetativas y tres unidades logarítmicas en la población de esporas con referencia a la concentración inoculada inicialmente, en el lapso de tiempo entre los días 1 y 3 de análisis se alcanzó el máximo de células metabólicamente activas, donde la concentración de esporas producidas empezó a mostrar su tendencia en alza hasta alcanzar su índice máximo en el día 3, mientras que las células vegetativas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp ya marcaban una tendencia de disminución desde el día 1 en la estimación de la población manteniendo esta constante en descenso hasta no ser detectada en el día 8. Particularmente posterior al día 3 las esporas fueron disminuyendo en su concentración hasta perder su detección de igual forma que las vegetativas en el día 8, por lo que no fue necesario seguir la experimentación hasta el día 15.

El comportamiento fluctuante que mostró tanto las células vegetativas como las esporas evidencian la naturaleza del ciclo reproductivo de las especies del género *Bacillus*, como por ejemplo en el día 3 las células vegetativas se encontraron en un notable descenso mientras que el número de esporas indicó su máximo índice para este mismo día. El contraste también se observó en el día 1 donde la densidad de células vegetativas fue más alta que la de esporas. Esto deja en evidencia que las esporas inoculadas en el inicio del experimento tuvieron la capacidad de germinar y a partir de esto se produjeron las células vegetativas que se detectaron y que la bacteria crece mediante fisión binaria mientras en su entorno se encuentran condiciones favorables para su desarrollo, por otro lado, la esporulación se ve inducida cuando se busca una estrategia de sobrevivencia en presencia de algún tipo de limitación o estrés como la escasez de nutrientes, alta densidad poblacional en el microbioma residente y las interacciones con estos (Errington, 2003; Tejera et al., 2011; Villareal et al., 2018). Así mismo, en la figura 8 se reflejó la desviación estándar de los dos ensayos realizados con *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp, que particularmente mostraron que el día 5 mayor nivel de desviación se tuvo entre los dos ensayos.

Figura 9. Comportamiento poblacional de *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.



Comportamiento poblacional de *Pseudomonas* sp. UA1525 sobre la carposfera de aguacate Hass. Cada uno de los frutos fue asperjado con una solución de células ajustada a una concentración de 10^8 bacterias/mL. En cada tiempo un fruto fue procesado tomando 4 fracciones de tejido de 1cm^2 , estos tejidos en conjunto se suspendieron en agua destilada estéril. La concentración de células se estimó a partir de diluciones seriadas y conteos en placas de BK sometidos posteriormente a radiación UV para evaluar la emisión de fluorescencia (Fuente: Autor).

En el caso de *Pseudomonas* sp. UA1525 la estimación de las UFC/cm² también se hizo de la misma manera como con *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp, evaluando la densidad de la población sobre la superficie del fruto a través del tiempo, así mismo incluyendo un control sin inóculo para esta bacteria. El contraste del inóculo inicial de *Pseudomonas* sp. UA1525 se vio reducido hasta en 4 unidades logarítmicas de las UFC/cm². A partir de aquí la densidad poblacional tuvo una tendencia ascendente muy significativa a través de los tiempos de análisis, donde se vio la disminución de sobrevivencia hasta no ser detectada en el día 8.

Independientemente de las condiciones de cultivo el éxito en el uso de inoculantes microbianos se es modulado principalmente por la colonización por ejemplo en sistemas como la rizosfera y filosfera (Chin-A-Woeng et al., 2000). De igual forma la eficiencia de los agentes de control biológico depende de varios factores, como lo son la concentración adecuada de células microbianas que se inoculan, la colonización y disposición de nutrientes teniendo en cuenta las condiciones abióticas y bióticas, la expresión de los genes involucrados en el control biológico y así mismo, la estabilidad de este microorganismo a través del tiempo (Sare et al. 2021). De esta manera en el seguimiento del comportamiento poblacional de las bacterias *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525 se quiso evaluar la habilidad de estos microorganismos para persistir en un ambiente particular que puede llegar a determinar su actividad biocontroladora en ambientes con condiciones tan extremas como la filosfera de las plantas. En este caso, los resultados mostraron la drástica disminución inicial de la densidad poblacional de las dos bacterias aplicadas que posiblemente se deba a este proceso de adaptación que toma vincular un microorganismo exógeno a condiciones de crecimiento diferentes y un microbioma o microambiente ya establecido, estudios han demostrado esa resistencia interpuesta por parte del microbioma autoctono en plantas, por ejemplo, el realizado por Lahlali et al. (2008), quienes tras la aplicación de la cepa K de *Pichia anomala* en frutos de manzana observaron un descenso rápido en la concentración del agente biocontrolador, de un inóculo inicial de 10⁸ a 10⁴ UFC/cm² en tan solo 24 horas posterior a su aplicación, comportamiento comparado como el que se mostró en este estudio. Otro caso fue el de ensayos realizados en frutos de drupa con la inoculación de *Penicillium frequentans* que desde el momento de su aplicación empezó a reducir constantemente su población hasta desaparecer por completo (Guijarro et al., 2019), comportamiento en común que obtuvo Köhl et al. (2019) con la rápida decadencia de *Pantoea agglomerans* en cítricos y de *Bacillus amyloliquefaciens* en melocotón. Esto se relaciona a la capacidad de recuperación que tienen los microorganismos residentes en estos microbiomas que pueden inducir la tendencia de la disminución del agente biocontrolador que se está aplicando, rasgo que se evidenció en lo experimentado con *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y aún más en *Pseudomonas* sp. UA1525. Los estudios en el marco del control biológico se han enfocado principalmente en entender las interacciones que se establecen como planta-patogeno-agente biocontrolador. En esto, se ha ido ignorando el papel que juega el microbioma residente que puede llegar a sesgar la aplicación de bioinoculantes de manera óptima (Caro et al., 2018). Por lo que bajo este concepto se ve influenciada la capacidad de prevalencia a lo largo del tiempo de las poblaciones microbianas que se inocularon, todo esto se podría concentrar en un común denominador y es dependiente de la estructura del microbioma residente posterior a la aplicación de un agente de control biológico que pueden reaccionar y crearse una variedad de interacciones ecológicas como la competencia por espacio o disposición de nutrientes, parasitismo, como también podrían establecerse el comensalismo y mutualismo (Massart et al., 2015; Zhimo et al., 2021).

