

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

Angie Natalia Pereira Bazurdo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2021

Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

Angie Natalia Pereira Bazurdo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Biotecnología

Directora:

Ph.D, Bacterióloga, Claudia Ximena Moreno Herrera

Codirector:

Ph.D, Rafael Eduardo Arango Isaza

Línea de Investigación:

Bioprospección

Grupo de Investigación:

Microbiodiversidad y Bioprospección MICROBIOP

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2021

Dedicatoria

A mis padres, que me han impulsado a ser mejor cada día, siempre me han apoyado y me han dado lo mejor de ellos, espero seguir siendo su orgullo siempre.

A mi familia porque cada uno de ellos me ha apoyado de formas distintas y siempre me hacen sentir su amor e incondicionalidad.

A Rubén por que su compañía ha sido incondicional en este proceso, gracias por tu amor y la felicidad que irradas a diario.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he hecho su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Angie Natalia Pereira Bazarro

Fecha 21/03/2021

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que conocí durante este proceso, primero agradecer a la profesora Claudia Ximena Moreno por aceptar dirigir esta tesis y apoyarme profesional y personalmente. Al grupo de investigación MICROBIOP, donde siempre aprendí algo nuevo y conocí personas maravillosas.

También agradezco al profesor Rafael Arango por codirigir la tesis y aportar a ella, su experiencia y conocimiento. A las profesoras Gloria Cadavid, por sus asesorías y recomendaciones sobre el proyecto y Clara Saldamando por su apoyo en la financiación del desarrollo de este proyecto.

Al laboratorio de Separaciones Químicas por permitir el uso del rotaevaporador y de las luces UV y verde, al laboratorio de Bioprocesos también por permitir el uso del rotaevaporador en varias ocasiones. A la profesora Sara Robledo y Jorge Higueta del PECET, Universidad de Antioquia por la orientación y ayuda con el procesamiento de las muestras en UHPLC/MS.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología molecular y celular, que más que compañeros y colegas fueron amigos, gracias por todos los aportes profesionales y personales.

Finalmente me gustaría agradecer a la Universidad Nacional de Colombia y Colciencias por el apoyo económico que me brindaron para la realización de la tesis y mi crecimiento profesional.

Resumen

El control de plagas y enfermedades del aguacate depende en gran medida del uso de pesticidas. Nuevas alternativas de control, tales como el uso de sustancias bioactivas inhibidoras contra fitopatógenos producidas por microorganismos, brindan una opción viable para contrarrestar las pérdidas por plagas y enfermedades. La exploración de nuevas fuentes de microorganismos se ha ampliado a especies que no habían sido consideradas. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la capacidad antagonista *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos y la producción de moléculas de señalización 'Quórum Sensing' (QS) en cepas bacterianas aisladas de trips de aguacate. La actividad antagonista de diez aislados bacterianos fueron seleccionadas y evaluadas contra siete fitopatógenos (hongos, oomiceto y bacterias) por cultivo dual, difusión y ensayo en placa; las moléculas de señalización (QS) producidas por las cepas Gram negativas se detectaron a través de bioensayo con placas de cromatografía fina (TLC) y biosensores bacterianos específicos (psB401, psB1142 y pqsA-lux). Las pruebas de cultivo dual mostraron que cuatro cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pantoea*, y *Serratia*, antagonizaron la mayoría de los hongos y el oomiceto, limitando el normal crecimiento de las colonias y generando zonas de inhibición. Adicionalmente, a través de biosensores se detectaron moléculas AHL y AHQ como 3-Oxo-C12-HSL(OdDHL), 3-Oxo-C6-HSL (OHHL) y 2-heptil-4-quinolona (HHQ). Trazas de OdDHL y HHQ, y el hallazgo de dos ciclopéptidos Ciclo(L-Phe-L-Pro) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) por Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento y Espectrometría de Masas (UHPLC/MS) en los extractos de las cepas Gram negativas, podrían explicar la actividad antifúngica detectada en las dos cepas de *Pantoea* sp., y *Serratia* sp., ya que estas moléculas se caracterizan por estar relacionadas con los sistemas de QS y poseen una variedad amplia de actividad biológica. Hasta donde sabemos, este sería uno de los primeros reportes sobre el potencial antagonista y la detección de moléculas de señalización QS en cepas aisladas de trips de aguacate.

Palabras clave: Actividad antifúngica, actividad antibacteriana, AHLs, Diketopiperazinas

Abstract

Characterization of bacterial strains obtained from thrips (Thysanoptera: Thripidae) that affect avocado crops (*Persea americana* Mill) in Antioquia: Antagonist activity and Quorum Sensing.

The control of avocado pests and diseases depends largely on the use of various types of pesticides, most of which are either strictly monitored or not accepted internationally. New alternatives such as inhibitory bioactive substances against phytopathogens produced by microorganisms provide an excellent alternative for the biocontrol of pests and diseases, and the exploration of new sources of these microorganisms has been extended to organisms previously not considered. This study aims to characterize the antagonistic capacity *in vitro* against phytopathogenic microorganisms and the production of Quorum Sensing (QS) signaling molecules from bacterial strains isolated from avocado thrips. The antagonist activity of ten bacterial isolates of thrips was evaluated against seven phytopathogens (fungi, oomycetes, and bacteria) by dual culture, diffusion, and plate assay; signaling molecules (QS) produced by Gram negative strains were detected through bioassay with fine chromatography plates (TLC) and specific bacterial biosensors (psB401, psB1142 and pqsA-lux). Dual culture tests showed that four strains belonging to the genera *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., and *Serratia* sp., antagonized most of the fungi and the oomycete, limiting the normal growth of the hyphae and generating zones of inhibition. Additionally, AHL and AHQ molecules such as 3-Oxo-C12-HSL (OdDHL), 3-Oxo-C6-HSL (OHHL), and 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) were detected through biosensors. Traces of OdDHL and HHQ, and the finding of two cyclopeptides Cycle(L-Phe-L-Pro) and Cycle(L-Pro-L-Tyr) by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC / MS) in the extracts of the Gram negative strains could explain the antifungal activity detected in the two strains of *Pantoea* sp., and *Serratia* sp., since these molecules are characterized by being related to QS systems and possess a variety of biological activities including antimicrobial. To our knowledge, this would be one of the first reports on the antagonistic potential and the detection of QS signaling molecules in isolated strains of avocado thrips.

Keywords: Antifungal activity, antibacterial activity, AHL's, Diketopiperazines

Contenido	Página.
Resumen	6
Lista de figuras	11
Lista de tablas	12
Lista de Símbolos y abreviaturas	13
Capítulo 1	14
Introducción	14
Marco teórico.....	17
1. Aguacate	17
1.1 Variedad Hass:	18
2. Trips	19
3. Relación Microbiota-Insecto.....	20
4. Actividad antagonista.....	23
4.1 Actividad antimicrobiana:	25
4.1.1 Actividad antibacteriana	25
5. Quorum sensing	25
5.1.Mecanismos QS en Bacterias Gram negativas.....	26
5.2.Mecanismos QS en Bacterias Gram positivas	27
6. Objetivos.....	30
7. Hipótesis.....	31
Capítulo 2. Evaluar la actividad antagónica <i>in vitro</i> de bacterias aisladas de trips contra hongos y bacterias fitopatógenas del aguacate	32
1. Introducción	32
2. Materiales y métodos.....	33
2.1 Recolecta e identificación de trips.....	33
2.2 Aislamiento e identificación de bacterias de trips	34

2.3 Microorganismos	35
Evaluación de la actividad antagonista <i>in vitro</i>	35
2.4 Tamizaje y selección de cepas con actividad antifúngica.....	36
2.4.1 Método de difusión en agar	36
2.5 Actividad antagonista <i>in vitro</i> contra hongos y oomicetos fitopatógenos por cultivos duales	37
2.5.1 Análisis estadístico	37
2.6 Actividad antagonista <i>in vitro</i> contra bacterias fitopatógenas	38
2.6.1 Detección con sensidisco	38
2.6.2 Determinación de la actividad antibacteriana de extractos libres de células por el método de ensayo en placa contra bacterias fitopatógenas	38
2.6.2.1 Obtención de sobrenadantes libres de células	38
2.6.2.2 Efecto del sobrenadante en el crecimiento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> y <i>Ralstonia</i> sp.	39
3. Resultados.....	40
3.1. Actividad antagonista <i>in vitro</i> contra hongos y oomicetos fitopatógenos por cultivos duales	40
3.2. Actividad antagonista <i>in vitro</i> contra bacterias fitopatógenas	45
4. Discusión	46

Capítulo 3. Detectar la presencia de moléculas quórum sensing (QS) en bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate. 53

1. Introducción	53
2. Materiales y métodos.....	55
2.1. Detección de moléculas de Quorum Sensing (QS) en bacterias Gram negativas	55
2.1.1. Preparación de cultivos bacterianos.....	55
2.1.2. Extracción de AHLs de cultivos bacterianos.....	55
2.1.3. Extracción del sobrenadante	55
2.1.4. Moléculas estándar y cepas biosensores	56
2.1.5. Corrida de las muestras en Cromatografía de capa fina (TLC)	57
2.1.6. Detección con biosensor de moléculas QS en placa TLC.....	57
2.1.7. Caracterización de las moléculas de interés por UHPLC/MS.....	58

10 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

2.2. Análisis químico de las moléculas producidas por las bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate.....	58
2.2.1. Análisis del listado de espectros por compuesto.....	58
3. Resultados.....	59
3.1. Detección moléculas de Quorum Sensing (QS) en bacterias Gram negativas usando bioreporteros	59
3.2. Análisis químico de las moléculas producidas por las bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate.....	63
4. Discusión.....	69
Conclusiones y recomendaciones.....	77
Anexos Capítulo 1	79
Productos asociados	83
Bibliografía	85

Lista de figuras	Página.
Figura 1. Fotografía de trips.....	19
Figura 2. Sistema Quorum sensing en <i>Vibrio fischeri</i> ; triangulos rojos representan autoinductores producidos por Lux I.....	27
Figura 3. Sistema regulatorio Quórum sensing de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Figura 4. Descripción grafica del procedimiento realizado para la evaluación de actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos <i>in vitro</i>	37
Figura 5. Esquema diseño ensayo en placa para la evaluación del efecto los sobrenadantes libres de células en el crecimiento de <i>X. axonopodis</i> y <i>Ralstonia</i> sp.....	39
Figura 6. Cultivos duales en medio PDA.....	42
Figura 7. Microscopia de los hongos fitopatógenos evaluado en cultivo dual..	43
Figura 8. Efecto de sobrenadantes bacterianos en el crecimiento de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	46
Figura 9. Detección moléculas odDHL.....	60
Figura 10. Moléculas AHL y AHQ detectadas por bioluminiscencia en cepas Gramnegativas aisladas de trips mediante Cromatografía de Capa Fina-TLC.....	61
Figura 11. Espectros de masas compatibles con las moléculas estándar de AHL y AHQ obtenidos mediante UHPLC-MRM-MS en la muestra T8H6.	62
Figura 12. Espectros de masas correspondientes a la molécula Ciclo(L-Phe-L-Pro) obtenida en los extractos bacterianos de las cepas Gram negativas UHPLC/ MS.....	63
Figura 13. Patrón reportado en base de datos PubChem y ReSpect.....	65
Figura 14. Espectros de masas correspondientes a la molécula Ciclo(L-Pro-L-Tyr) obtenida en los extractos bacterianos de las cepas Gram negativas UHPLC/ MS.....	66
Figura 15. Patrón de fragmentación Ciclo(L-Pro-L-Tyr) obtenido por UHPLC/MS en la muestra T6H1 por MetFrag.	68

- 12 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing
-

Lista de tablas

Página.

Tabla 1. Bacterias aisladas de trips colectados en cultivos de aguacate Hass en el oriente del departamento de Antioquia.....	34
Tabla 2. Composición química del medio para el mantenimiento y crecimiento de <i>Ralstonia</i> sp.	35
Tabla 3. Actividad antagonista de bacterias aisladas frente a hongos y oomiceto fitopatógenos.....	41
Tabla 4. Pruebas actividad antibacteriana por sensidisco y ensayo en placa.....	45
Tabla 5. Listado de moléculas sintéticas QS y biosensores utilizados en bioensayos de detección en TLC y UHPLC-MS.	57
Tabla 6. Detección de moléculas Quorum Sensing AHL y AHQ con biosensores y valores de migración (Rf) de cada molécula en placas de TLC.....	60
Tabla 7. Moléculas identificadas en la base de datos KEGG.	63

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
μ	Micro	10^{-6}

Abreviaturas

Abreviatura	Término
QS	Quórum Sensing
AHL	N-acil homoserin lactona
AIP	Péptidos autoinductores
PQS	2-heptil-3,4-dihidroxiquinolina
HHQ	4-hidroxi-2-heptilquinolina
OHHL	N-3-oxo-hexanoil homoserina lactona
OdDHL	N - 3-oxododecanoil homoserina lactona
HAQ	4-hidroxi-2-alkilquinolinas
ACB	Agentes de control biológico
CB	Control biológico
UFC	Unidades formadoras de Colonia
min	Minuto
g	Gravedades
rpm	Revoluciones por Minuto
DKP	Diketopiperazina
UHPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
TLC	Thin Layer Chromatography
Rf	Patrón de migración

Capítulo 1

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una fruta tropical originaria de Centro América; desde este punto los cultivos se han logrado dispersar hacia los EE. UU., Islas del caribe, y a una gran parte de Sudamérica, como Colombia, Venezuela, Las Guyanas, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, países que se encuentran entre los principales productores (Sánchez-Pérez 1999). La alta demanda de aguacate a nivel mundial se atribuye a sus propiedades nutricionales, pues es rico en vitaminas, minerales, proteínas y fibras, así como altas concentraciones de ácidos grasos insaturados beneficiosos para la salud humana (Tremocoldi et al., 2018; Vallejo Pérez, Téliz Ortiz, De La Torre Almaraz, López Martínez, & Nieto Ángel, 2017), por lo que las plantaciones han aumentado significativamente en los últimos años (Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), 2012). En 2016 la producción mundial de aguacate fue de 5'567,044 toneladas, mientras en el 2019 fue de 7'179,689 toneladas, lo que significa un aumento de 28.9% en un periodo de 3 años (FAO 2021). El principal productor de aguacate a nivel mundial es México, que para el 2019, aportó el 13.39% de la producción total (FAO 2021).

En Colombia la producción para el 2019 fue de 535.021 toneladas, correspondiente al 7.45% de la producción mundial, ocupando el cuarto puesto entre los principales países productores de aguacate, después de México, República Dominicana y Perú (FAO 2021). La producción de aguacate en Colombia ha aumentado 21% durante los años 2012 a 2016, al igual que el área cosechada con un área total de 35.114 hectáreas. En los últimos años Colombia redireccionó su producción con el propósito exportar la variedad de aguacate Hass que tienen más demanda internacionalmente (Camara de Comercio de Medellín, 2012)

En el 2019 Colombia exportó 180.00 toneladas de aguacate. Los principales países a los que Colombia exporta es Holanda (40.1%), Reino Unido (18%), España (11.2%) y Bélgica

15 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

(5.9%). El 24.81% restante se divide entre otros países europeos como Francia, Alemania e Italia, además de un pequeño porcentaje a Panamá, Estados Unidos, Canadá, China, Costa Rica y Perú (Observatory of Economic Complexity, 2019).

La producción de este cultivo se caracteriza por ser variado al crecer en áreas con diferentes condiciones, dependiendo de la variedad, lo que también los hace más vulnerables al ataque de plagas y por ende enfermedades, las cuales constituyen uno de los factores que más repercuten en la producción, afectando los rendimientos y la calidad del árbol y el fruto, incrementando los costos de producción y obligando al uso de insumos que pueden afectar el ambiente (Arévalo, Quintero, & Correa, 2003; Retana et al., 2010; Soto-Rodríguez et al., 2017).