Los resultados también demostraron que las poblaciones de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525 inoculadas en el fruto de Aguacate Hass persistieron con

variaciones poblacionales en descenso a través de al menos 8 días de seguimiento evidenciando un declive de la población por centímetro cuadrado de tejido hasta no ser detectada. Por ejemplo, el género *Bacillus* el cual está ampliamente distribuido en gran variedad de nichos y que el suelo es considerado su principal reservorio ya que pueden usar diversidad de sustratos orgánicos dispuestos en el suelo que aun así puede ser complejo el establecimiento de gran diversidad genética y funcional de especies microbianas. No obstante, algunas especies de *Bacillus* pueden desarrollarse en este nicho bajo recuentos cultivables entre 3 a 6 unidades logarítmicas por gramo de peso fresco de suelo (Villarreal et al., 2018), aun así, estudios como los de Kumar et al. (2011) sobre el ARNr en suelo revelaron que la abundancia de especies cultivables y no cultivables del género *Bacillus* no son altas. Lo que puede dejar en duda los niveles de la capacidad de colonización que posee este género, por otro lado, Rudrappa et al. (2008) reportaron que la especie *B. subtilis* FB17 produjo biopelículas como mecanismo de colonización gracias a su atracción por el ácido L-málico secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana*. De esta forma, en un enfoque que se dirige a la sustentabilidad agrícola existen escasas investigaciones con la idea de comprender la diversidad y dinámica poblacional específica de *Bacillus* en diferentes ambientes, en donde por ejemplo en la carposfera a diferencia de la rizosfera requerirá mayor esfuerzo para lograr una colonización y persistencia. En carposfera o filosfera se han encontrado antecedentes en donde Lozano, 2017 en carposfera de Mango observó cuatro especies de *Bacillus* persistieron a lo largo de 15 días disminuyendo 2 unidades logarítmicas de densidad en el tejido del fruto, de igual forma indicó que la dinámica poblacional de *Bacillus* en mayor medida permanece como esporas seguido de una germinación de una pequeña subpoblación de células que permanece metabólicamente activas, lo que se contrasta con lo estudiado por Crane et al., (2013) en el desarrollo poblacional de *B. amyloliquefaciens* en la filosfera de trigo donde obtuvo una tendencia en descenso de 2 unidades logarítmicas durante 15 días.

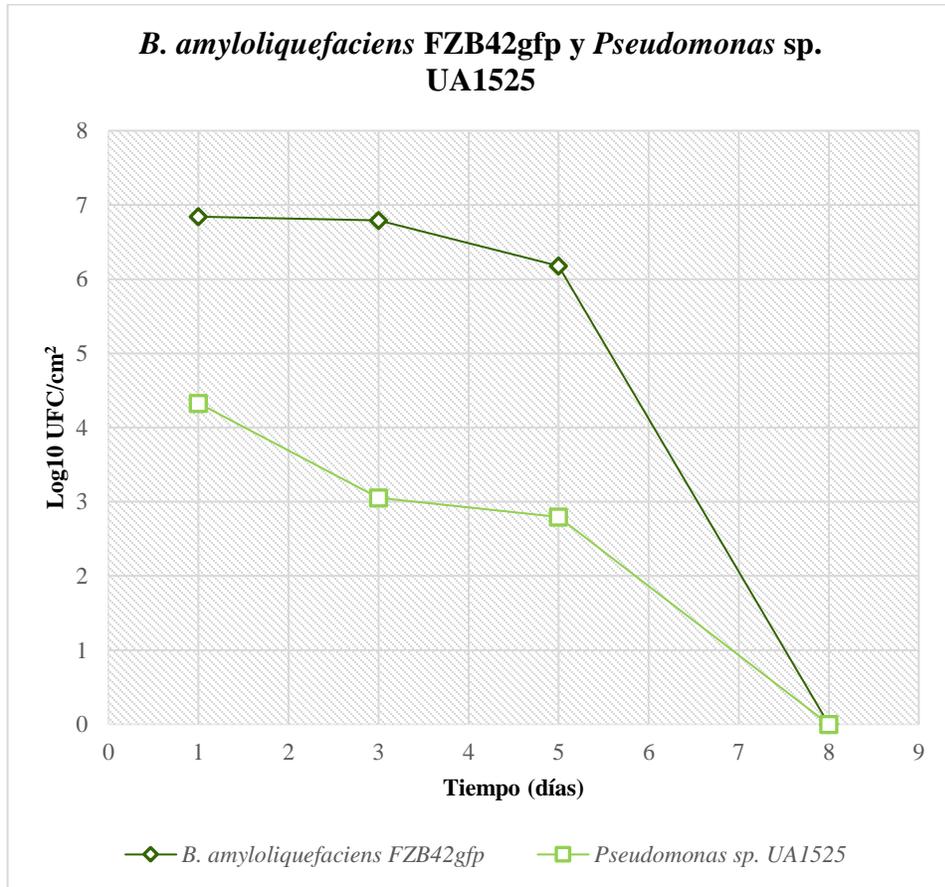
A través del comportamiento que mostraron las cepas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp y *Pseudomonas* sp. UA1525, en la disminución del nivel poblacional posterior a la aplicación se ve limitado su potencial biocontrol a largo plazo que, desde un punto de vista agronómico, estos microorganismos al no tener la capacidad de persistir en un ecosistema como el de la carposfera de aguacate Hass requieren de aplicaciones periódicas como estrategia para mantener estos agentes de control biológico en abundancia y que pueda equiparar todo el fruto. A partir de esta idea, estudios previos como los de Lozano (2017), Crane et al. (2013) y Zeriuoh et al. (2014) coinciden en que la mayoría de población microbiana sobre los tejidos se mantienen como esporas, el cual es su fase metabólica inactiva, en el caso del género *Bacillus*, lo que trae a discusión sobre la capacidad de la actividad biocontroladora de estas especies, como sugieren algunos antecedentes sobre el potencial de biocontrol se cuestiona la capacidad de las células metabólicamente activas de llegar a producir la cantidad necesaria de metabolitos antimicrobianos que lleguen a inhibir la proliferación de agentes patógenos. La relación entre los cambios de la densidad poblacional y la producción de estos metabolitos se vio evidenciada en investigaciones *in situ*, como las de Ongena et al. (2005) en la evaluación del potencial biocontrolador de la cepa M4 de *Bacillus subtilis* contra

enfermedades fúngicas de las plántulas de frijol causado por *Pythium ultimum* y contra el moho gris de la manzana en poscosecha, demostrando la actividad de control biológico con metabolitos como lipopéptidos y fengicinas en tejidos infectados. Al igual que Toure et al. (2004), con el estudio de la cepa GA1 de *Bacillus subtilis* en el control de la enfermedad del moho gris de la manzana causada por *Botrytis cinérea* evidenciando su potencial para reducir la enfermedad mediante el tratamiento de frutos heridos artificialmente con suspensiones de endosporas, manteniendo un nivel de protección de hasta el 80% durante 10 días gracias a la producción de lipopéptidos antifúngicos. Lo anterior sumado con la idea de que las células metabólicamente activas son las que tienen la capacidad de producir estos metabolitos antimicrobianos se podría hipotetizar que hasta los 2 días postinoculación se puede llegar a alcanzar el índice máximo de células vegetativas, con el potencial de llegar a controlar hongos fitopatógenos como *C. gloeosporioides*, *L. theobromae* y especies de *Fusarium*, los cuales son los más frecuentados en la postcosecha del Aguacate Hass. esperando que en este lapso de tiempo se acumule la mayor cantidad posible de metabolitos antifúngicos, según lo evidenciado por Lozano (2017), Crane et al. (2013) y el seguimiento del comportamiento poblacional en este estudio preliminar.

Por otro lado, el género *Pseudomonas* también ha sido asociado en mayor medida con el suelo como su nicho ecológico, en donde su colonización está influenciada por los exudados radiculares, diferentes estudios recopilan reportes relevantes sobre actividades antagónicas y de biocontrol de fitopatógenos por parte de este género (Álvarez et al., 2020), sin embargo, es escaso el estudio a la evaluación del comportamiento poblacional sobre la carposfera con interés biocontrolador, teniendo en cuenta que el género *Pseudomonas* también posee la capacidad de formar biopelículas y producir metabolitos secundarios bioactivos como fenazinas, floroglucinoles, pioluteorinas, pirrolnitrinas y lipopéptidos (Dimkic, 2022). Por ende, es necesario fortalecer estos estudios preliminares sobre especies de *Pseudomonas* con potencial biocontrol. No obstante, en busca de la optimización una alternativa para mejorar la eficiencia y la persistencia de estos microorganismos es la aplicación de más de un agente de control biológico o usando ensamblajes microbianos como los mencionó Razack (2021), que también expuso sobre las relaciones ecológicas positivas bajo interacciones sinérgicas que pueden llegar a ser más ventajosas considerando que el biocontrol de las enfermedades postcosecha es un proceso complejo para que solo un microorganismo se haga cargo. Algunos estudios que han mostrado una mayor eficiencia cuando se aplican cepas complementarias han sido como los de Rivas et al. (2019) que evaluó el potencial biocontrolador en individual y en conjunto de una levadura marina *Debaryomyces hansenii* y una bacteria marina *Stenotrophomonas rhizophila* contra *Fusarium proliferatum* en frutos de melón en etapa postcosecha, donde evidenció la reducción significativa del crecimiento del patógeno cuando se aplicó el tratamiento combinado. Por otro lado, Gotor et al. (2017) a través de evaluaciones de diferentes tratamientos de coinoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 y *Penicillium frequentans* mostró resultados interesantes contra *Monilinia laxa* y *Monilinia fructicola* sobre drupas llegando a registrar índices de control biológico iguales de efectivos como el de algunos productos de origen químico. Sin embargo,

la eficiencia y estabilidad de los agentes de control biológico de forma individual o en combinación necesitan de estudios a profundidad de los factores que constituyen las condiciones bióticas y abióticas que permiten consolidar esta actividad antagonista.

Figura 10. Comportamiento poblacional de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp frente a *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de aguacate Hass durante 8 días.



Comparación de la densidad poblacional a través del tiempo de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp frente a *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de aguacate Hass durante 8 días, los puntos sobre la gráfica indican el recuento de la densidad de células totales en el caso de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp, la cual abarca células vegetativas y esporas, frente al recuento de las células bacterianas de *Pseudomonas* sp. UA1525 (Fuente: Autor).