Existen diversos insectos plaga que afectan los cultivos de aguacate y se pueden dividir en barrendadores (*Stenoma catenifer*, *Heilipus lauri*, *Heilipus trifasciatus*, entre otros) y chupadores o perforadores (trips, Chinche manchador del fruto) (ICA, 2012; Varón, 2015). Entre los insectos anteriormente descritos, uno de los de mayor importancia por sus características fitófagas y su capacidad de transmitir virus en los cultivos de aguacate, son los tisanópteros (trips) los cuales ocasionan lesiones en los frutos pequeños cuando se alimentan, y estas lesiones se presentan como protuberancias en la superficie del fruto y la pérdida de coloración, los daños son más evidentes cuando los frutos maduran (ICA, 2012; Retana et al., 2010; Tamayo Molano, 2007). Aunque en Colombia aún no se han desarrollado muchas investigaciones sobre las especies de tisanópteros existentes y de sus plantas hospederas, se han realizado algunos estudios describiendo especies en los cultivos de aguacate (Arévalo et al., 2003; Retana et al., 2010). Un estudio reciente llevado a cabo por Cano-Calle, (2020), reportó siete especies de trips en el aguacate del oriente antioqueño, *Frankliniella gardeniae*, *F. gossypiana*, *F. panamensis*, *Microcephalothrips abdominalis*, *Thrips palmi*, *Scirtothrips hansonii* y *Liothrips perseae*.

Conocer la diversidad de especies de tisanópteros presentes en las plantaciones aguacate es necesaria ya que las prácticas fitosanitarias utilizadas para su manejo y control generan un impacto económico para los cultivadores además de las dificultades postcosecha por deterioro en la calidad de los frutos y restricciones de los países importadores (Soto-Rodríguez et al., 2017). En algunos cultivos se utilizan insecticidas para el control de trips

cuando los métodos de control de plagas menos riesgosos no están funcionando (Byrne et al., 2010; ICA, 2012).

Actualmente se están buscando nuevos métodos para el control biológico de plagas de importancia económica para la agricultura, por lo que se están considerando las comunidades microbianas que viven en simbiosis con un huésped, como por ejemplo la de insectos, que ha empezado a tener mayor relevancia, estas relaciones se vienen estudiando al ser una nueva perspectiva en las exploraciones biotecnológicas, porque la caracterización de esta microbiota en insectos de interés ha permitido encontrar nuevas fuentes de moléculas bioactivas con capacidades antimicrobianas, insecticidas y/o capaces de influir en el desarrollo del mismo huésped (de Kievit & Iglewski, 2002; De Almeida et al., 2017; Zhao et al., 2018).

Estudios previos han demostrado que las comunidades microbianas asociadas a insectos están relacionados con bacterias de la rizosfera, la filosfera (carposfera) y el suelo, sugiriendo una posible interacción entre el insecto fitófago, la planta huésped y las comunidades microbianas presentes (Indiragandhi et al., 2008). Las actividades antimicrobianas que estas comunidades han resultado ser de gran interés, teniendo en cuenta los numerosos beneficios que brindan en la supresión de microorganismos fitopatógenos como hongos y bacterias, lo que se definiría como control biológico, al utilizar diversos mecanismos antagonistas, esto ha sido muy importante en el manejo integrado de diversos cultivos, especialmente en la postcosecha, donde también se destaca por el control de enfermedades causadas por fitopatógenos (Carmona-Hernandez et al., 2019).

La presencia de insectos plaga dependiendo de la severidad de daños que ocasionan o su importancia cuarentenaria en países importadores y enfermedades en los frutos de aguacate Hass, son las principales limitantes en la aceptabilidad de estos frutos para exportación; por lo tanto, es necesario formular e implementar estrategias de manejo de plagas durante el proceso de producción, para ello se deben ampliar los conocimientos para plantear un control efectivo. El presente trabajo propone estudiar bacterias aisladas del insecto plaga *Frankliniella* spp., y *Scirtothrips hansonii*, recolectados en plantaciones de aguacate en el oriente de Antioquia, Colombia, para determinar su capacidad antagónica contra microorganismos fitopatógenos, y detectar e identificar moléculas de señalización QS, que conllevan a la regulación de características fenotípicas específicas y que permitan

desarrollar a futuro nuevas estrategias para el control de microorganismos fitopatógenos de gran importancia a nivel agrícola.

Marco teórico

1. Aguacate

El aguacate es una planta que pertenece a la familia Lauraceae, y el orden Laurales, típica de los climas tropicales o subtropicales, originaria de México y Centro América, su género es *Persea*, que a su vez se divide en tres subgéneros diferentes que incluyen más de 150 especies: *Persea* (solo 2 especies, *P. americana* y *P. schiedeana*), *Eriodaphne* (cerca de 70 especies, como *P. caerulea*, *P. indica* y *P. lingue*, entre otros), y *Machilus* (incluyendo alrededor de 80 especies, tales como *P. japonica*, *P. kobu*). La especie más relevante y ampliamente estudiada del subgénero *Persea* es *Persea americana*, su fruto es el aguacate y está es la fruta más importante al ser el único comestible de la familia que tiene un alto valor comercial (Araújo et al., 2018; Hurtado et al., 2018).

El árbol del aguacate se caracteriza por ser frondoso, perenne y alcanza alturas de aproximadamente 20 metros, cada uno de estos puede producir hasta un millón de flores, sin embargo, solo una de cada mil flores logra convertirse en fruto. Un árbol puede producir alrededor de mil aguacates en un año. Por lo general, después de sembrados los árboles de aguacate se necesitan cinco años para obtener la primera cosecha (Araújo et al., 2018; Zafar & Sidhu, 2011). El árbol de aguacate puede crecer en áreas con diferentes condiciones climáticas dependiendo de la variedad; con condiciones de invierno suave; climas secos subtropicales y mediterráneos; y áreas tropicales frías y de gran altitud, pero no bajo condiciones desérticas (Zafar & Sidhu, 2011).

Dentro de *P. americana*, es posible diferenciar tres razas ecológicamente diferentes: mexicana, guatemalteca y antillana, cada raza exhibe características que son típicas en términos de hojas, frutos, período de floración, etc. (Hurtado et al., 2018). Entre estas razas no hay una barrera de esterilidad porque las tres pertenecen a la especie *P. americana*, y, por ende, la fertilización se puede dar entre estos árboles. La mayoría de los cultivares comerciales de aguacate son híbridos interraciales guatemaltecos con mexicanos con

diferentes grados de hibridación, entre los más reconocidos están las variedades 'Hass', 'Bacon' y 'Fuerte' (Alcaraz & Hormaza, 2007; Hurtado et al., 2018).

1.1 Variedad Hass:

La variedad Hass fue patentada en 1935 por Rudolph Hass, en Habra Heights, California. Es una variedad que tiene una excelente calidad de frutos, alto rendimiento y lenta maduración, en comparación con otras variedades. Esta variedad tiene predominancia de la raza guatemalteca y en una baja proporción la raza mexicana, lo que le confiere características de adaptación a condiciones subtropicales, con temperaturas de 5 a 19 °C y alturas entre los 1.800 y 2.000 msnm (ICA, 2012).

Sus frutos se caracterizan por ser esféricos u ovalados con corteza gruesa, la pulpa es cremosa sin fibra y la semilla es pequeña. A diferencia de las otras variedades de acuerdo con el estado de madurez, presenta un color que va desde verde opaco hasta morado oscuro. El árbol puede retener los frutos hasta por 6 meses posterior a su madurez fisiológica, sin perder la calidad de este (ICA, 2012; Whiley et al., 2002). Teniendo en cuenta que la corteza del aguacate variedad Hass es gruesa esto ha facilitado su proceso de exportación al proteger el contenido mucho mejor que las demás variedades.

Las plantaciones de aguacate se enfrentan a varias limitaciones en su producción y competitividad debido a diferentes factores que lo afectan tal como el bajo desarrollo tecnológico, deficiencias en los canales de comercialización y admisibilidad de frutos en fresco para exportación por bajas en los estándares de calidad algunas veces por deficiencias en el control fitosanitario, lo que implica un mejoramiento en el manejo del cultivo, tal como las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), ya que conocer los estados fenológicos del cultivo más susceptibles al ataque de plagas y desarrollo e enfermedades, permitirá determinar la correcta ubicación, las condiciones óptimas del clima y el suelo, durante el proceso de producción.

Los barrenadores, ácaros y trips, son los insectos plaga que tienen un mayor impacto económico debido a las prácticas fitosanitarias aplicadas para su manejo y control. Por ello, es necesario determinar el umbral y nivel de daño económico para poder establecer una mejor estrategia de manejo (ICA, 2012).

2. Trips

Insectos que constituyen el orden Thysanoptera, comprenden más de 6000 especies descritas (Figura 1), este orden se encuentra dividido en 2 subordenes denominados Tubulifera y Terebrantia, el primero incluye una sola familia Phlaeothripidae, con alrededor de 3500 especies descritas; mientras el segundo comprende alrededor de 2400 especies ocho familias, entre las familias, la denominada Thripidae incluye alrededor de 2000 especies, los cuales se conocen como “trips” (Mound & Morris, 2007; Lima & Mound, 2016).

Figura 1. Fotografía de trips recolectados en plantaciones de aguacate en el oriente de Antioquia, Colombia. A: *Frankliniella gardeniae*/*Frankliniella gossypiana*, B: *Scirtothrips hansonii*. Fuente: (Cano-Calle, 2020)



Las especies descritas tienen un tamaño promedio de 1-3 mm con algunas excepciones extremas dentro de Tubulifera, se pueden encontrar de diferentes colores como amarillo, café y negro, dependiendo de la especie; su desarrollo se da de manera postembrionaria en seis etapas que se dan en un periodo de aproximadamente 30 días: huevo, dos estadios larvales, dos estadios de pupa (prepupa y pupa) y adulto; en los estadios larvales suelen tener mayor actividad, alimentándose y generando mayores daños, pues tienen partes bucales asimétricas únicas que involucran solo una mandíbula las cuales utilizan para

alimentarse y vaciar por completo el contenido de las células epidérmicas y mesófilas de la hoja y/o los frutos (Buckman et al., 2012; Rotenberg et al., 2015; Wu et al., 2018).

De las 6000 especies reconocidas de este orden, solo el 1% son plagas económicamente importantes a nivel mundial, la literatura reporta a *F. occidentalis*, *Thrips tabaci*, *T. palmi* y *Scirtothrips dorsalis*, como las más relevantes que causan daños por alimentación y por ser vectores de tospovirus; estos insectos poseen un conjunto de características biológicas como un tamaño pequeño, tiempos de desarrollo cortos, tasa reproductiva alta, y una amplia preferencia por diversas plantas (polifagia), lo que les permite prosperar como plaga (Rotenberg et al., 2015; Wu et al., 2018).

En Colombia, particularmente en los departamentos de Risaralda y Caldas, se identificaron morfológicamente las siguientes especies de trips: *Selenothrips rubrocinctus* Giard, *Frankliniella gardeniae* Moulton, *Leptothrips* sp., *Karnyothrips* sp. (Echeverri Florez, Loaiza Marín, & Cano Ortiz, 2004). En un trabajo posterior sobre las especies de trips asociadas al cultivo de aguacate en el departamento de Antioquia, en el que se utilizaron claves taxonómicas y la secuenciación del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI), permitió identificar siete especies en este cultivo, una de las especies más abundantes fue *Frankliniella gardeniae*, considerándose el insecto que más afecta el aguacate en Antioquia, la segunda especie más predominante fue *Scirtothrips hansonii*, seguido de *Frankliniella gossypiana*, *Frankliniella panamensis*, *Thrips palmi*, *Microcephalothrips abdominalis* y *Liothrips perseae* (Cano Calle, 2020; Cano Calle et al., 2021).

3. Relación Microbiota-Insecto

Diversos estudios se han enfocado en la relación que pueden tener los insectos con su microbiota en especial la intestinal, los microorganismos se encuentran asociados a una amplia variedad de insectos, y estas asociaciones permanentes se les puede llamar simbiosis, pero el tipo (mutualismo, comensalismo o parasitismo), dependerá del huésped, el simbiote y las condiciones ambientales (de Vries et al., 2008); esta microbiota cumple diferentes funciones en el insecto, como por ejemplo aportar resistencia ante el ataque de entomófagos, así lo reportaron dos estudios hechos con insectos pertenecientes a la familia de los áfidos, también conocidos como pulgones, donde la infección con endosimbiontes bacterianos confirió resistencia frente al ataque de parasitoides como *Aphidius ervi* y *Aphidius colemani* (Oliver et al., 2005; Vorburger et al., 2010), y

21 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

entomopatógenos donde la presencia de ciertos endosimbiontes bacterianos también proporciona resistencia en pulgones y moscas de la fruta, frente a especies patógenas de hongos y nematodos, inhibiendo su crecimiento dentro del insecto (Jaenike, Unckless, Cockburn, Boelio, & Perlman, 2010; Scarborough, Ferrari, & Godfray, 2005), también influyen en la selección de la planta hospedadora y la detoxificación ante compuestos producidos por la planta como mecanismo de defensa (De Almeida et al., 2017).

Los insectos son responsables de pérdidas masivas en la agricultura y también son los principales polinizadores de cultivos alimenticios, y su microbiota asociada tiene un efecto en el impacto positivo o negativo que estos tendrán sobre los cultivos; al igual con los insectos vectores de patógenos, los microorganismos simbióticos pueden influir significativamente en su eficiencia como vector, incluso muchos de los ecosistemas naturales dependen básicamente de los insectos y las comunidades microbianas que lo componen, ya que funcionan como intermediarios en algunos ciclos biogeoquímicos; por ejemplo, el ciclo del carbono, en las tasas de fijación y el ciclo del nitrógeno (Engel & Moran, 2013).

Como se mencionó anteriormente a las asociaciones permanentes entre microorganismos y huésped se les puede llamar simbiosis, pero el tipo, dependerá de diversos factores que determinarán cuán positiva o negativa puede ser, por ejemplo, en algunos insectos del orden Homoptera, se da una simbiosis mutualista con la bacteria *Buchnera aphidicola* que se ubica en un tejido específico cerca del intestino del insecto aportándole nutrientes esenciales (de Vries et al., 2008); por otro lado el parasitismo que se da entre algunos artrópodos y la bacteria del género *Wolbachia*, ubicada en tejidos reproductivos, interfiriendo en la reproducción de su hospedador, provocando inducción de la partenogénesis, feminización, muerte de los machos e incompatibilidad citoplasmática (de Vries et al., 2008; Sanaei, Charlat, & Engelstädter, 2021).

Las relaciones simbióticas han venido evolucionando a través del tiempo e independientemente de la naturaleza de la asociación, el éxito de estas depende de una interacción entre los simbiotes bacterianos y sus hospedadores, por lo que muchas bacterias simbióticas han desarrollado una preferencia por colonizar tejidos o células especializados de insectos, donde alcanzan densidades de infección extremadamente

altas. Esto se observa más frecuentemente en los simbioses obligados, que generalmente se encuentran exclusivamente en órganos especializados denominados bacteriomas (Baumann, 2005; Zientz et al., 2004), colonizaciones que conducen probablemente a que estas relaciones estrechas brinden beneficios fisiológicos para ambos participantes de la asociación (Pontes et al., 2008; Enomoto et al., 2017).

Así lo demuestran estudios previos, en los que se logró determinar que la bacteria *Sodalis glossinidius* un endosimbionte, utiliza un sistema de detección de QS basado en AHL para modular la expresión génica de acuerdo con la densidad celular, desempeñando un papel importante en la regulación de la expresión génica bacteriana durante la simbiosis. En este proceso se evidenció un incremento en la expresión de genes involucrados en la respuesta celular al estrés oxidativo, como *oxyR* involucrado en la síntesis de proteínas asociados en la desintoxicación directa de las ROS (Especies reactivas de oxígeno), como por ejemplo catalasa, peroxidasa, entre otras; y genes que codifican para la producción de proteínas involucradas en la reparación de componentes celulares después de un daño mediado por ROS (Pontes et al., 2008).

En una investigación reciente en la que se estudió la interacción de *Sodalis praecaptivus* con el huésped *Sitophilus zeamais*; se encontró que este microorganismo posee diversos genes asociados a la patogénesis en insectos como homólogos de la toxina insecticida PirAB, gen que codifican por quitinasas, proteínas que contienen el dominio de unión a quitina y proteasas similares a la colagenasa; sin embargo, muchos de estos se vieron reprimidos tras la expresión de moléculas OHHL (3-oxo-hexanoil homoserin lactona) en un sistema de QS; la atenuación de la virulencia en un patógeno es una adaptación importante, porque la virulencia disminuye la aptitud física del hospedador y, por lo tanto, reduce la probabilidad de una dispersión exitosa del patógeno, para ello, el sistema QS en *S. praecaptivus* actúa para mejorar la capacidad de esta bacteria y así mantener una infección prolongada en un insecto huésped (Enomoto et al., 2017).

Estas relaciones se han estudiado ampliamente ya que proponen una nueva perspectiva en las exploraciones biotecnológicas, cuando se conoce la microbiota que hace parte de los insectos de interés, permitiría el desarrollo de nuevas estrategias para el control de este y de otros insectos vectores de fitopatógenos; además, esta microbiota puede ser capaz de producir moléculas antimicrobianas e insecticidas, u otras capaces de manipular el comportamiento de insectos (De Almeida et al., 2017).

4. Actividad antagonista

En la búsqueda de alternativas para el control de plagas y enfermedades en cultivos de interés económico, se ha dado la búsqueda de agentes de control biológico, tal como microorganismos capaces de desarrollar un efecto antagonista ante patógenos, produciendo metabolitos que pueden interferir o detener el desarrollo de estos, mediante antibiosis, producción de enzimas líticas, competencia por nutrientes y espacio, entre otros (Hernández-Lauzardo et al., 2007; Cabra, Rodriguez, & Villota, 2014).

Esta búsqueda de microorganismos potenciales como agentes de control biológico, ha llevado a los investigadores a tener en cuenta nuevas fuentes de los mismos, principalmente en organismos antes no considerados, caso particular el estudio realizado por Indiragandhi et al. (2008), quienes aislaron cepas bacterianas del tracto digestivo del insecto plaga *Plutella xylostella*, las cuales mostraron la capacidad de promover el crecimiento vegetal y algunas cepas especialmente del género *Pseudomonas*, mostraron actividad inhibitoria frente algunas especies de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* sp., y *Sclerotinia* sp. También se reportó el aislamiento de bacterias del género *Xenorhabdus* de un nematodo entomopatógeno (*Steinernema carpocapsae*), las cuales fueron capaces de controlar el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, un fitopatógeno importante que afecta diversos cultivos (Inam-UI-Haq et al., 2007).

Las especies fúngicas y bacterianas fitopatógenas son ampliamente estudiadas como modelo en procesos de antagonismo, pues son los responsables de grandes pérdidas en diversos cultivos y el desarrollo de enfermedades que en su mayoría se vuelven difíciles de manejar. Especies como *Colletotrichum gleosporoides* son frecuentemente estudiados por causar la enfermedad conocida como antracnosis que suele resultar en pérdidas superiores al 50% de diversos cultivos especialmente los de aguacate (Gañán, Álvarez, & Castaño Zapata, 2015; Guerrero-Barajas et al., 2020), las especies fúngicas de los géneros *Cylindrocladium*, *Fusarium* y el oomiceto *Phytophthora* ., se han asociado principalmente con daños en las raíces y el tallo del aguacate, por ser las causantes del Marchitamiento y muerte de árboles en este y otros cultivos (Gil, Sánchez & Osorio 2014).

Por otro lado, en cuanto a las bacterias fitopatógenas se han logrado clasificar algunas de las más importantes por la alta diversidad de posibles huéspedes y la gravedad de las

enfermedades que causan (El-Wakeil, Saleh & Abu-hashim 2020), *Ralstonia solanacearum*., se ha encontrado que afecta más de 200 tipos de cultivos invadiendo la planta hasta llegar al xilema lo cual va causando el marchitamiento de la planta hasta la muerte de la misma (El-Wakeil, Saleh & Abu-hashim 2020; de Pedro-Jové et al. 2021); otro grupo importante es el género *Xanthomonas*, en el cual se han descrito aproximadamente 20 especies, entre las que se encuentra *X. axonopodis*, cada especie suele tener huéspedes más específicos, incluso entre ellas se diferencian algunos patovares que muchas veces causan síntomas y enfermedades diferentes. *X. axonopodis* subsp. *citri* se caracteriza por afectar principalmente cultivos cítricos causando la enfermedad del chancro, afectando principalmente los frutos y así mismo su comercialización (El-Wakeil, Saleh & Abu-hashim 2020).

Si bien hay diversas especies tanto fúngicas como bacterianas de importancia a nivel económico por sus efectos negativos en diversos cultivos, se han venido estudiando ampliamente a nivel mundial microorganismos antagonistas capaces de inhibir estos fitopatógenos, pero la búsqueda de nuevos agentes de biocontrol continua pues se ha visto que muchas veces estos agentes van generando especificidad frente a un fitopatógeno (Guerrero-Barajas et al., 2020), lo que hace necesaria la constante búsqueda nuevas fuentes de moléculas bioactivas.

Los microorganismos con actividad antagonista han sido ampliamente utilizados en el campo de la agricultura como una estrategia de control biológico contra un patógeno de interés. Para ser considerados en el control biológico deben cumplir con una serie de características como la capacidad de colonizar la superficie de interés y mantenerse en ella por el mayor tiempo posible, tener habilidad de adquirir nutrientes en comparación con el patógeno y sobrevivir bajo condiciones ambientales, por otro lado el microorganismo antagonista debe tener unas características más específicas relacionadas con la estabilidad genética, efectividad contra un rango amplio de microorganismos y que tenga la capacidad de producir metabolitos secundarios fáciles de aplicar y que no causen daño a la salud humana o sobre el mismo hospedero, entre otras (Hernández-Lauzardo et al., 2007).

4.1 Actividad antimicrobiana:

Esta actividad se refiere a la capacidad de producir sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que matan microorganismos o inhiben el crecimiento de estos, los antimicrobianos pueden actuar contra diversos tipos de microorganismos y dependiendo de esto se clasifican en: antibacteriales aquellos que actúan contra bacterias, antivirales contra virus, antifúngicos contra hongos y antiparasitarios contra parásitos, y su acción puede ser tanto microbiocida, que significa que los mata o biostáticos, es decir que solo inhiben el crecimiento (Das & Patra, 2017).

4.1.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana ha sido la principal actividad de biocontrol reportada en bacterias, teniendo en cuenta la necesidad de combatir bacterias patógenas en humanos, se han descrito varios métodos para evaluar esta actividad, los cuales buscan determinar la capacidad de inhibir el desarrollo de un microorganismo. Las pruebas de sensibilidad y resistencia antimicrobiana han sido ampliamente utilizadas para confirmar la selección de agentes antibacteriales o antimicrobianos, esta actividad se ha medido a través de diferentes métodos como macrodilución o dilución en tubo; sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas como la tediosa tarea manual de preparar las soluciones para cada prueba lo que aumenta la posibilidad de errores, por ende, la miniaturización de la técnica, conocida como microdilución en caldo, ha sido frecuentemente utilizada ya que es un método más práctico y reproducible, que ha permitido igualmente definir la concentración mínima inhibitoria (MIC) de agentes antibióticos o candidatos a ser agentes antimicrobianos (Reller et al., 2009; Lopes et al., 2012).

5. Quorum sensing

Quorum sensing (QS)- Moléculas señal es un fenómeno que se descubrió principalmente en las bacterias cuando la densidad de la población celular aumenta, las moléculas de señal específica alcanzan un umbral de concentración, induciendo aún más la señal, lo que lleva a un proceso de regulación génica que da como resultado un cambio en el comportamiento de la población (Boyen et al., 2009; Zhao et al., 2018). El QS fue descrito

por Nealson et al., (1970); cuando estudiaban el desarrollo de bioluminiscencia por la síntesis de luciferasa en proporción al crecimiento bacteriano, lo que denominaron como “autoinducción”; sin embargo el término fue mencionado por primera vez en una revisión realizada por Fuqua (1994), quienes estudiaron cómo la bacteria luminiscente marina *Vibrio fischeri* usa las proteínas LuxR y LuxI para la comunicación intercelular y luego describen homólogos de LuxR y LuxI en diversas especies bacterianas (Fuqua et al., 1994; S.-R. Kim & Yeon, 2018).

Posteriormente de estos estudios se han desencadenado diversas investigaciones dirigidas al conocimiento de este fenómeno, y los diferentes mecanismos utilizados por una gran variedad de microorganismos, en los que se ha logrado determinar que este fenómeno está asociado principalmente con mecanismos de regulación de genes para la formación de biopelículas, producción de enzimas y antimicrobianos, síntesis de factores de virulencia, motilidad y esporulación, entre otros (Boyen et al., 2009; Rosselló & Bouza, 2013; Kim & Yeon, 2018).

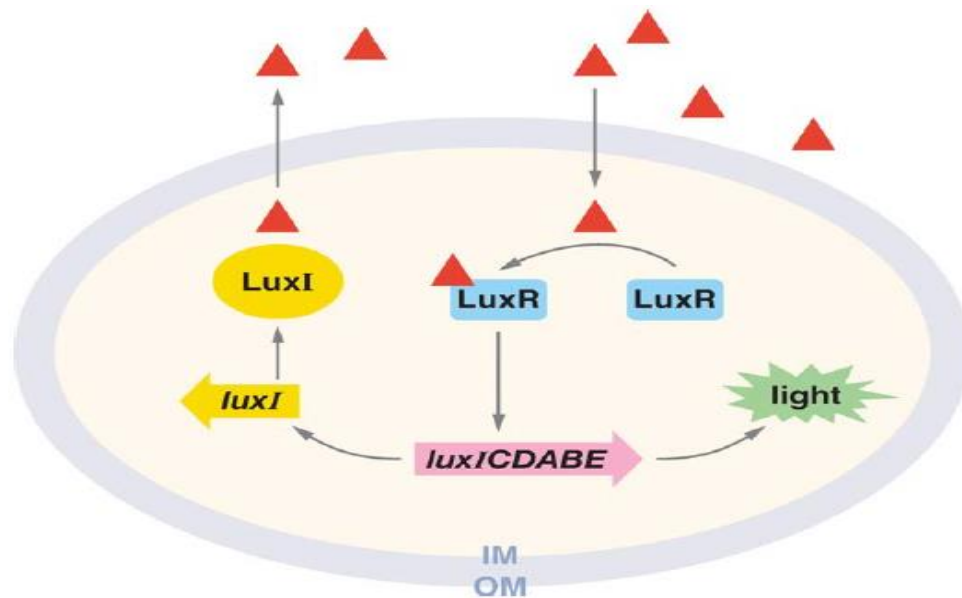
5.1. Mecanismos QS en Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas y sus mecanismos de QS han sido los más estudiados, en este sistema dos proteínas LuxI y LuxR son las encargadas de controlar la expresión del operón luciferasa (*luxICDABE*) necesario para la producción de luz, LuxI es el autoinductor sintasa, que produce el autoinductor las moléculas de señalización N-acil Homoserin Lactonas (AHL), y LuxR es el receptor autoinductor citoplasmático/activador transcripcional de unión al ADN. Después de la producción, la molécula AHL se difunde libremente dentro y fuera de la célula aumentando su concentración con el aumento de la densidad celular. Cuando la señal alcanza un umbral de concentración crítica, se une a LuxR y este complejo activa la transcripción del operón que codifica la luciferasa (Figura 2), creando así un ciclo que hace que toda la población produzca luz. Este sistema se ha homologado en otras bacterias Gram negativas y se ha visto que también controlan expresión fenotípica de una variedad de genes relacionados con la formación de biopelículas, producción de enzimas, antimicrobianos y factores de virulencia (Waters & Bassler, 2005).

Existen diferentes estructuras de las moléculas de señalización y de las proteínas reguladoras que varían dependiendo del microorganismo, en algunas bacterias Gram negativas ya se tienen bien identificados los sistemas de QS, como es el caso de

Pseudomonas aeruginosa, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella typhimurium*, entre otras, lo cual ha permitido entender cómo funcionan en una población y en comunidad (S.-R. Kim & Yeon, 2018).

Figura 2. Sistema Quorum sensing en *Vibrio fischeri*; triángulos rojos representan autoinductores producidos por Lux I. Fuente: Waters and Bassler 2005.

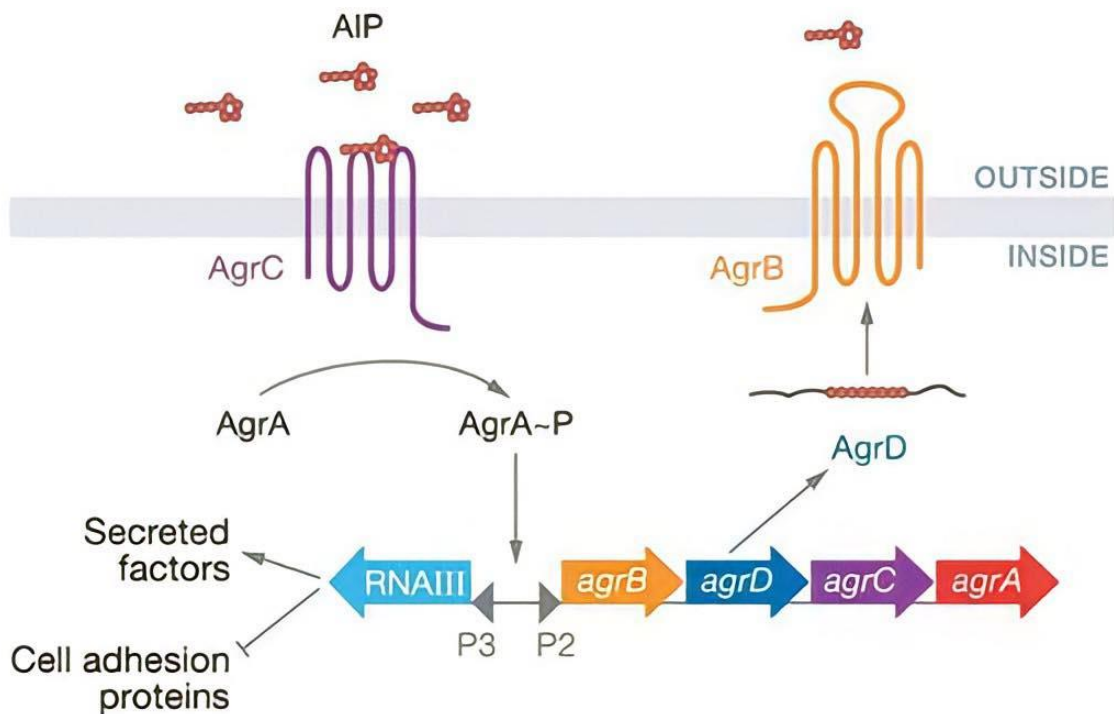


5.2. Mecanismos QS en Bacterias Gram positivas

En las bacterias Gram positivas, no se han observado sistemas análogos al de las Gram negativas, estas utilizan oligopéptidos autoinductores como molécula de señal, estos péptidos autoinductores (AIP) presentan una variedad de estructuras, pero generalmente constan de 5 a 17 aminoácidos y se sintetizan en los ribosomas, algunas veces pueden tener modificaciones posteriores a la traducción que se relacionan con su estabilidad y funcionalidad; los AIP son secretados de manera exógena, y cuando estos alcanzan un umbral de concentración, se unen a la proteína histidina quinasa ubicada en la membrana celular, las cuales a través de fosforilación, activan las proteínas reguladoras lo que les permite unirse al promotor del gen diana y dar inicio al proceso de transcripción (de Kievit & Iglewski, 2002; S.-R. Kim & Yeon, 2018).