La comparación directa del comportamiento de la densidad poblacional entre los dos tratamientos aplicados fue muy significativa, las primeras particularidades fueron el descenso muy desmedido y rápido de *Pseudomonas* sp. UA1525 en comparación a *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp, se ve evidenciada las grandes diferencias en la naturaleza para

cada uno de estos microorganismos, pero, la que más sobresale para este caso de la evaluación de la sobrevivencia es la ventaja que tiene *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp al producir endosporas, esta espora interna le proporciona a la especie del género *Bacillus* la capacidad de propagación y prevalencia en diversos ecosistemas, su ciclo reproductivo consta de una fase de crecimiento vegetativo y otra en la que se produce la esporulación (Villareal et al., 2018). Esta etapa de esporulación probablemente le permitió sobrevivir en una mayor densidad poblacional y persistiendo sobre la carposfera del fruto. Por esta razón la relevante característica de formación de endosporas resistentes a condiciones bióticas y abióticas le da un interés extra para la formulación de productos biotecnológicos, mientras que las especies de *Pseudomonas* a pesar de demostrar actividad de control biológico, no tiene la capacidad de producir esporas de resistencia, lo que limita su formulación, estabilidad y perdurabilidad para uso comercial. No obstante, esta serie de experimentos necesitan más replicas para recopilar más información sobre la colonización y el comportamiento poblacional que demuestran estos microorganismos benéficos mientras se establecen y persisten en la superficie del fruto que se quiere proteger, así mismo se obtendrán más indicios de cómo se podrá optimizar el uso y aplicación de estos agentes de control biológico en cultivo como alternativa conveniente para el consumidor, medio ambiente y llegar a potenciar la calidad del fruto en el mercado internacional.

8. CONCLUSIONES

La cepa modelo *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42gfp y el aislamiento nativo *Pseudomonas* sp. UA1525, bacterias con potencial control biológico no tuvieron la capacidad de colonizar la carposfera de Aguacate Hass, donde solo persistieron hasta antes del día 8 de análisis.

El comportamiento de la densidad poblacional que marca la sobrevivencia de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp sobre la carposfera de Aguacate Hass. fue fluctuante, probablemente gracias a su resistencia adquirida por la producción de endospora, donde prevaleció a través de un tiempo anterior a los 8 días. Adicional a esto, *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp mostró la habilidad de germinar a partir de sus esporas y sobrevivir, mientras que *Pseudomonas* sp. UA1525 mostró un descenso poblacional más marcado durante los 8 días de análisis posiblemente al no poseer un mecanismo de resistencia y sobrevivencia como lo es producir espora. De igual forma desde el punto de vista agronómico estos microorganismos evidenciaron que en los primeros dos días postinoculación pueden producir el mayor nivel de células metabólicamente activas que puedan llegar a cumplir con la capacidad biocontroladora.

La identidad del aislamiento nativo UA1525, producto de los estudios previamente desarrollados por parte del grupo de investigación en bacteriología agrícola y ambiental BA&A en el 2017 y dispuesto para los ensayos del presente estudio, que bajo análisis

taxonómico de su secuencia del gen ARNr 16S contrastada en bases de datos como GenBank de la NCBI, RPD y EMBL-EBI no se pudo precisar en el orden de especie, donde solo se llegó a definir como parte del género *Pseudomonas*, esto, posiblemente a la baja resolución del gen en estudio para este género bacteriano.

9. GLOSARIO

PGPR: Rizobacterias o bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Tienen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano, facilitando el enraizamiento y crecimiento de las plantas.

Biocontrol: Hace referencia al uso de organismos que solos o en combinación son capaces de disminuir los efectos negativos que causa una población patógena sobre el crecimiento o productividad de un cultivo. Este mecanismo depende de las interacciones que ocurren entre la planta, el patógeno, el organismo biocontrolador y el ambiente en el que se desarrolla la interacción.

Carposfera: Microambiente desarrollado en la fruta de una planta.

Postcosecha: Se refiere al manejo adecuado para la conservación de diversos productos agrícolas, con el fin de determinar la calidad y su posterior comercialización o consumo

Fungicida: Herbicidas e insecticidas son plaguicidas utilizados en la protección de cultivos contra plagas y enfermedades.

Planta huésped: Planta que sirve de albergue, hábitat o fuente de alimento como parte del ciclo vital de otros organismos.

Hongo fitopatógeno: Especies de hongos que producen enfermedades en las plantas

Interacción biológica: Son las interacciones entre organismos de una comunidad biológica dentro de un ecosistema

Colonización: Acción por la cual los microorganismos se asientan establemente en un nuevo nicho biológico.

Endospora: Sustancia inactiva, resistente, no reproductiva producida por una pequeña cantidad de bacterias de la familia Firmicute.

Secuenciación: Proceso que determina la secuencia de bases de los nucleótidos

Amplición: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de polimerasa PCR.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alberti, M. F., Brogio, B., Rodrigues da Silva, S., Cantuarias-Avilés, T., & Fassio, C. (2018). Avances en la propagación del aguacate. *Revista Brasileira de Fruticultura*.
- Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., . . . Brader, G. (2016). Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental microbiology*, 18(8), 2634-2645.
- Álvarez, S. P., Arbelo, O. C., Pérez, M. E., & Quezada, G. Á. (2016). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿ control biológico o patógeno? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225.
- Álvarez-García, J. A.-G. (2020). *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 16(1), 01-10.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(4), 1563-1589.
- APEAM. (2016). Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México. Listado de plaguicidas recomendado para el cultivo del aguacate. *Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México* , 81.
- Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*(80), 51-60.
- Arias, F., Montoya, C., & Velásquez, O. (2018). Dinámica del mercado mundial de aguacate. *Revista Virtual Universidad Católica del Norte*, 55, 22-35.
- ASOHOFrucol. (2020). *Asociación Hortifrutícola de Colombia. Cadena productiva Aguacate*.
- Bartoli, A., & Angel, J. (2008). Manual técnico del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* L.). *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA)*.
- Bautista-Baños, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, 8(1), 1-6.
- Bernal Estrada, J., Díaz Diez, C., Osorio Toro, C., Tamayo Vélez, Ñ., Osorio Vega, W., Córdoba Gaona, O., & Londoño Bonilla, M. (2013). Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate . (No. Doc. 26784) *CO-BAC, Bogotá*).