En la Figura 3 se logra visualizar el sistema de señalización utilizado por una bacteria Gram positiva como *Staphylococcus aureus*, que suele estar regulado por el sistema de señalización QS Agr, este sistema se compone principalmente de péptidos autoinductores (AIP) codificados por *agrD* y un sistema regulatorio de respuesta de dos componentes (AgrC y AgrA). La proteína AgrB agrega la modificación del anillo de tiolactona a los AIP de *S. aureus* y luego lo libera. Cuando el AIP se une a AgrC se lleva a cabo un proceso de fosforilación de AgrA. AgrA-P induce la expresión ARNIII y del *agrBDCA*, esto da como resultado un aumento de los niveles de AIP, lo que garantiza que se dé un aumento en la densidad celular (Waters & Bassler 2005).

Figura 3. Sistema regulatorio Quórum sensing de *Staphylococcus aureus*. Fuente: Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria (Waters and Bassler 2005).



Este sistema de regulación se ha encontrado en muchas especies, tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus helveticus*. En estudios previos se han relacionado estos

29 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

sistemas de QS con la virulencia de *S. aureus* y el proceso de esporulación en *B. subtilis* (de Kievit & Iglewski, 2002; S.-R. Kim & Yeon, 2018).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Caracterizar la capacidad antagonista *in vitro* y de producción de moléculas de señalización Quórum sensing de cepas bacterianas asociadas a trips de aguacate contra fitopatógenos del aguacate.

6.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de bacterias aisladas de trips contra hongos y bacterias fitopatógenas del aguacate. (Capítulo 2)
- Detectar la presencia de moléculas quórum sensing (QS) en bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate. (Capítulo 3)
- Analizar químicamente las moléculas QS producidas por las bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate. (Capítulo 3)

7. Hipótesis

Dado que los trips del aguacate poseen una microbiota poco explorada; si estudiamos la potencial actividad de antagonismo microbiano teniendo en cuenta la problemática del control de fitopatógenos y/o sus mecanismos de señalización QS, ya que este sistema controla la expresión fenotípica de varios genes que dan como resultado el desarrollo de factores de virulencia, la producción de moléculas con una función específica o el trabajo conjunto de una población; se podría ampliar el conocimiento sobre nuevas bacterias con actividad biológica y que mecanismos utilizan para el desarrollo de estas capacidades con el fin de encontrar una nueva fuentes de ACBs.

¿La microbiota cultivable aislada de trips plagas del aguacate tiene la capacidad de antagonizar microorganismos fitopatógenos y producir moléculas de señalización como parte del sistema de comunicación bacteriano QS?

Capítulo 2. Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de bacterias aisladas de trips contra hongos y bacterias fitopatógenas del aguacate

1. Introducción

La pérdida de diversos cultivos alrededor del mundo por enfermedades ocasionadas por hongos y bacterias fitopatógenas suele alcanzar porcentajes de 35% al 55% de la producción total. El control de estos fitopatógenos se ha tratado con diversos compuestos antifúngicos y bactericidas sintéticos, sin embargo, su uso ha provocado problemas para el medio ambiente, la salud humana y animal, además de la aparición de cepas resistentes (Carmona-Hernandez et al., 2019; Dukare et al., 2019; El-Wakeil et al., 2020), lo que ha intensificado la búsqueda de alternativas sostenibles y que no tengan un impacto negativo en el ambiente, tales como promover un mejor desarrollo de los cultivos como el uso de agentes de control biológico (ACB), compuestos naturales, agentes descontaminantes, métodos físicos y sus combinaciones, las cuales han proporcionado un mejor control de los organismos fitopatógenos (Zhang et al., 2017).

El control biológico (CB) se ha establecido como uno de los métodos más utilizados para el manejo de plagas y enfermedades que afectan cultivos, si bien ya se conocen varios productos comerciales a base de diversos organismos (levaduras, hongos y/o bacterias) antagónicos de fitopatógenos, cada uno posee diversos mecanismos que puede utilizar dependiendo del fitopatógeno; sin embargo, se continúa en la búsqueda de nuevos organismos con estas habilidades y así mismo moléculas bioactivas que posean un amplio espectro, que además de inhibir el desarrollo de estos estimulen el crecimiento y salud de las plantas (Zhang et al., 2017).

Entre los diferentes tipos de microorganismos utilizados en CB, las comunidades bacterianas han mostrado efectos antagónicos hacia diversos fitopatógenos, por lo que

han sido y siguen siendo ampliamente estudiadas. Para poder clasificarse como ACB, estos microorganismos deben cumplir con ciertas características específicas como estabilidad genética, eficacia a bajas concentraciones y la capacidad de colonización en diversos hospedadores. La selección de bacterias con potencial de uso como ACBs, inicia con el aislamiento a partir de diferentes muestras asociadas a la planta huésped, luego su identificación y caracterización, posteriormente se identifican sus mecanismos antagónicos frente a los fitopatógenos y se realizan varias pruebas para determinar si no son tóxicos para el medio ambiente, las plantas y la salud humana y animal (Carmona-Hernandez et al., 2019; Zhang et al., 2017). Teniendo en cuenta el proceso de selección de bacterias potenciales a ser ACB, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antagónica *in vitro* de aislados de bacterias obtenidas de trips contra hongos y bacterias fitopatógenas que afectan cultivos de aguacate, como paso fundamental en el tamizaje de nuevos microorganismos provenientes de insectos plaga con un impacto económico importante en estos cultivos.

2. Materiales y métodos

2.1 Recolecta e identificación de trips

La colectas de trips adultos se dio hojas y flores de la variedad aguacate Hass en varias plantaciones comerciales ubicadas en el Oriente antioqueño. Los insectos fueron aspirados y depositados en tubos Falcon de 50 mL con etanol al 96% luego transportados al laboratorio de Biología Celular y Molecular en la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y almacenados a 4 ° C para su procesamiento. Se recogieron un total de 731 trips y se utilizaron 381 trips para el aislamiento de bacterias cultivables. La identificación de los especímenes se hizo de acuerdo con claves taxonómicas, teniendo en cuenta los morfotipos, la coloración y rasgos morfológicos, adicional se hizo identificación molecular a través de la amplificación del gen citocromo oxidasa I (COI) y del espaciador interno transcrito (ITS). Las colectas se hicieron durante los meses de marzo y agosto de 2017 (Cano-Calle, 2020; Cano-Calle et al., 2021).

2.2 Aislamiento e identificación de bacterias de trips

Las cepas bacterianas fueron aisladas previamente de 381 especímenes adultos que se recolectaron y procesaron. Las muestras se lavaron con hipoclorito al 0,5% durante 10 s, luego en etanol 70% por 10 s y tres veces en agua estéril durante 10 s. Cada muestra incluía de 1 o 25, que se homogeneizaron para generar un “pool”, a partir del cual se hicieron diluciones seriadas en un Buffer de solución salina con fosfato (PBS) 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; 7,4 mM KH₂PO₄, pH 2) para luego platear en agar Luria-Bertani (LB) (BD Difco, Nueva Jersey, EE. UU.) y en el medio R2A agar (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las placas Petri se incubaron aeróbicamente a 25 °C durante 24 a 48 h y 7 días para R2A (Cano-Calle, 2020). Posteriormente se seleccionaron dieciocho colonias para identificación a través de técnicas morfológicas tradicionales (Caracterización macro y microscópica de colonias) y moleculares mediante la secuenciación del gen RNAr 16S y el de Girasa, en el laboratorio de Biología celular y molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (Cano-Calle 2020). De las dieciocho cepas se seleccionaron cinco Gram positivas y cinco Gram negativas (Tabla 1) de manera que no se repitieran las especies, para los ensayos posteriores.

Cod.	Especie	GenBank No. Acceso	Fuente
Gram positivas			
T7F4(3)	<i>Bacillus safensis</i>	NR_112637.1	NA
T7F1(3)	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	NA
T9H4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR_116022.1	<i>F. panamensis</i>
T7F4(1)	<i>Bacillus thuringensis</i>	NR_114581.1	NA
T7H3(1)	<i>Bacillus velezensis</i>	NR_116240.1	NA
Gram negativas			
T6H1	<i>Serratia liquefaciens</i>	NR_122057.1	NA
T8H6	<i>Pantoea cypripedii</i>	EU029105	<i>F. gardeniae/ F. gossypiana</i>
T9H2	<i>Sphingomonas olei</i>	NR_157757.1	<i>S. hansonii</i>
T9H2(7)	<i>Moraxella osloensis</i>	NR_104936.1	<i>S. hansonii</i>
T3H1(1)	<i>Pantoea agglomerans</i>	NR_041978.1	NA

Tabla 1. Bacterias aisladas de trips colectados en cultivos de aguacate Hass en el oriente del departamento de Antioquia. Na: No aplica

- 35 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing
-

2.3 Microorganismos

Los microorganismos fitopatógenos *Cylindrocladium* sp. y *Xanthomonas axonopodis*, fueron proporcionados por el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Los hongos *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., y el oomiceto *Phytophthora* sp., fueron aislados y proporcionados por el grupo de Investigación Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; la bacteria fitopatógena *Ralstonia* sp., fue proporcionada por el laboratorio de Prospección y Diseño de Biomoléculas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Las cepas fúngicas y el oomiceto fueron mantenidos en medio de cultivo papa dextrosa agar PDA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), *Xanthomonas axonopodis* en medio agar nutritivo (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y *Ralstonia* sp., en medio Casaminoácidos peptona glucosa (CPG) (Tabla 2).

Casaminoácidos-Peptona-Glucosa (CPG)	
Formula (g/L)	
Casaminoácidos (Caseína hidrolizada)	1
Peptona	10
Glucosa	5
Para medios sólidos	
Agar bacteriológico	17

Tabla 2. Composición química del medio para el mantenimiento y crecimiento de *Ralstonia* sp.

Evaluación de la actividad antagonista *in vitro*

Se realizaron pruebas de antagonismo utilizando las bacterias identificadas previamente frente a las dos bacterias fitopatógenas, los cuatro hongos y el oomiceto, utilizando diferentes métodos de la siguiente manera.

2.4 Tamizaje y selección de cepas con actividad antifúngica

En el proceso de tamizaje y selección de cepas con actividad antifúngica, los diez aislamientos seleccionados (Tabla 1) fueron enfrentados inicialmente contra *C. gloesporoides* y *Cylindrocladium* sp., siguiendo la metodología de Hameeda et al. (2006), consistente en la siembra de un disco de agar con micelio del hongo y oomiceto fitopatógeno en el centro de la placa PDA, seguido de la siembra en estriado en ambos lados y a 3 cm de distancia de la bacteria crecida durante 24 horas en caldo LB hasta alcanzar una densidad óptica (OD) igual a 1. Los cultivos luego se incubaron por 5 días a 28°C. Las cepas que mostraron capacidad de antagonismo se seleccionaron para ser evaluadas por el método de difusión en agar utilizando los sobrenadantes libres de células (Khruayyu & Pilantanapak, 2012; Sharma et al. 2011). El porcentaje de inhibición de cálculo utilizando la ecuación $I = [(C-T) / C] \times 100$. Donde I: es el porcentaje de la inhibición (%), C:es el diámetro del micelio del testigo y T: es el diámetro del micelio del tratamiento (Amaíz et al., 2015)

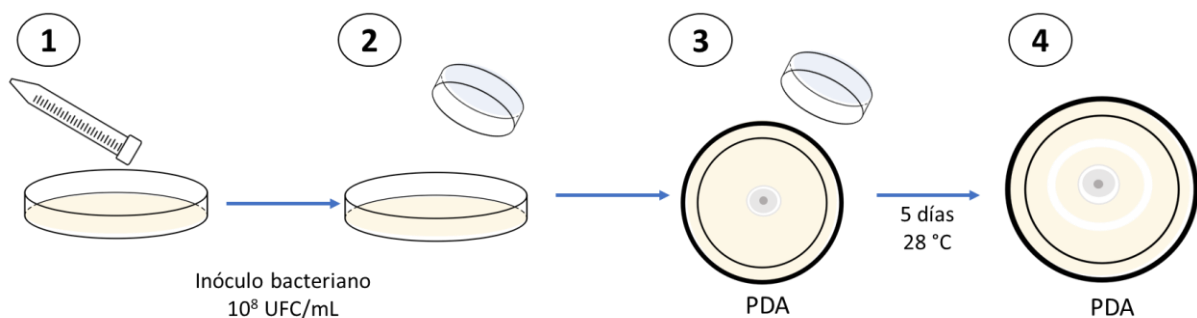
2.4.1 Método de difusión en agar

Las bacterias seleccionadas por su capacidad antagonista se crecieron en medio líquido LB por 24 horas a la temperatura establecida para cada una, los cultivos resultantes se centrifugaron a 10.000g por 10 min a 4°C, los sobrenadantes fueron luego esterilizados por filtración utilizando membranas miliporo de 0.22 µm, de cada extracto se tomaron 20µL y se depositaron en dos sensidiscos de papel filtro de 6 mm de diámetro, ubicados a 1.5 cm en paralelo del disco de agar con micelio de *C. gloesporoides* y *Cylindrocladium* sp., previamente ubicado en el centro de la caja de Petri, como control negativo se utilizaron los mismos sensidiscos inoculados con agua estéril. Las placas fueron incubadas por cinco días a 28 °C, el porcentaje de inhibición de cálculo utilizando la ecuación $I = [(C-T) / C] \times 100$. Donde I es el porcentaje de la inhibición (%), C:es el diámetro del micelio del testigo y T: es el diámetro del micelio del tratamiento (Amaíz et al., 2015).

2.5 Actividad antagonista *in vitro* contra hongos y oomicetos fitopatógenos por cultivos duales

En medio PDA se realizaron las pruebas de antagonismo entre las bacterias de trips seleccionadas, los cuatro hongos y el oomiceto fitopatógeno, mencionados anteriormente, para ello se prepararon los inóculos bacterianos en concentraciones de aproximadamente de 10^8 UFC/mL, crecidos previamente en caldo LB por 24 horas a la temperatura establecida por cada cepa a 150 rpm. Se prepararán discos de agar con micelio del hongo de 5mm de diámetro para luego transferirlo al centro en una nueva placa de PDA, y posteriormente utilizando la base de una caja Petri pequeña se aplicó el inoculo de la bacteria en cada caja alrededor del disco de agar con micelio (Figura 4). Como control se utiliza el disco del hongo fitopatógeno sembrando sin tratamiento. Las placas fueron incubadas por 8 días a 28 °C. Por último, teniendo en cuenta el crecimiento irregular de la mayoría de los hongos evaluados fueron analizados a través del programa ImageJ para tomar las medidas del crecimiento micelial del hongo y así calcular el índice de inhibición con la formula, $I = [(C-T) / C] \times 100$. Donde I: es el porcentaje de la inhibición (%), C: es el diámetro del micelio del testigo y T: es el diámetro del micelio del tratamiento (Amaíz et al., 2015). Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, cada una por triplicado.

Figura 4. Descripción grafica del procedimiento realizado para la evaluación de actividad antagonista frente a hongos fitopatógenos *in vitro*.



2.5.1 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento por triplicado. La comparación entre los tratamientos se hizo mediante análisis

de varianza (ANOVA) y separación de medias utilizando la prueba de Tukey empleando gráficos Boxplot a través del software R. En todos los casos, el umbral de significancia fue del 5%. El supuesto de normalidad y la igualdad de varianzas de los datos se probaron previamente utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente.

2.6 Actividad antagonista *in vitro* contra bacterias fitopatógenas

2.6.1 Detección con sensidisco

La actividad antagónica de las cepas aisladas contra bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas axonopodis* y *Ralstonia* sp.) se hizo utilizando la metodología de detección con sensidisco descrita por Pérez et al., (2014), consistente en la siembra masiva de las bacterias fitopatógenas a una concentración de 5×10^8 UFC/mL en placas con sus respectivos medios, en cada placa se depositaron tres discos de papel filtro de 6 mm de diámetro de manera radial previamente humedecidos con las cepas utilizadas como antagonistas en concentraciones de 5×10^8 UFC/mL, como control negativo se utilizó agua estéril y de control positivo el antibiótico tetraciclina 50mg/L; las placas fueron incubadas a 29 °C por 48 horas, las bacterias que presentaron zonas de inhibición fueron seleccionadas para los posteriores ensayos. La actividad inhibitoria se evaluó observando la presencia de halos de inhibición (prueba positiva).

2.6.2 Determinación de la actividad antibacteriana de extractos libres de células por el método de ensayo en placa contra bacterias fitopatógenas

2.6.2.1 Obtención de sobrenadantes libres de células

Los aislados que mostraron alguna actividad antagónica frente a las bacterias fitopatógenas en el punto 2.6.1 se utilizaron para evaluar la actividad antibacteriana de sus extractos contra bacterias fitopatógenas. Los cultivos seleccionados se reactivaron mediante siembra en caldo nutritivo hasta alcanzar su crecimiento exponencial OD=1. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación (10000g x 10 min a 4°C), seguido se esterilizaron por filtración utilizando membranas miliporo de 0,22 μ m (Martín del campo et al., 2008; Nwuche, 2013; Leyton et al., 2015).

3. Resultados

Dado el poco conocimiento sobre las especies de trips en Colombia y en el departamento de Antioquia, en el estudio hecho por Cano-Calle, (2020), se reportó que las especies más abundantes en el aguacate fueron *Frankliniella gardeniae* con una frecuencia relativa (fi) de 64, *Frankliniella gossypiana* fi=16, *Frankliniella panamensis* fi=11 y *Scirtothrips hansonii* fi=18, por lo cual aunque no se puede especificar la procedencia específica de todas las cepas, teniendo en cuenta la identificación taxonómica y molecular de los trips la distribución de estas cepas se podrían atribuir a *Frankliniella* spp., y *Scirtothrips hansonii*, es importante tener en cuenta que la identificación de estos especímenes se realizó de manera paralela al análisis de la microbiota cultivable, teniendo en cuenta las condiciones y objetivos del estudio.

3.1. Actividad antagonista *in vitro* contra hongos y oomicetos fitopatógenos por cultivos duales

En el proceso de tamizaje y selección de cepas con actividad antifúngica, cuatro de las diez cepas mostraron actividad inhibitoria frente a los dos hongos evaluados inicialmente, estas corresponden a *Pantoea agglomerans* T3H1(1), *Serratia liquefaciens* T6H1, *Bacillus amylii* T9H4 y *Bacillus velezensis* T7H3(1); sin embargo, se encontró dificultad en la medición de la áreas de inhibición ya que el crecimiento fúngico empezó a darse de manera irregular y a rodear la estrías bacterianas. Teniendo en cuenta estos resultados, las cuatro cepas con mejor actividad antagonistas fueron seleccionadas para la obtención del sobrenadante libre de células; sin embargo, los resultados mostraron que el poder de inhibición obtenido mediante el uso del sobrenadante es muy bajo, optándose por hacer una modificación en la metodología, consistente en la siembra radial de inóculo bacteriano, de tal manera que éste rodeara el disco de agar con micelio del hongo y/o oomiceto, descartando así el uso de sobrenadante y reemplazando este por cultivo bacteriano completo.

Las cuatro cepas seleccionadas mostraron actividad antagonista frente a los cuatro hongos fitopatógenos y el oomiceto *Phytophthora* sp. Las cepas T9H4 y T7H3 (1) mostraron un porcentaje de inhibición mayor del 65% sobre los hongos y el oomiceto (Tabla 3), lo que las hace candidatas importantes como ACBs para el manejo de estos agentes fitopatógenos.

41 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

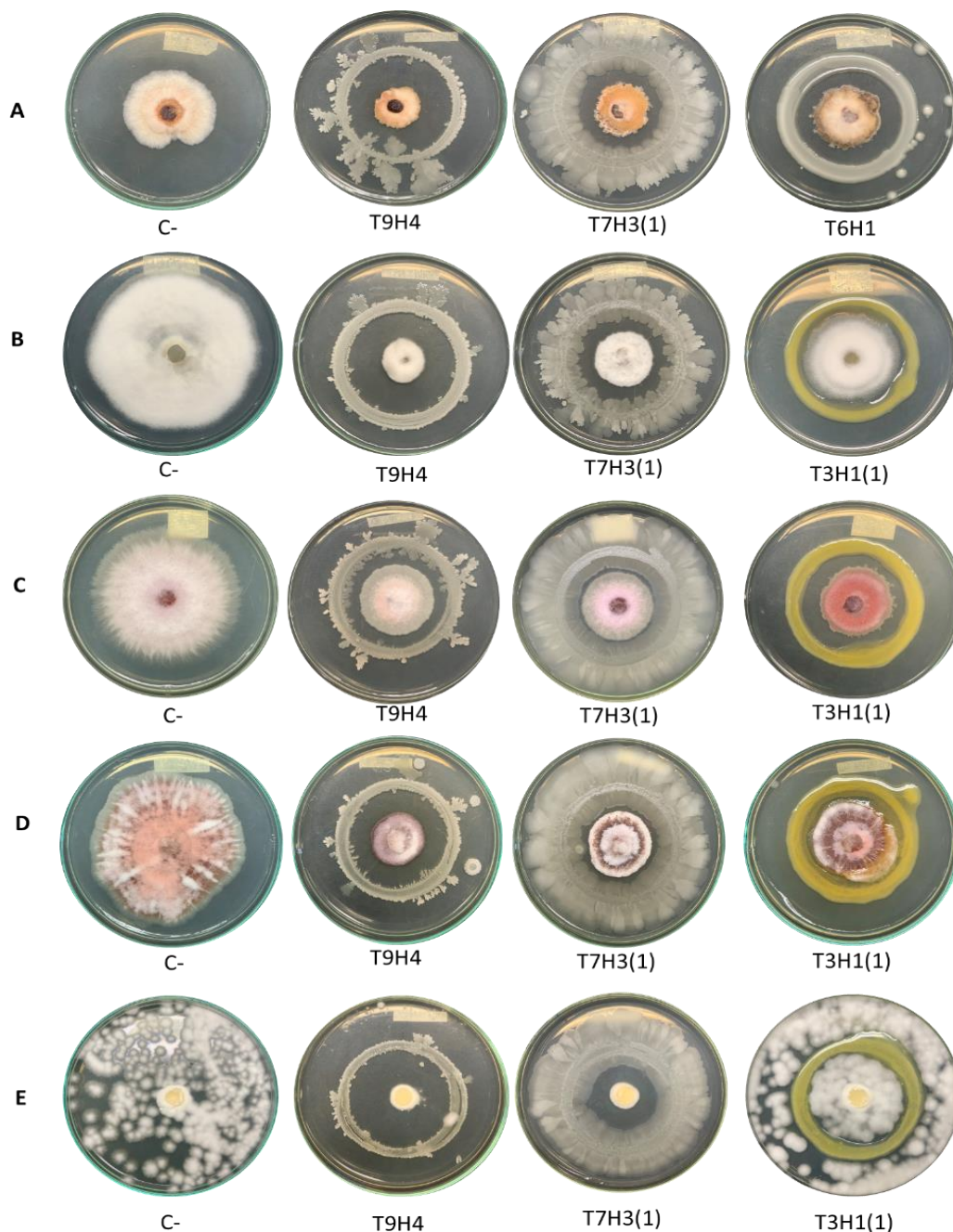
Las cepas Gram negativas mostraron porcentajes variables de inhibición del crecimiento de los hongos y el oomiceto, la cepa T3H1(1) correspondiente a *Pantoea agglomerans* mostró mayor inhibición del crecimiento de los tres hongos fitopatógenos con un mayor porcentaje en comparación con T6H1, excepto para el caso de *Cylindrocladium* sp., donde se registró el porcentaje de inhibición más bajo (20.9 ± 3.8 %) de todos los tratamientos. El efecto de estas dos bacterias contra *Fusarium* sp. F4, no mostró diferencias estadísticamente significativas.

		Inhibición (%)				
Tratamiento		<i>Cylindrocladium</i> sp (Cyl)	<i>C. gloeosporoides</i> (Cg)	<i>Fusarium</i> sp. (F4)	<i>Fusarium</i> sp. (F53)	<i>Phytophthora</i> sp. (EPC)
<i>Serratia liquefaciens</i>	T6H1	48.8 ± 2.1^c	41.8 ± 5.6^d	57.7 ± 4.2^c	56.1 ± 2.1^c	NA
<i>Pantoea agglomerans</i>	T3H1(1)	20.9 ± 3.8^d	48.4 ± 4.7^c	61.9 ± 3.4^c	62.0 ± 4.5^b	NA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	T9H4	76.4 ± 2.0^a	81.1 ± 4.5^a	78.7 ± 2.4^a	79.8 ± 3.1^a	96.7 ± 0.8^a
<i>Bacillus velezensis</i>	T7H3(1)	65.8 ± 3.6^b	71.4 ± 0.9^b	71.2 ± 3.8^b	80.7 ± 3.0^a	96.1 ± 1.2^a

Tabla 3. Actividad antagonista de bacterias aisladas frente a hongos y oomiceto fitopatógenos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la **Figura 6** se pueden observar por cada hongo fitopatógeno los tres cultivos que tuvieron el mayor porcentaje de inhibición, de manera general se evidencia como el crecimiento de los hongos y el oomiceto se ve reducido a una zona limitada de la placa, incluso en la mayoría no se logra observar un contacto directo entre ambos microorganismos para deducir que el inóculo bacteriano actúe como barrera física, lo que permite deducir que las bacterias podrían estar liberando en el medio sustancias que inhiben el crecimiento de estos fitopatógenos.

Figura 6. Cultivos duales en medio PDA. (A) corresponde a *Cylindrocladium* sp., (B) *C. gloeosporoides*, (C y D) *Fusarium* sp. F4 y F53, respectivamente, (E) *Phytophthora* sp. (C-) Control negativo: fitopatígeno sin tratamiento.

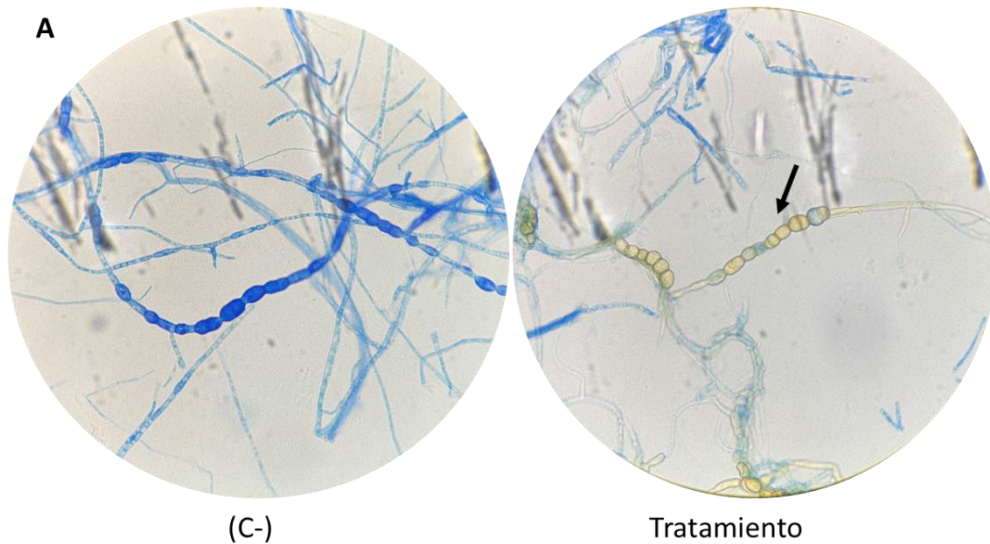


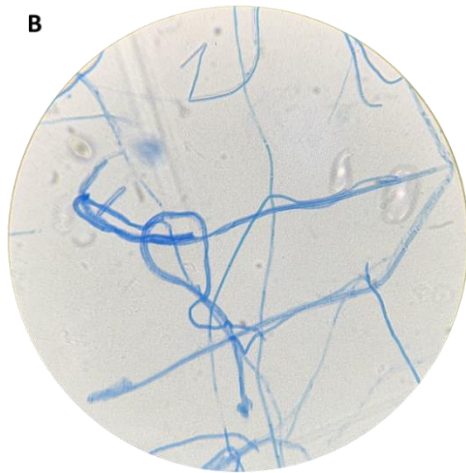
Adicionalmente, se hicieron análisis microscópicos de las estructuras de los hongos fitopatógenos, en búsqueda de evidencia que mostrara efectos de las bacterias y/o sus metabolitos sobre el desarrollo normal del micelio y estructuras reproductivas de estos. En la Figura 7, se muestra el estado del desarrollo de las hifas en micelio obtenido de colonias

43 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

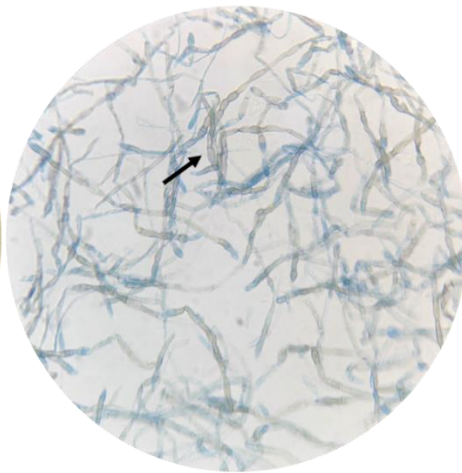
correspondientes a los controles negativos y algunos de los tratamientos. Los resultados muestran algunas alteraciones en las hifas, principalmente ensanchamiento y cambio en el color (Figura 7 B, C y D), lo que nos puede indicar que se esté dando un debilitamiento de la pared fúngica o un aumento en la permeabilidad de la membrana celular. Estos cambios en las estructuras de los hongos con los tratamientos coinciden con lo observado en la Figura 6 en la que se muestra un tipo de inhibición que no permite el normal desarrollo del hongo en el medio.

Figura 7. Microscopia de los hongos fitopatógenos evaluado en cultivo dual. Tinción con Azul de lactofenol, observación en 40x (A) *Cylindrocladium* sp., (B) *C. gloeosporoides*, (C y D) *Fusarium* sp., F4 y F53, respectivamente. (C-) Control negativo: Fitopatógeno sin tratamiento.