- Bernal, J. A. (2016). Estudios ecofisiológicos en aguacate cv. Hass en diferentes ambientes como alternativa productiva en Colombia. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses*. Springer., 41-76.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. . *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 601-608.
- Bowen, J., Billing, D., Connolly, P., Smith, W., Cooney, J., & Burdon, J. (2018). Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 146, 43-50.
- Cardona Cardona, J. E., & Urrea Jimenez, C. F. (2020). Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en aguacate hass (*Persea americana*) en el departamento de Caldas. *Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD*.
- Caro-Quintero, A., González, C., Balbín-Suárez, A., Wisniewski, M., Berg, G., Smalla, K., & Cotes., A. M. (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico. V. 1. En *Capítulo 4. Estudios del microbioma y su aplicación en el control biológico de fitopatógenos* (pág. 267).
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological research*, 160(1), 75-81.
- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C. ..., & Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of applied microbiology*, 119(2), 487-499.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., . . . Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007-1014.
- Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of biotechnology*, 140(1-2), 38-44.
- Chen, X. H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K. ..., & Borriss, R. (2006). Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB4. *Journal of bacteriology*, 188(11), 4024-4036.

- Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H., Dekkers, L. C., & Lugtenberg, B. J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular plant-microbe interactions*, 13(12), 1340-1345.
- Chowdhury, S. P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., . . . Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS ONE*, 8(7), e68818.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.
- Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K. ..., & Hartmann, A. (2015). Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 984-995.
- Codex alimentarius. (2019). *Límites máximos de residuos (LMR)*. Obtenido de Índice de plaguicidas: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/es/>
- Cotes, A. M. (2014). Capítulo 6. Control biológico de enfermedades de plantas en Colombia. En W. Bettiol, M. C. Rivera, P. Mondino, J. R. Montealegre, & Y. Colmenarez, *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe* (págs. 169-180).
- Cowan, A. K., & Wolstenholme, B. N. (2016). Avocado. *Encyclopedia of food and health*, 294-300.
- Crane, J. M., Gibson, D. M., Vaughan, R. H., & Bergstrom, G. C. (2013). Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology*, 103(2), 146-155.
- Dimkic, I. J. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Droby, S. (1994). Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. *Biological control of postharvest diseases theory and practice*.
- Duarte, P. F., Chaves, M. A., Borges, C. D., & Mendonça, C. R. (2016). Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciência Rural*, 46, 747-754.

- Elomari, M. C. (1997). *Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 846-852.
- Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M. B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H., & Trevors, J. T. (1999). Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 53(3), 187-199.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117-126.
- Everett, K. R. (2019). Alternative postharvest chemicals for use on avocado. *In XI World Avocado Congress*, 1-10.
- Fan, B., Borriss, R., Bleiss, W., & Wu, X. (2012). Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 38-44.
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303-311.
- Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), 47-63.
- Ferreira, R., Selles, G., & Gil, P. (2011). Asfixia radicular en huertos de Paltos, manejo del riego y suelo. Instituto de Investigaciones Pecuarias. *Boletín INIA N°231*, 56.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- 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.
- García-Vargas, M. C., Contreras, M. D., & Castro, E. (2020). Avocado-derived biomass as a source of bioenergy and bioproducts. *Applied Sciences*, 10(22), 8195.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Casals, C., Torres, R., De Cal, A., Guijarro, B., & Usall, J. (2017). Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. *Crop Protection*, 102, 72-80.
- Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., & Reverchon, F. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological research*, 219, 74-83.

- Guijarro, B., Larena, I., Vilanova, L., Torres, R., Balsells-Llauradó, M., Teixidó, N., & De Cal, A. (2019). Dispersion, persistence, and stability of the biocontrol agent *Penicillium frequentans* strain 909 after stone fruit tree applications. *Environmental Science and Pollution Research*(26), 29138-29156.
- Gul, A., Kidoglu, F., Tüzel, Y., & Tüzel, I. H. (2008). Effects of nutrition and " *Bacillus amyloliquefaciens*" on tomato (" *Solanum lycopersicum* L.") growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3, 422-429.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 95-98.
- 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 Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1647-1660.
- Herrera-González, J. A., Salazar-García, S., Martínez-Flores, H. E., & Ruiz-García, J. E. (2017). Indicadores preliminares de madurez fisiológica y comportamiento poscosecha del fruto de aguacate Méndez. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 55-63.
- Hiti-Bandaralage, J., Hayward, A., & Mitter, N. (2017). Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences*, 2898-2921.
- INTAGRI. (2018). Injerto en Aguacate. Serie Frutales, Núm. 44. *Artículos Técnicos de INTAGRI*, 8.
- INTAGRI. (2019). Requerimientos de Clima y Suelo en el Cultivo de Aguacate. *Serie Frutales Núm. 56. Artículos técnicos de INTAGRI*.
- Kejela, T., Thakkar, V. R., & Patel, R. R. (2017). A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of coffee. *Rhizosphere*, 4, 9-15.
- King, E., Ward, M., & Raney., D. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307. Obtenido de King, EO, MK Ward y DE Raney. 1954. Dos medios simples para la demostración de ficocianina y fluorescina, *J. Lab. Clin. Medicina*. 44: 301-307.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776), 885-886.