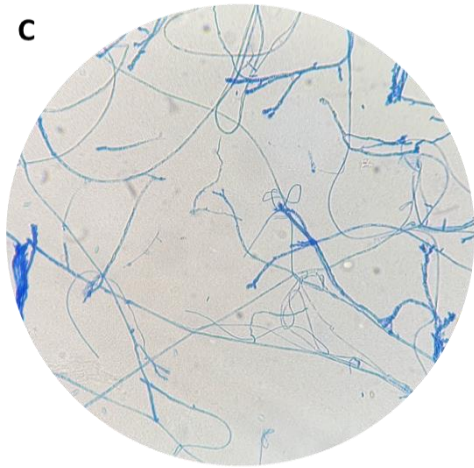




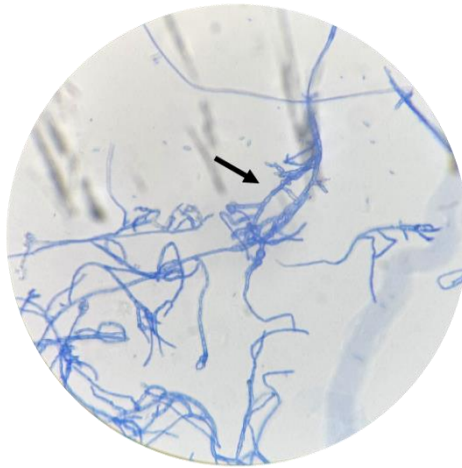
(C-)



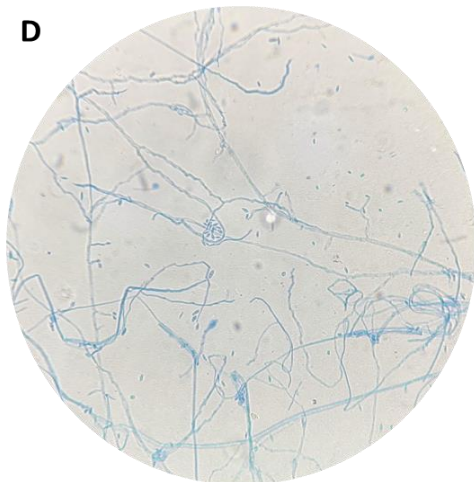
Tratamiento



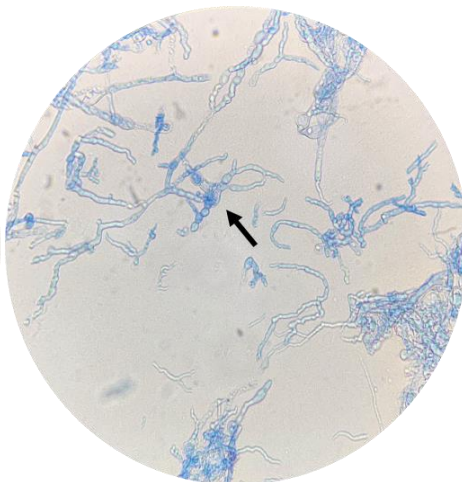
(C-)



Tratamiento



(C-)



Tratamiento

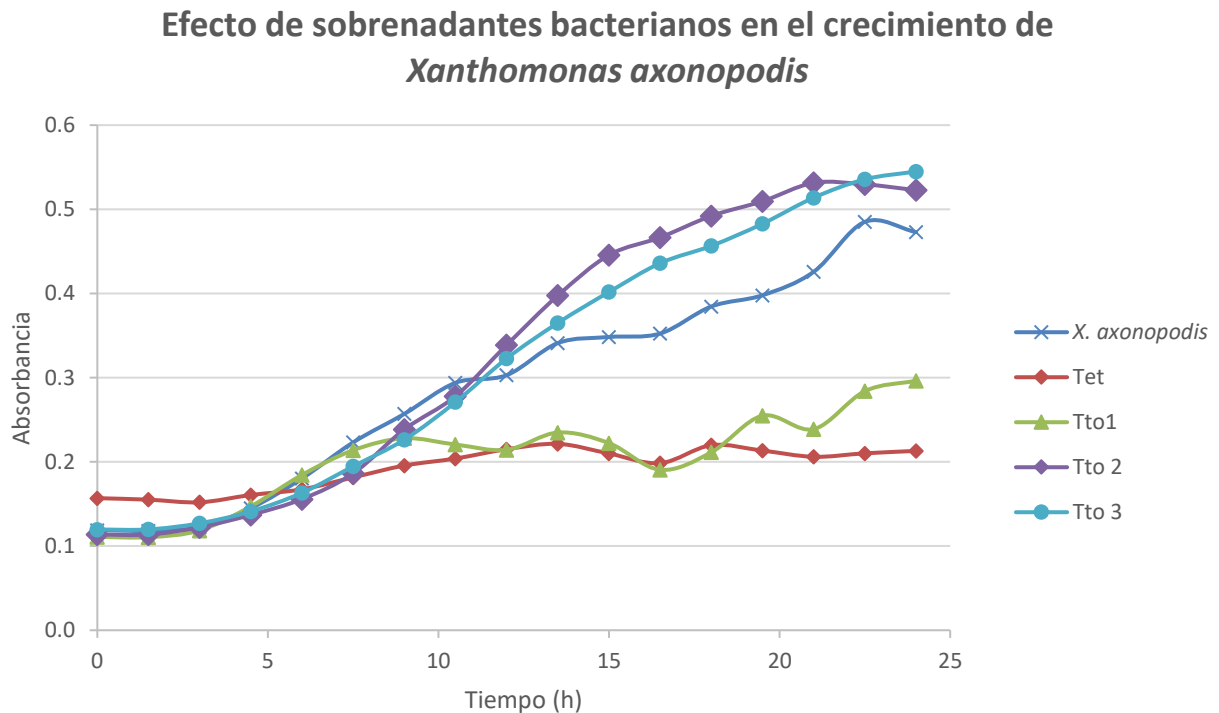
3.2. Actividad antagonista *in vitro* contra bacterias fitopatógenas

Al utilizar la metodología de detección con sensidisco en el enfrentamiento de los aislados bacterianos frente a las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis* y *Ralstonia* sp., se pretendía realizar un tamizaje inicial en el que se pudiese identificar cuál de estos cultivos tendría una potencial actividad antibacteriana. Sin embargo, no se lograron observar halos de inhibición en el ensayo (Tabla 4), por ende, se utilizaron las dos bacterias Gram negativas que presentaron actividad antifúngica y las cinco cepas Gram positivas para realizar un ensayo en placa. Para la bacteria fitopatógena *Ralstonia* sp., ninguno de los sobrenadantes presentó alguna actividad inhibitoria; sin embargo, para *Xanthomonas axonopodis*, el tratamiento 1 correspondiente a T9H4 (*Bacillus amyloliquefaciens*) tuvo un efecto inhibitorio donde el crecimiento se vio limitado al igual que el control con antibiótico tetraciclina (Figura 8).

Tratamientos		Detección con sensidisco		Ensayo en placa	
		<i>X. axonopodis</i>	<i>Ralstonia</i> sp	<i>X. axonopodis</i>	<i>Ralstonia</i> sp
<i>Pantoea cyripedii</i>	T8H6	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	T6H1	-	-	-	-
<i>Sphingomonas olei</i>	T9H2	-	-	-	-
<i>Moraxella osloensis</i>	T9H2(7)	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	T3H1(1)	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	T7F1(3)	-	-	-	-
<i>Bacillus thuringensis</i>	T7F4(1)	-	-	-	-
<i>Bacillus safensis</i>	T7F4(3)	-	-	-	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	T9H4	-	-	+	-
<i>Bacillus velezensis</i>	T7H3(1)	-	-	-	-

Tabla 4. Pruebas actividad antibacteriana por sensidisco y ensayo en placa. El símbolo (+) indica que se presentó inhibición y (-) que no se detectó inhibición de las bacterias fitopatógenas.

Figura 8. Efecto de sobrenadantes bacterianos en el crecimiento de *Xanthomonas axonopodis*. Tto1: *Bacillus amyloliquefaciens* T9H4, Tto2: *Pantoea agglomerans* T3H1(1), Tto 3: *Pantoea cypripedii* T8H6, Tet: (C+) Tetraciclina.



4. Discusión

La actividad antagonista que algunos microorganismos pueden ejercer sobre otros consiste en tener la capacidad de suprimir el crecimiento y desarrollo de estos. Organismos con esta capacidad han sido ampliamente utilizados para el manejo de insectos plaga y de enfermedades causadas por diferentes patógenos, en toda clase de cultivos (Carmona-Hernandez et al. 2019; Dukare et al. 2019). Las bacterias poseen una amplia variedad de mecanismos antagonistas contra microorganismos fitopatógenos, los que las hacen altamente eficaces entre el grupo de agentes de control biológico (ACB), de estos mecanismos se han descrito seis: 1) Competencia por nutrientes y espacio, 2) Producción de sideróforos, 3) Producción de enzimas líticas, 4) Formación de biopelículas y QS, 5) Antibiosis: Producción de antibióticos, moléculas antifúngicas y compuestos orgánicos volátiles (COV) y por último, 6) Inducción de resistencia (Carmona-Hernandez et al. 2019; El-Wakeil et al., 2020).

Las bacterias con capacidades de biocontrol utilizan al menos dos mecanismos antagonistas, el principal mecanismo contra los microorganismos fitopatógenos es la competencia por espacio y nutrientes, esto les da la capacidad de colonizar rápidamente la rizosfera y filosfera de diferentes plantas, asimilando las fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, incluso el oxígeno disponible; lo cual es muy eficaz en la inhibición de hongos fitopatógenos al reducir su porcentaje de germinación, crecimiento e infección (Carmona-Hernandez et al. 2019; Dukare et al. 2019). Se ha descrito que la especie *Pantoea agglomerans* utiliza este mecanismo para inhibir diversos hongos fitopatógenos; Poppe et al., (2003), encontraron que la bacteria *P. agglomerans* disminuyó el porcentaje de germinación de conidios en *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, al limitar la disponibilidad de nutrientes en el medio y cuando el antagonista está en contacto directo con el fitopatógeno, la inhibición es mayor, las condiciones de sus estudios no permitieron detectar productos de antibiosis ni enzimas quitinolíticas o inductoras de resistencia, por lo cual estos mecanismos fueron descartados.

Adicionalmente, cepas de *P. agglomerans* han sido reportadas como productoras de sideróforos, moléculas conformadas por pequeños péptidos que poseen grupos funcionales que tienen una potente afinidad por el hierro, el cual participa en múltiples funciones biológicas como el transporte de oxígeno, la respiración celular y la síntesis de ADN (Carmona-Hernandez et al., 2019; Golonka et al., 2019). La investigación realizada por Thissera et al., (2020), detectó derivados de pulicatina (Pulicatina F, H e I), considerados sideróforos bacterianos que a su vez mostraron actividad antifúngica frente a *Penicillium citrinum*, siendo este uno de los primeros reportes de estas moléculas como agentes antifúngicos. Este estudio también permitió detectar otras moléculas que hacen parte del mecanismo de antibiosis, producción de metabolitos como antibióticos, antifúngicos y compuestos orgánicos volátiles (COV); el aeruginaldehído fue el primer compuesto identificado que ha sido reportado como un agente de control biológico contra algunos hongos fitopatógenos como *Cladosporium* spp. y *Fusarium* spp.

Por otro lado, se ha detectado que las cepas de *P. agglomerans* también tienen la capacidad de producir COV, así lo demuestra el estudio realizado por Dagher et al., (2020), investigación en la que se logró demostrar que estos compuestos volátiles inhiben en un 34.5% el hongo fitopatógeno *Macrophomia phaseolina* en soya; sin embargo, los

porcentajes de inhibición fueron más altos por la actividad de antibiosis (89%), mientras que en cultivos duales a las 24 y 48 horas los porcentajes de inhibición fueron de 43% y 62%, respectivamente. También, resaltan que la aplicación de este antagonista en el suelo logró reducir la población del fitopatógeno, lo que se vio reflejado en una reducción significativa de la enfermedad en la planta huésped.

Aunque *P. agglomerans* ha sido utilizada principalmente para el control de hongos fitopatógenos gracias a los mecanismos descritos anteriormente, Wright et al., (2001), reportan la producción de dos antibióticos Pantocina A y B, utilizados en el control de *Erwinia amylovora* responsable de la enfermedad de fuego bacteriano que afecta significativamente los cultivos de manzana y pera; Dagher et al. (2020), formularon un producto de control biológico para contrarrestar los efectos de esta enfermedad, y encontraron que los árboles de manzana tratados con *P. agglomerans* desarrollaron significativamente un menor porcentaje la enfermedad con respecto a los controles, encontrándose que a los 10 días después de su aplicación, el control de la enfermedad puede llegar a ser de hasta en un 70%.

Bajo las condiciones del presente estudio, esta bacteria Gram negativa demostró que puede alcanzar porcentajes de inhibición desde un 20% hasta 62% en hongos fitopatógenos, se podría hipotetizar que las bacterias al tener una tasa de crecimiento mayor con respecto al tiempo estas pudieron utilizar los nutrientes disponibles siendo el primer de los sextos mecanismos de inhibición que esta especie pudo utilizar, sin embargo, para confirmar esto se debe realizar ensayos específicos. Los resultados obtenidos con el empleo de esta especie de bacteria la ubican como una buena candidata como ABC para el manejo de fitopatógenos, y permite proyectarnos hacia estudios futuros en los que mediante modificaciones en la metodología utilizada se logren niveles de inhibición mayores, aumentando así su potencial como un ACB. Adicional a esto, los estudios hechos por otros investigadores en los que se utilizó esta especie bacteriana, muestran otras perspectivas para tener en cuenta en el desarrollo de próximos estudios que permitan validar la existencia de otros mecanismos asociados tales como la inducción de resistencia en el hospedador, la producción de sideróforos y productos de antibiosis (Carmona-Hernandez et al., 2019).

Las cepas de *Bacillus* sp., al igual que las bacterias Gram negativas utilizan la competencia por nutrientes y espacio como un mecanismo de antagonismo, así lo reportan Kong et al.,

, (2010) en su estudio con *B. megaterium*, la que inhibió el desarrollo de *Aspergillus flavus* utilizando este mecanismo en conjunto con otros. Sin embargo, este género cuenta con diversas especies que se caracterizan por la producción de diversos metabolitos inhibitorios que han sido ampliamente estudiados, de los cuales ya existen varios productos comerciales disponibles, por ejemplo, AMYLO-X® WG, utilizado para el control de *Botrytis* sp., y prevención de la enfermedad “pudrición gris”.

Muchos de los agentes de biocontrol producen enzimas hidrolíticas extracelulares que pueden limitar el crecimiento de patógenos, estas enzimas pueden hidrolizar diversos compuestos como la quitina, celulosa y proteínas (Senol et al., 2014). La producción de enzimas quitinolíticas son comúnmente sintetizadas por algunas cepas de *Bacillus* sp., Mohammadi et al., (2017) reportan las cepas *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus* por su capacidad de producir las enzimas tipo quitinasas, proteasas y glucanasas, que son importantes en la inhibición de hongos fitopatógenos, ya que pueden degradar la pared celular causando defectos en la estructura de las hifas y esporas de los hongos.

Además de enzimas líticas, este género también produce otras clase de metabolitos como antibióticos y péptidos antifúngicos, Arrebola et al., (2010) durante su investigación expusieron una cepa de *B. amyloliquefaciens* contra siete hongos fitopatógenos y lograron identificar la producción de fengicina, surfactina e iturina A, este último mostrando la actividad antifúngica más significativa. Cuando se evaluó específicamente la acción de iturina A se encontró que es fundamental en la actividad de esta cepa, y que el espectro de acción de este metabolito es amplio y efectivo contra variedades de hongos. Iturina y fengicina fueron posteriormente identificados en el extracto crudo de una cepa de *B. amyloliquefaciens* aislada de manzana, que suprimió significativamente el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de *Botryosphaeria dothidea*, responsable de la enfermedad “pudrición anular de la manzana”, entre otros hongos fitopatógenos evaluados (Chen et al., 2016).

Estos metabolitos, excepto por la iturina, ya se han reportado previamente como metabolitos producidos por la especie *B. velezensis*, también se han encontrado antibióticos, COV, producción de sideróforos e inductores de resistencia sistémica en las plantas (Rabbee et al., 2019). En un estudio realizado por Lim et al., (2017), reportaron la capacidad de *B. velezensis* en la producción de dos compuestos difusibles: Bacilomicina

L y Fengicina A, compuestos volátiles como dimetilsulfóxido, 1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), compuestos que inhibieron en 31% y 21%, el crecimiento de *Phytophthora* sp., y *Colletotrichum* sp., respectivamente.

Otros estudios llevados a cabo por Myo et al., (2019), reportan la capacidad potencial de esta bacteria para controlar otras especies de hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., y *Alternaria* sp., entre otros. Adicional a esto, en el mismo estudio, se logró identificar COV, se detectó la producción de enzimas líticas de quitina y celulosa, entre otras. Cabe resaltar que la actividad de los metabolitos producidos logró controlar en porcentajes significativos el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de estos hongos fitopatógenos.

Estos compuestos asociados con el proceso de antibiosis así como las enzimas líticas tiene como función inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos, interfiriendo con la síntesis de la pared celular y alterando las estructuras de la pared celular o en su defecto degradándolas (Arrebola et al. 2010); teniendo en cuenta los altos porcentajes de inhibición de la cepa T9H4 *B. amyloliquefaciens* frente a los cuatro hongos fitopatógenos evaluados, cabe destacar que esta cepa específicamente tuvo un comportamiento de crecimiento característico donde no fue estrictamente necesario su contacto directo con el hongo para inhibirlo (Figura 6), por lo que sería oportuno evaluar si se dio una liberación de metabolitos de antibiosis en el medio y si estos inhiben el normal crecimiento de los fitopatógenos alterando el normal desarrollo de sus estructuras celulares.

Aunque se ha reportado especialmente la actividad de especies de *Bacillus* sp., contra *R. solanacearum*, en el caso del presente estudio ninguna de las cepas evaluadas presento actividad, se ha observado que los mecanismos de antagonismo que utilizan estas bacterias para el control biológico de bacterias fitopatógenas son principalmente indirectas, como la competencia por hierro, inducción de resistencia y promoción de crecimiento en la planta huésped; Yang et al., (2012) en su estudio señalaron que la competencia por el hierro y, a su vez, la capacidad de producir sideróforos es la característica clave contra *R. solanacearum*, lo cual también ha sido reportado por Singh & Kumar, (2016), quienes observaron que al adicionar FeCl_3 al medio utilizado aumentó la actividad antibacteriana contra *R. solanacearum*.

La inducción de resistencia en la planta huésped y la promoción de su crecimiento, es el otro mecanismo indirecto más utilizado que suele tener un efecto significativo en el control

de estas bacterias fitopatógenas (El-Wakeil et al. 2020). En un estudio realizado por Wang et al., (2019) en el que utilizaron una cepa de *Bacillus* sp., se encontró que ésta puede inducir reacciones inmunes en las plantas y algunos metabolitos en los exudados de la raíz como el ácido láctico y el ácido hexanoico, en ensayos *in vitro* se observó que esta cepa puede utilizar estas moléculas para inducir su propio crecimiento, motilidad y formación de biofilm; adicional cuando las moléculas se aplican de manera exógena en plantas de tomate se muestra una eficacia de biocontrol positiva permitiendo así una rápida colonización en la superficie de la raíz de la planta por parte de *Bacillus* sp., lo que contribuyó a disminuir la severidad de la enfermedad, marchitez bacteriana del tomate en porcentajes superiores al 40%.

En el estudio de Li et al., (2012), se reportó una actividad inhibitoria significativa *in vivo* de una cepa de la especie *B. amyloliquefaciens* frente a *Xanthomonas axonopodis* y su efecto en el desarrollo de la enfermedad “tizón bacteriano”. En este trabajo también se reportan las moléculas de iturina, fengicina y surfactina; sin embargo, se resalta el papel que cumplen las surfactinas, ya que aunque su actividad inhibitoria suele ser débil, han mostrado múltiples efectos beneficiosos en las plantas, como promotores de crecimiento, facilitando el proceso de adhesión del ACB a las superficies de las plantas, inhibiendo la formación de biopelículas de organismos fitopatógenos y activando el sistema de resistencia en una gama amplia de plantas. Teniendo en cuenta lo reportado y que en el presente estudio no se hicieron evaluaciones *in vivo* de estas bacterias, esto nos lleva a considerar que no pueden ser descartadas como posibles ACBs para el manejo de enfermedades bacterianas en plantas, dejando abierta la posibilidad a futuro de investigaciones en las que se pueda hacer su evaluación *in vivo* para detectar otro tipo de mecanismos de control como los indicados en otras investigaciones.

Los porcentajes de inhibición de *Phytophthora* sp., registrados en este estudio se muestran superiores a los obtenidos por otros investigadores, por ejemplo, Guevara-Avenidaño et al., (2018), aislaron veinte cepas de la rizosfera de cultivos de aguacate, de las cuales siete presentaron actividad inhibitoria frente a una cepa de *P. cinnamomi*, estas fueron identificadas como *B. amyloliquefaceins* y sus porcentajes de inhibición variaron entre un 20% y 25.5%, siendo este último el más alto hasta ahora registrado. Esta capacidad de inhibición se puede atribuir a diversos mecanismos que pueden ser utilizadas por

diferentes cepas de *Bacillus* sp., tales como la producción de diversas enzimas incluidas las de tipo celulítico, las cuales son necesarias para la degradación de estructura de *Phytophthora* sp., también la producción de metabolitos difusibles en el medio como la iturina que posee un amplio espectro, la fengicina o surfactinas y compuestos orgánicos volátiles.

Con respecto al género *Serratia* sp., se reconoce por sus factores de virulencia, como DNasa, lipasas, hemolisinas, proteasas, quitinasas y también producen antibióticos, además de un pigmento rojo llamado prodiogisina y biosurfactantes (Horinouchi et al., 2010). La especie *S. liquefaciens* ha sido asociado principalmente a infecciones clínicas, contaminación de alimentos, pero también se le reconocen beneficios ambientales en procesos de biorremediación y en la promoción del crecimiento vegetal (El-Esawi et al. 2018). En lo que nuestra búsqueda bibliográfica abarcó no se encontraron reportes específicos sobre la actividad antifúngica o antibacteriana de la especie *S. liquefaciens*, excepto por un estudio hecho por Kalbe et al., (1996), quienes detectaron actividades antifúngicas frente a dos hongos fitopatógenos, incluida la producción de enzimas quitinolíticas. Sin embargo, nuestro estudio podría hacer parte de esos primeros reportes de actividad antifúngica por parte de esta bacteria, y permite sugerir un estudio más profundo que lleve a identificar los mecanismos de antagonismo que posee y como se podrían utilizar en el biocontrol de fitopatógenos, mediante estrategias directas o indirectas.

Las cepas evaluadas mostraron porcentajes de inhibición contra hongos fitopatógenos que afectan cultivos de aguacate y otros, los resultados obtenidos fueron significativos para el estudio, lo que propone ampliar el estudio de estas cepas de manera que se logre definir qué mecanismos utilizan para inhibir el crecimiento de los hongos utilizados. Es importante resaltar que este estudio permitió trabajar con cepas bacterianas provenientes de un insecto plaga que afecta cultivos de aguacate, entre otros, ampliando la visión sobre las fuentes de estos microorganismos, también la caracterización de actividades antagonistas observada puede ser de gran interés en el área de agricultura.

Capítulo 3. Detectar la presencia de moléculas quórum sensing (QS) (percepción de cuórum) en bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate.

1. Introducción

La actividad antimicrobiana como la producción de metabolitos secundarios muchas veces se encuentra mediada por la expresión de genes fenotípicos que gracias a un sistema de señalización son activados (Boyen et al., 2009; Rosselló & Bouza, 2013; Kim & Yeon, 2018), estos sistemas de señalización especialmente en bacterias se conocen como Quorum Sensing y en algunos textos también se denomina percepción de cuórum.

El sistema de detección de quórum de las bacterias Gram negativas producen moléculas señal mediante los homólogos de LuxI, y estas proteínas suelen producir AHLs específicas, de manera que cada especie bacteriana produce y utiliza al menos uno de los diversos AHL en sus procesos de comunicación. Esta variabilidad en la producción de moléculas AHL hace necesario identificarlas para así tener información clara sobre los posibles mecanismos reguladores y su biosíntesis (Kim & Yeon, 2018; Ortori et al., 2011).

La detección de estas moléculas de señalización QS avanzó rápidamente gracias al desarrollo de ensayos con biosensores que responden a estas moléculas dando como resultado una respuesta cualitativa y en algunas ocasiones cuantitativa, como bioluminiscencia, motilidad de “swarming” y/o producción de enzimas galactosidasas y que no requieren instrumentación sofisticada (Fletcher et al., 2007; Pomini, Paccola-Meirelles, & Marsaioli, 2007). El uso de biosensores para la detección de moléculas de señalización QS en bacterias Gram positivas se ha descrito previamente, con la diferencia que los biosensores reportados difieren de los utilizados en bacterias Gram negativas, teniendo en cuenta que el tipo de molécula señal que se emite es completamente diferente.

Estos métodos indirectos han permitido detectar diferentes moléculas AHL, pero tienen algunas limitaciones lo que como consecuencia llevo a la búsqueda de nuevas metodologías que permitieran determinar y cuantificar de manera precisa la concentración de estas moléculas, las proporciones molares, el uso de estándares de calibración sintéticos y la detección simultánea de las diferentes clases de AHL en cultivos bacterianos. Inicialmente es necesario garantizar una correcta separación y purificación de las moléculas, lo cual se hace principalmente a través de HPLC, y la espectrometría de masas que permite determinar la estructura, estos métodos suelen usarse en conjunto (HPLC-MS/MS) para combinar las capacidades que ofrece cada uno (Miller & Gilmore, 2020; Ortori et al., 2014).

El proceso de identificación de moléculas AHL en bacterias Gram negativas ha permitido descubrir otras moléculas de señalización, como por ejemplo las 2-alkil 4- (1H) -quinolona (AQ), donde se encuentran 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) en especies de *P. aeruginosa* principalmente y 2-heptil-4-hidroxi-quinolona (HHQ); también ciclopéptidos o diketopiperazinas (DKP) en varios géneros bacterianos Gram-negativos incluso Gram-positivos, en cepas de *Ralstonia solanacearum* se han detectado moléculas señal éster metílico del ácido 3-hidroxipalmítico (3-OH PAME) que utiliza para regular su virulencia y en *Xanthomonas campestris*, el factor extracelular difusible (DSF) (Fletcher et al. 2007; S.-R. Kim and Yeon 2018; Miller and Gilmore 2020; Ortori et al. 2011).

En la evaluación de la actividad antagonista de las bacterias aisladas de trips se evidenció que algunas de las cepas aisladas de trips presentaron actividad antifúngica, y esta capacidad podría ser atribuida a mecanismos utilizados por las bacterias, tales como competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, producción de enzimas líticas, incluso señalización QS, mecanismo a través del cual una población bacteriana puede coordinar el desarrollo de actividades, como factores de virulencia (S.-R. Kim & Yeon, 2018). Detectar e identificar las moléculas señalizadoras proporciona una visión inicial de los mecanismos de señalización QS utilizados por las bacterias en estudio y, el objetivo de este capítulo fue detectar la presencia de moléculas QS en bacterias Gram negativas aisladas de trips, a través del uso de biosensores y la técnica UHPLC/MS.

2. Materiales y métodos

2.1. Detección de moléculas de Quorum Sensing (QS) en bacterias Gram negativas

2.1.1. Preparación de cultivos bacterianos

En esta fase del estudio se trabajó con las cinco cepas de bacterias Gram negativas, de las 10 seleccionadas por su alta capacidad antagonista contra hongos, y el oomiceto. Las cepas de referencia utilizadas como biosensor reportero: *Escherichia coli* pSB401, pSB1142 y *Pseudomonas aeruginosa* pqsA-lux, fueron proporcionadas gentilmente por el Dr. Cámara y el Dr. Heeb (Center for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, United Kingdom) (Tabla 5).

La preparación de los cultivos consistió en la siembra inicial de las cinco cepas en medio agar LB con incubación durante toda la noche. De cada cultivo se seleccionó una colonia individual y se sembró en tubos de ensayo con 5 mL de medio caldo LB, seguido de incubación con agitación permanente a 200 rpm a 30°C y durante toda la noche. A cada cultivo se le midió la densidad óptica a 600 nm y posterior ajuste a un DO = 1.0. De cada cultivo se transfirieron 0.25 ml a Erlenmeyer con 25 mL de caldo LB, con incubación a 37°C y 200 rpm por 8 horas. Las cepas referencia se mantuvieron en agar LB (Fletcher et al. 2007; Pontes et al. 2008).

2.1.2. Extracción de AHLs de cultivos bacterianos

La extracción de AHLs se hizo por centrifugación de 10 ml de cada cultivo obtenido en medio caldo LB a 10000 rpm por 10 minutos y a 4°C, con el fin de obtener la separación de la masa de células y del sobrenadante (Fletcher et al., 2007).

2.1.3. Extracción del sobrenadante

El sobrenadante resultante se esterilizó por filtración utilizando un filtro miliporo de 0,22 µm, el filtrado se colectó en un tubo Falcón de 50 mL, luego se agregó 10 ml de acetato de etilo acidificado y se agitó en vortex por 30 segundos para mezclar bien las 2 fases (Fase orgánica/Fase acuosa). La mezcla homogenizada se transfirió a un embudo de

separación previamente lavado con acetona para permitir la separación de las dos fases, la fase acuosa (inferior) se transfirió a un tubo Falcón y la fase orgánica (superior) correspondiente al extracto se almaceno en tubos falcón de 50 ml limpios. Una vez obtenidas las fases orgánicas de cada muestra, se secaron en rotaevaporador utilizando balones de 50 mL lavados previamente con acetona. A cada balón con la muestra seca se añadió 0.5 ml de metano, seguido de agitación por 30 segundos y transferencia a viales de 2 ml. Se repitió esta etapa 2 veces más (Vol. final 1.5 ml).

2.1.4. Moléculas estándar y cepas biosensores

Las moléculas sintéticas AHL y AHQ, N-3-Oxo-Dodecanoil-L-Homoserin Lactona (OdDHL), N-3-Oxo-hexanoil-L-Homoserin Lactona (OHHL), 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2-heptil-4-hidroxiquinolina (HHQ) se utilizaron como moléculas estándar y fueron proporcionadas por el Dr. Miguel Cámara y Stephen Hebbs (Bioscience School of Nottingham University, Reino Unido) (Tabla 5) (El-Sayed, Hothersall, & Thomas, 2001; Y. H. Li & Tian, 2012; Pesci et al., 1999; Winson et al., 1998).

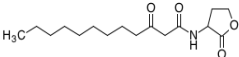
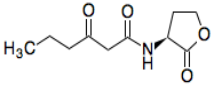
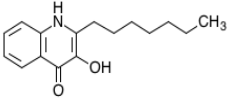
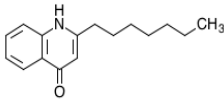
Nombre Químico	Sinónimos	Formula molecular	Estructura química	Identificación KEGG	Masa isotópica	Actividad	Ref
N-3-Oxo-Dodecanoil-L-Homoserin Lactona	OdDHL	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄		C11840	298.2012	Formación de biofilm, producción de antibióticos, bioluminiscencia	El-Sayed et al. 2001; Li & Tian, 2012; Kim & Yeon, 2018
N-3-Oxo-hexanoil-L-Homoserin Lactona	OHHL	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄		C21198	214.1074		
2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona	PQS	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂		C11848	260.1651	Formación de biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , exoenzimas y regulación de sideroforos	Pesci et al. 1999; Kim et al. 2010; Kim & Yeon, 2018;
2-heptil-4-hidroxiquinolina	HHQ	C ₁₆ H ₂₁ NO		C20643	244.1715	Formación de biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Regulación Respuesta inmune hùesped	Pesci et al. 1999; Kim et al. 2010
Biosensor	Biosensor	Cepa	AHL detecta	Señal		Reportero	Ref
psB1142	psB1142	<i>E. coli</i>	OdDHL			LuxCDABE	Winson et al. 1998
psB401	psB401	<i>E. coli</i>	OHHL	Bioluminiscencia		LuxCDABE	
pqsA-lux	pqsA-lux	<i>P. aeruginosa</i>	PQS y HHQ			pqsABCDE	Fletcher et al. 2007

Tabla 5. Listado de moléculas sintéticas QS y biosensores utilizados en bioensayos de detección en TLC y UHPLC-MS.

2.1.5. Corrida de las muestras en Cromatografía de capa fina (TLC)

Los extractos obtenidos se corrieron utilizando la técnica de cromatografía de capa fina. A cada extracto seco se adicionó 100 μ L de metanol y los estándares se llevaron a concentraciones de 1mM: odDHL y 0.1mM: OHHL, PQS y HHQ utilizando como solvente metanol. De cada muestra a evaluar y de los estándar se tomaron 5 μ l y se aplicaron en la placa, la fase móvil se preparó con una solución de Diclorometano: Metanol, para esto se adicionaron aproximadamente 500 mL de Diclorometano: Metanol a la cámara TLC, luego la placa se puso en contacto con la fase móvil y se dejó correr hasta que ésta alcanzara una altura de aproximada de 2 cm antes del extremo superior de la placa, la placa se dejó a temperatura ambiente durante algunos minutos hasta que seicara completamente y finalmente se expuso en cámara de luz UV y luz verde para visualizar el corrido de las muestras en ella.

2.1.6. Detección con biosensor de moléculas QS en placa TLC

Posterior a la corrida de las muestras en la placa TLC, las placas fueron selladas en los bordes con cinta con el fin de crear una especie de pozo, seguido de la adición de medio agar LB al 0.65% (p/v) que contiene los bioreporteros **hasta cubrir completamente la superficie de la placa y posterior incubación** a 37 °C por 6 a 10 horas. La bioluminiscencia es visible únicamente en la completa oscuridad, y detectada con autoradiografía de rayos X (Fletcher et al. 2007). Los patrones de migración (R_f) visualizados se compararon entre ellos y con moléculas QS AHLs control. El valor de migración R_f se calculó de acuerdo con la fórmula $R_f=X/Y$, donde (X): es la distancia calculada desde el origen de la muestra hasta la del patrón de la molécula detectada; (Y): el Corrido de la muestra desde el origen hasta el final de la placa de sílica gel.