- Köhl, J. K., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, *10*, 845.
- Köhl, J., Booij, K., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *BioControl*, *64*(5), 469-.
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P. ..., & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *ASM Journals. Journal of Bacteriology*, *186*(4).
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg., 37-59.
- Lahlali, R., Massart, S., De Clercq, D., Serrhini, M. N., Creemers, P., & Jijakli, M. H. (2009). Assessment of *Pichia anomala* (strain K) efficacy against blue mould of apples when applied pre-or post-harvest under laboratory conditions and in orchard trials. *European journal of plant pathology*, *123*(1), 37-45.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, *11*(2), 139.
- Litz, R. E., Raharjo, S. H., & Lim, M. G. (2007). Avocado. En H. Lörz, P. EC., & D. M. (Edits.), *Transgenic Crops V. Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Vol. 60, págs. 167-187). Berlín: Springer.
- Lozano, C. (2017). Explorando el desempeño de bacterias aeróbicas formadoras de endospora para el control de antracnosis en mango. *Universidad de Antioquia*.
- Lynce, D. (2015). Manejo tecnológico del cultivo de aguacate. *Convenio Especial de Cooperación No. 67, entre el SENA y Asohofrucol*.
- Massart, S., Martinez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: challenges and opportunities. *Biological control*, *89*, 98-108.
- Matthijs, S., Coorevits, A., Gebrekidan, T. T., Tricot, C., Vander Wauven, C., Pirnay, J. P., & Cornelis, P. (2013). Evaluation of *oprI* and *oprL* genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian River. *Research in Microbiology*, *164*(3), 254-261.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). *Cadena productiva Aguacate. Primer trimestre*.

- Moyne, A. L., Shelby, R., Cleveland, T. E., & Tuzun, S. A. (2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology*, *90*(4), 622-629.
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, *12*(6), 1513-1530.
- Munhuweyi, K., Mpai, S., & Sivakumar, D. (2020). Extension of avocado fruit postharvest quality using non-chemical treatments. *Agronomy*, *10*(2), 212.
- Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *J Microb Biochem Technol*, *6*(7), 361-365.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, *69*(1), 29-38.
- Oni, F. E., Kieu Phuong, N., & Höfte, M. (2015). Recent advances in *Pseudomonas* biocontrol. *Bacteria-plant interactions: Advanced research and future trends*, 167-198.
- Orrego, C. E., Rodríguez, Y., Zemanate, K., & Rodríguez, L. J. (2021). PRODUCTIVIDAD Y COMPETITIVIDAD FRUTÍCULA ANDINA. *Producto 3: Informe técnico de resultados sobre la productividad alcanzada por cultivo y por país*.
- Parra Ramírez, D., & Serrano Scarpetta, S. (2017). Guía de exportación de aguacate hass para pequeños y medianos productores en Colombia. *Universidad ICESI*.
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Velez, D. (2020). Mechanisms of action of *Bacillus* spp. (Bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. *Acta Biológica Colombiana*, *25*(1), 112-125.
- Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen? *Revista de Protección Vegetal*, *30*(3), 225-234.
- Pérez, S. C. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista de protección vegetal*.
- Pont Antona, P. J. (2016). Caracterización taxonómica de nuevas cepas del género *Pseudomonas*. *Universitat de les Illes Balears*.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, *34*(6), 1037-1062.

- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & De Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 537-547.
- Ramírez, C. (2010). Exploring the relation between plant phosphorus nutrition and growth promotion by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* strains,. *Auburn University, Auburn, Alabama, USA.*, 156.
- Ranade, S. S., & Thiagarajan, P. (2015). A review on *Persea americana* Mill. (avocado)-its fruits and oil. *Int. J. PharmTech Res*, 8(6), 72-77.
- Razack, A. H. (2021). Microbial ecology to support integrative efficacy improvement of biocontrol agents for postharvest diseases management. *Postharvest Biology and Technology*.
- Rea, M. C., Ross, R. P., Cotter, P. D., & Hill, C. (2011). Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Prokaryotic antimicrobial peptides*, 29-53.
- Rivas-Garcia, T., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Rincon-Enriquez, G., Chiquito-Contreras, R. G., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Enhanced biocontrol of fruit rot on muskmelon by combination treatment with marine *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* and their potential modes of action. *Postharvest biology and technology*, 151, 61-67.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estévez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5625-5635.
- Rojas, E. C., Arreola, J. A., & Baquera, M. D. (2012). *Propagación de aguacate*. Universidad de Chapingo.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E. ..., & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440.
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(2), 49-63.
- Sah, S. K. (2021). Pseudomonas mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Current Research in Microbial Sciences*.
- Sánchez, P. J., Alcántar, R. J., Coria, A., Anguiano, C. J., Vidales, F. I., Tapia, V. L., & Vidales, F. (2001). Tecnología para la producción de aguacate en México. *NIFAP*, 208.

- Sandhya, V., Shrivastava, M., Ali, S. Z., & Prasad, V. S. (2017). Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russian agricultural sciences*, 43(1), 22-34.
- Sandoval-Castro, E., Peraza-Magallanes, A. Y., Dodd, R. S., Ashworth, V. E., Cruz-Mendivil, A., & Calderon-Vazquez, C. L. (2021). Exploring genetic diversity of lowland avocado (*Persea americana* Mill.) as a genetic reservoir for breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(7), 2757-2766.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.
- Sare, A. R., Jijakli, M. H., & Massart, S. (2021). Microbial ecology to support integrative efficacy improvement of biocontrol agents for postharvest diseases management. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111572.
- Scholz, R., Molohon, K. J., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A. L., Süßmuth, R. D., . . . Borriss, R. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of bacteriology*, 193(1), 215-224.
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., Dietel, K., . . . Borriss, R. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 196(10), 1842-1852.
- Scotta, C., Mulet, M., Sánchez, D., Gomila, M., Ramírez, A., Bennasar, A., & Lalucat, J. (2012). Identification and genomovar assignation of clinical strains of *Pseudomonas stutzeri*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(9), 2133-2139.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X., & Zou, H. (2017). Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*, 114, 45-50.
- Tamayo, A., Córdoba, O. D., & Londoño, M. E. (2008). *Tecnología para el cultivo del aguacate (Vol. 5)*. Rionegro, Antioquia: Corpoica.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.

- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Touré, Y., Ongena, M. A., 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.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338.
- Union Europea. (2005). REGULATION (EC) No 396 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. *Official Journal of the European Union*, 1-16.
- Valdiviezo, J. (2021). Una revisión de la obtención de compuestos fenólicos a partir de cáscara y semilla de palta (*Persea americana* Mill.), empleando tecnologías emergentes.
- Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2000). Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological Control*, 71(1), 11-22.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J. J., Argel, L. E., Orduz Peralta, S., & Romero-Tabarez, M. (2013). Fengycin C produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of natural products*, 76(4), 503-509.
- WAMAFSTI. (s.f.). *World Avocados Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights*. Obtenido de <https://www.researchandmarkets.com/reports/4701142/world-avocados-market-analysis>
- Woolf, A. B. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.). En E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pág. 223). Woodhead Publishing.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Xie, S., Zang, H., Borriss, R., & Gao, X. (2014). Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Applied and environmental microbiology*, 80(24), 7512-7520.

- Xiong, B. &. (2018). Big data and dietary trend: The case of avocado imports in China. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*, 30(4), 343-354.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are: *gyrB* D37926, D37297, D86005–D86019 and AB039381. *Microbiology*, 146(10), 2385-2394.
- Yasir, M., Das, S., & Kharya, M. (2010). El perfil fitoquímico y farmacológico de *Persea americana* Mill. *Revisiones de farmacognosia*, 4, 77–84.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5942-5944.
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2011). Avocado: production, quality, and major processed products. *Handbook of vegetables and vegetable processing*, 525-543.
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2018). Avocado production, processing, and nutrition. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, 509-534.
- Zapata Guzmán, J. E., Tobón Acevedo, J. D., Patiño Tiria, H. I., Palacios, E. H., Mejía Córdoba, C. A., Marín Zapata, H. D., & Alcaraz Guzmán, E. (2018). El cultivo de aguacate *Persea americana* en el occidente de Antioquia.
- Zeriuoh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2196-2211.
- Zeriuoh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2014.
- Zhimo, V. Y., Kumar, A., Biasi, A., Salim, S., Feygenberg, O., Toamy, M. A., & Droby, S. (2021). Compositional shifts in the strawberry fruit microbiome in response to near-harvest application of *Metschnikowia fructicola*, a yeast biocontrol agent. *Postharvest Biology and Technology*, 175, 111469.

10. ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo B de King (KB) (King et al., 1954).

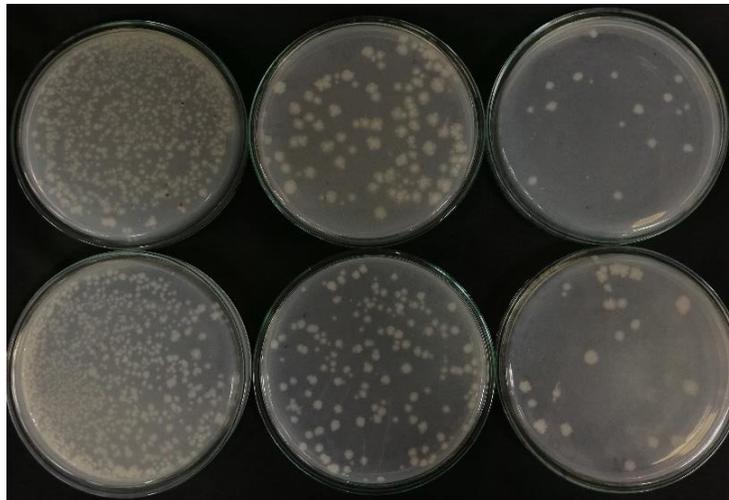
COMPOSICIÓN TEÓRICA	(g/L de agua destilada)
Proteasa peptona No. 3	20.0
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄	1.5
Agar Bacteriológico	15
Glicerol	10mL

Anexo 2. Medio de cultivo Tripticasa de Soja Agar (TSA) Eritromicina.

COMPOSICION TEÓRICA	(g/L de agua destilada)
Tripticasa de Soja Agar	40
Eritromicina	1µg/mL*

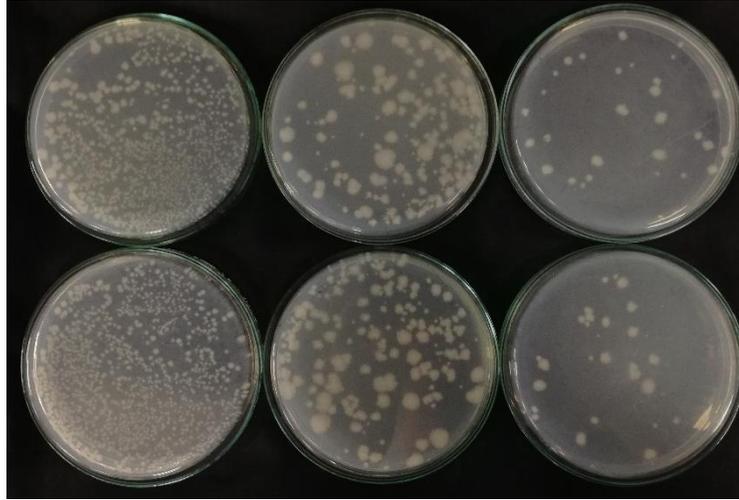
*Esta concentración se aplicó a partir de una solución stock de 500ppm preparada con 5mg de Eritromicina comercial (originalmente en presentación de 500mg) en 10 mL de etanol grado reactivo al 70% y teniendo en cuenta que 1µg/mL es equivalente a 1ppm.

Anexo 3. Recuento en placa de las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ por duplicado (en dirección izquierda a derecha) de esporas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp en el primer tiempo de análisis en medio TSAeri



(Fuente: Autor)

Anexo 4. Recuento en placa de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} por duplicado (en dirección izquierda a derecha) de células totales de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp en el primer tiempo de análisis en medio TSAeri.



(Fuente: Autor)

Anexo 5. Recuento en placa de las diluciones 10^{-2} , de *Pseudomonas* sp. UA1525 en exposición bajo UV en el transiluminador.



(Fuente: Autor)

Anexo 6. Informes de los recuentos en placa obtenidos en los ensayos del comportamiento de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp en carposfera de Aguacate Hass.

Ensayos	Tiempo	Tratamiento	Dilución	Recuento en placa (UFC)		Informe
Ensayo 1	Tiempo 1 (Día 1)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	92	91	5x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	54	26	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	80	77	3.7x10 ⁵ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	4	2	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻²	0	0	
	Tiempo 2 (Día 3)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	157	139	3.1x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	20	12	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	94	83	2.6x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	30	12	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻²	0	0	
	Tiempo 3 (Día 5)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	20	16	1.5x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	83	30	8.7x10 ⁵ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	8	5	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻²	0	0	
	Tiempo 4 (Día 8)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico		10 ⁻³	0	0	0 UCF/cm ²	
		10 ⁻⁴	0	0		
Control sin inoculo (ADE)		10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	
		10 ⁻²	0	0		
Ensayo 2	Tiempo 1 (Día 1)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	123	136	3.8x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	30	31	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	126	96	2.6x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	23	19	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻²	0	0	
	Tiempo 2 (Día 3)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	246	289	6.1x10 ⁶ UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	52	45	
			10 ⁻³	196	150	3.5x10 ⁶ UCF/cm ²

		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻⁴	31	25	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹ 10 ⁻²	0 0	0 0	0 UCF/cm ²
	Tiempo 3 (Día 5)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	0		0 UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
	Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	
		10 ⁻²	0	0		
	Tiempo 4 (Día 8)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	10 ⁻³	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
		<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp con choque térmico	10 ⁻³	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻⁴	0	0	
		Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²
			10 ⁻²	0	0	

Los recuentos por duplicado de cada dilución analizada que correspondieron a cada uno de los tiempos de análisis, se promediaron para posteriormente multiplicarlo por el inverso de su dilución, multiplicando este por 5 y dividiéndolo en 4, de esta manera, se hizo la relación de los recuentos en placa a partir de las células contenidas en la superficie de los 4 tejidos, cada uno de un cm² suspendidos en 5 ml de ADE para informar en UCF/cm² (Fuente: Autor).

Anexo 7. Informe final de los ensayos del comportamiento de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp en carposfera de Aguacate Hass.

Tiempo	Tratamiento	Informe (promedio de los dos ensayos)	Informe (Log10)
Tiempo 1 (Día 1)	Células totales de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	6.9x10 ⁶ UCF/cm ²	6.84
	Esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	5.3x10 ⁵ UCF/cm ²	5.75
	Células vegetativas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	6.3x10 ⁶ UCF/cm ²	6.80
	Control sin inoculo (ADE)	0 UCF/cm ²	0
Tiempo 2 (Día 3)	Células totales de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	6.2x10 ⁶ UCF/cm ²	6.79

	Esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	3.9x10 ⁶ UCF/cm ²	6.59
	Células vegetativas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	2.2x10 ⁶ UCF/cm ²	6.35
	Control sin inoculo (ADE)	0 UCF/cm ²	0
Tiempo 3 (Día 5)	Células totales de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	1.5x10 ⁶ UCF/cm ²	6.17
	Esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	1.3x10 ⁶ UCF/cm ²	6.11
	Células vegetativas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	1.8x10 ⁵ UCF/cm ²	5.27
	Control sin inoculo (ADE)	0 UCF/cm ²	0
Tiempo 4 (Día 8)	Células totales de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	0 UCF/cm ²	0
	Esporas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	0 UCF/cm ²	0
	Células vegetativas de <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42gfp	0 UCF/cm ²	0
	Control sin inoculo (ADE)	0 UCF/cm ²	0

Los recuentos informados y expuestos en el Anexo 6 y que pertenecen a los dos ensayos realizados con *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp se unificaron bajo promedio para su informe final, también se calculó la densidad poblacional de las células vegetativas de *B. amyloliquefaciens* FZB42gfp mediante la sustracción entre los recuentos de las células totales y el recuento de esporas. A estos informes finales se les halló su logaritmo en base 10 para su graficado (Fuente: Autor).

Anexo 8. Informes de los recuentos en placa obtenidos en los ensayos del comportamiento de *Pseudomonas* sp. UA1525 en carposfera de Aguacate Hass.

Tiempo	Tratamiento	Dilución	Recuento en placa (UFC)		Informe	Informe (Log10)
Tiempo 1 (Día 1)	<i>Pseudomonas</i> sp. UA1525	10 ⁻²	19	15	2.1x10 ⁴ UCF/cm ²	4.32
		10 ⁻³	1	0		
	Control sin inoculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	0
		10 ⁻²	0	0		

Tiempo 2 (Día 3)	<i>Pseudomonas</i> sp. UA1525	10 ⁻¹	10	8	1.1x10 ³ UCF/cm ²	3.05
		10 ⁻²	0	0		
	Control sin inóculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	0
		10 ⁻²	0	0		
Tiempo 3 (Día 5)	<i>Pseudomonas</i> sp. UA1525	10 ⁻¹	6	3	6.2x10 ² UCF/cm ²	2.79
		10 ⁻²	0	0		
	Control sin inóculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	0
		10 ⁻²	0	0		
Tiempo 4 (Día 8)	<i>Pseudomonas</i> sp. UA1525	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	0
		10 ⁻²	0	0		
	Control sin inóculo (ADE)	10 ⁻¹	0	0	0 UCF/cm ²	0
		10 ⁻²	0	0		

Los recuentos por duplicado de cada dilución analizada que correspondieron a cada uno de los tiempos de análisis, se promediaron para posteriormente multiplicarlo por el inverso de su dilución, multiplicando este por 5 y dividiéndolo en 4, de esta manera, se hizo la relación de los recuentos en placa a partir de las células contenidas en la superficie de los 4 tejidos, cada uno de un cm² suspendidos en 5 ml de ADE para informar en UCF/cm² (Fuente: Autor).