2.1.7. Caracterización de las moléculas de interés por UHPLC/MS

Para la caracterización de las moléculas de interés se utilizó la técnica UHPLC. Se utilizaron dos tipos de buffers: buffer A: 100% Agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico y buffer B: 100% Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico, manteniendo una temperatura de 40°C. Para la aplicación del método UHPLC se mantuvo inicialmente un flujo isocrático con 5% de buffer B durante 3 minutos, cambió de 5% al 20% de buffer B por 1 min, aplicación de un gradiente de 20% al 95% de buffer B por 18 minutos, se mantuvo esta condición durante 3 minutos y se retornó a la condición inicial por 3 minutos más, para un tiempo total de 32 minutos. Las muestras fueron inyectadas en volúmenes de 1 uL y separadas por cromatografía de fase reversa utilizando el equipo Ultimate 3000 de Thermo®, con una columna Reprosil-Pur Basic C18 marca DR Maisch, acoplado a un equipo Impact II ESI-QTOF de Bruker® en modo MRM tomando como base los iones (M+H) 200.1281, 214.1073, 298.1073, 244.1695 y 260.1650, que corresponden a HHL, OHHL, OdDHL, HHQ y PQS. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: Dry Heater: 200°C, Nebulizer: 29 psi, Dry Gas: 8 L/min, Capillary: 4500 V, Charging Voltage: 2000 V, Fragmentor: 700Vp. Los espectros en modo MS/MS fueron colectados usando los siguientes parámetros: Rango MS (Full scan): 100-1200 m/z. Auto MS/MS en un rango: 50-1200 m/z, colectando a una tasa de 5 espectros/s con un máximo de 3 precursores seleccionados y fragmentados, con una energía de colisión de 10eV. Los espectros en búsqueda de las masas exactas del estándar y los posibles aductos con sodio y metanol se procesaron, utilizando los software Data Analysis y Target Analysis de Bruker®.

2.2. Análisis químico de las moléculas producidas por las bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate.

2.2.1. Análisis del listado de espectros por compuesto

El reporte completo de los espectros de los compuestos obtenidos fue analizado a través de la plataforma MetFrag, la cual compara los espectros, el patrón de fragmentación y masa molecular del compuesto con diferentes bases de datos, la más utilizadas fueron KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y PubChem, arrojando candidatos para la identidad de la molécula detectada.

El procesamiento de los datos consiste en agregar la lista de m/z junto a la intensidad registrada, con la masa de mayor intensidad, se carga positivamente utilizando la opción $[M+H]^+$, y finalmente se calcula e inicia la búsqueda de candidatos. Cada candidato muestra un puntaje final con base al encuentro de cada fragmento, adicional a esto nos muestra la fórmula molecular, estructura, en que otras bases de datos aparece y en qué proceso metabólico se puede encontrar, en caso de que el candidato corresponda a un metabolito secundario (Ruttkies, Schymanski, Wolf, Hollender, & Neumann, 2016).

3. Resultados

3.1. Detección moléculas de Quorum Sensing (QS) en bacterias Gram negativas usando bioreporteros

Posterior a todo el proceso de extracción de moléculas de señalización QS, se logró detectar por medio del bioensayo algunas moléculas AHL, tales como las odDHL, presentes en el sobrenadante de las cinco muestras analizadas (Tabla 6). Las OHHL se detectaron en las últimas dos cepas, mientras que la detección de las quinolonas PQS y HHQ, fue nula o muy débil.

La detección de moléculas OdDHL, en los cinco extractos del sobrenadante mostró patrones de migración (R_f) similares, al igual que para las moléculas OHHL. Caso contrario se observó con la molécula HHQ detectada en la muestra T8H6.,

La separación de moléculas por TLC nos proporciona una relación visual de las moléculas producidos por las bacterias evaluadas frente a las sintéticas (Control). Sin embargo, este tipo de moléculas como las AHL y/o AHQ no se pueden identificar únicamente mediante TLC, ya que cada una migra con un valor R_f característico, y la única forma de definir correctamente su identidad es teniendo como base las propiedades espectroscópicas (Schaefer, Hanzelka, Parsek, & Greenberg, 2000; Steindler & Venturi, 2007).

Código	Microorganismo	Biosensor			
		psB1142	psB401	pqsA-lux	
		odDHL (0.765)	OHHL	PQS*	HHQ (0.114)
		Valor (R_f)	(0.665)	Valor (R_f)	Valor (R_f)

		Valor (Rf)			
T8H6	<i>Pantoea cypripedii</i>	+	-	-	±
		(0.715)			0,294
T6H1	<i>Serratia liquefaciens</i>	+	-	-	-
		(0.713)			
T9H2(7)	<i>Moraxella osloensis</i>	+	-	-	-
		(0.681)			
T3H1(1)	<i>Pantoe agglomerans</i>	+	+	-	-
		(0.685)	(0,675)		
T9H2	<i>Sphingomonas olei</i>	+	+	-	-
		(0.693)	(0.636)		

Tabla 6. Detección de moléculas Quorum Sensing AHL y AHQ con biosensores y valores de migración (Rf) de cada molécula en placas de TLC. *Detección del control fue débil. (+) Presencia, (-) Ausencia, (±) Visualización débil de la señal.

En las figuras 9 y 10 se presentan los resultados obtenidos en las placas TLC después de ser expuestas a las diferentes longitudes de onda (verde y UV) (Figura 9) y la detección de la bioluminiscencia a través de las placas de rayos X (Figura 10), cada mancha o punto bioluminiscente nos señala la presencia del control utilizado (Columna C+) y después las muestras (columnas 1 al 5).

Figura 9. Detección de moléculas odDHL. (A) Exposición a luz fluorescente (B) Exposición a luz UV. Columnas C+: Control positivo, 1: T8H6, 2: T6H1, 3: T9H2(7), 4: T3H1(1), 5: T9H2

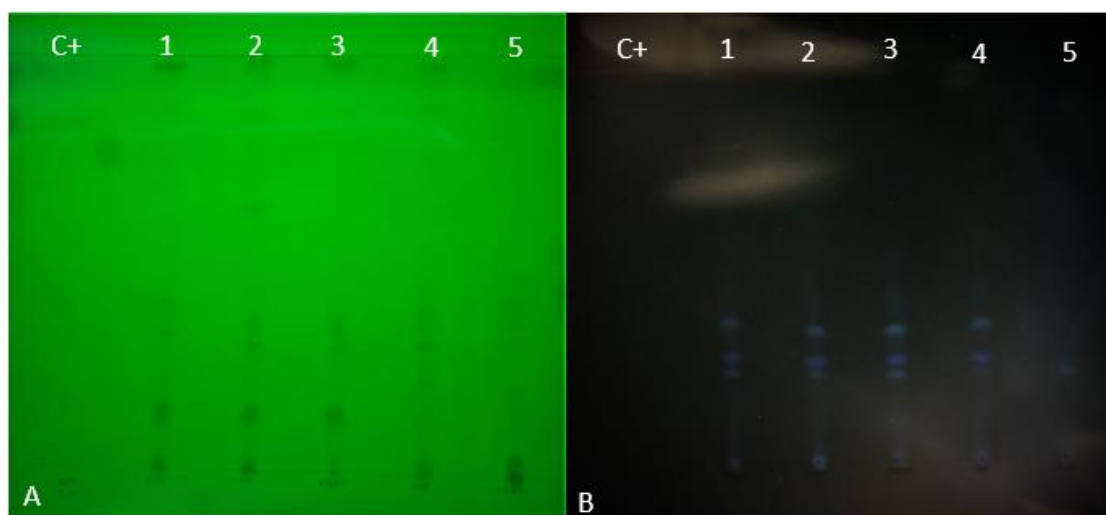
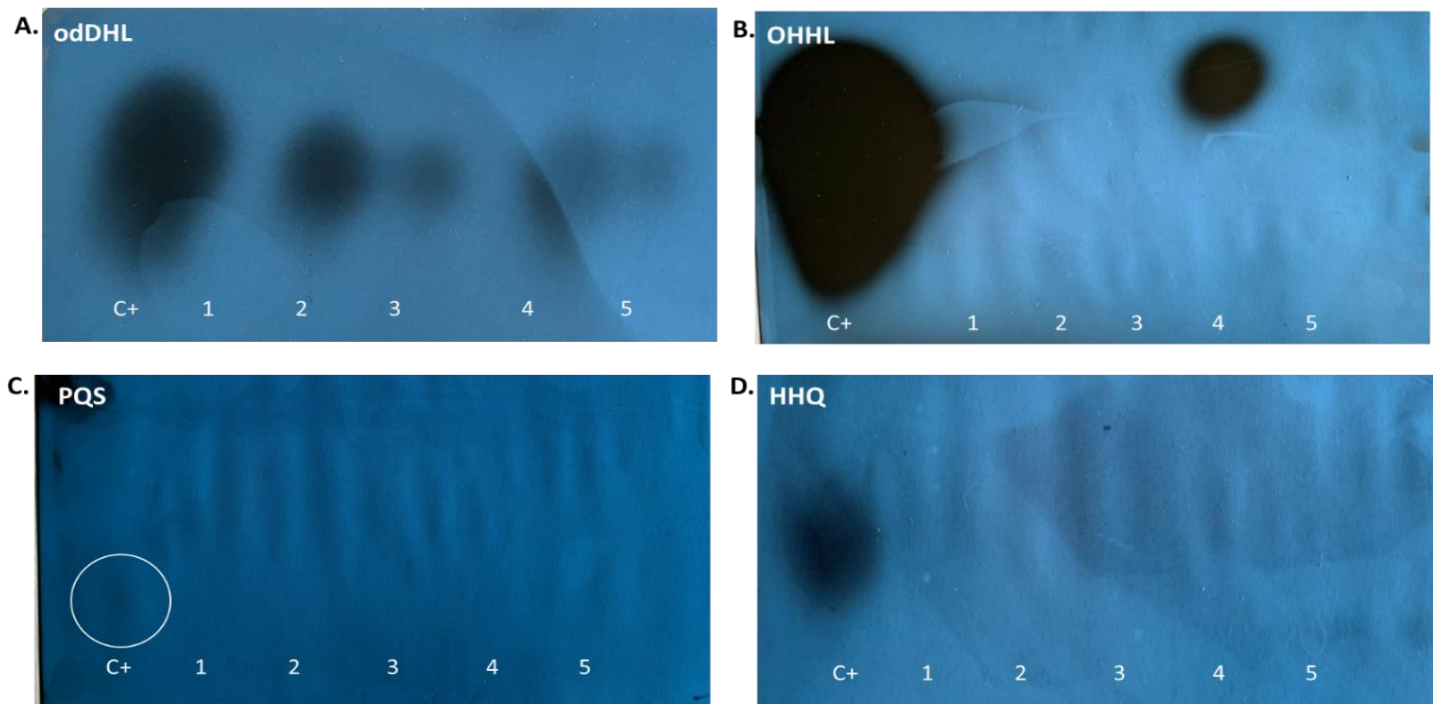
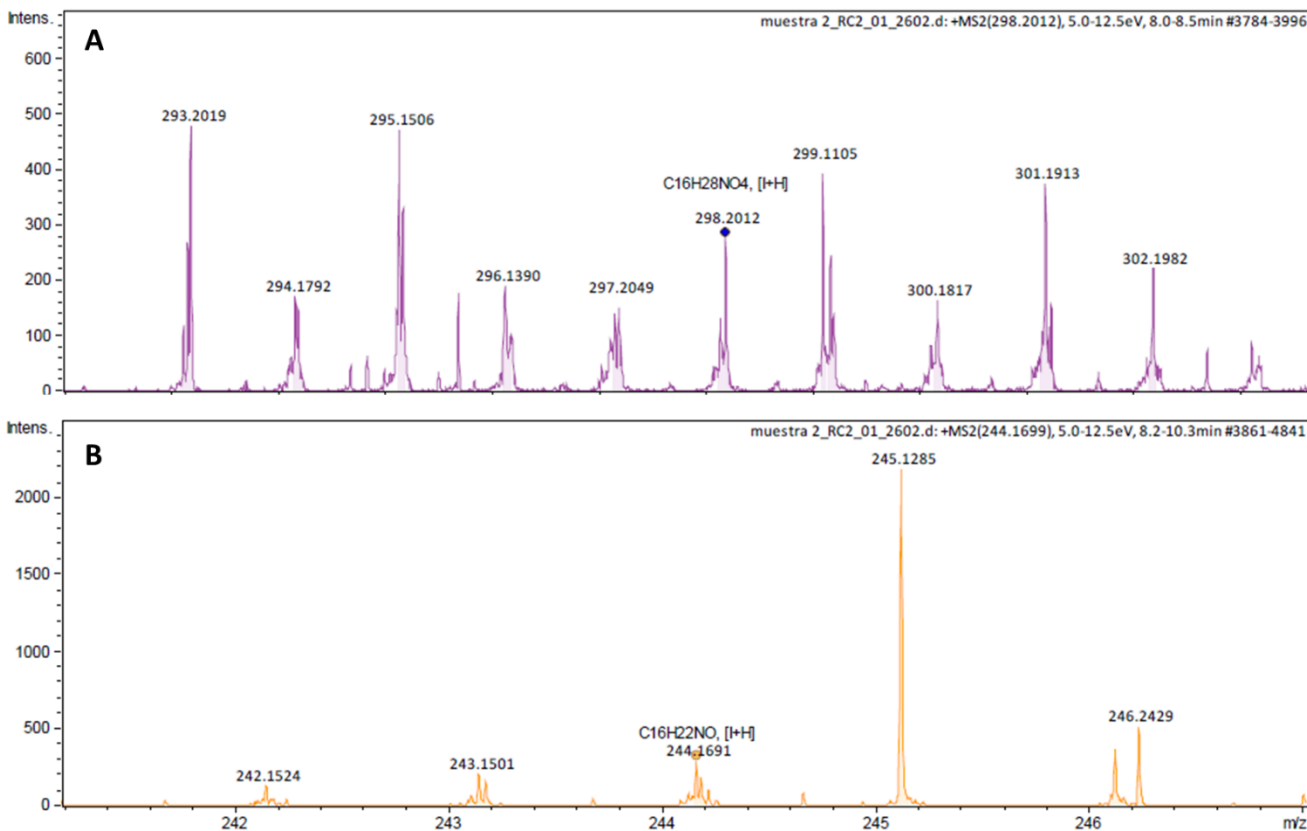


Figura 10. Moléculas AHL y AHQ detectadas por bioluminiscencia en cepas Gram negativas aisladas de trips mediante Cromatografía de Capa Fina-TLC. A. Señales de bioluminiscencia con biosensor pSB1142. B. Señales de bioluminiscencia con biosensor Psb401, C y D. Señales de bioluminiscencia con biosensor pqsA-lux. Línea 1: T8H6, Línea 2: T6H1, Línea 3: T9H2(7), Línea 4: T3H1(1), Línea 5: T9H2.



Posterior a la detección de moléculas de señalización QS en las muestras, se procedió a hacer el proceso de estandarización de las moléculas sintéticas a través de UHPLC/MS, con el fin de obtener los patrones de fragmentación y sus correspondientes masas, adicional la muestra T8H6 fue corrida y los valores de intensidad en los picos fueron inferiores a 500 en las moléculas odDHL y HHQ, para lo que se reportaría, se encontraron pequeñas trazas (Figura 11); a pesar de la débil detección se procedió a analizar el resto de las muestras.

Figura 11. Espectros de masas compatibles con las moléculas estándar de AHL y AHQ obtenidos mediante UHPLC-MRM-MS en la muestra T8H6. (A) Detección odDHL, $[M+H]^+$ =298.2012. (B) Detección HHQ, $[M+H]^+$ =244.1691.



En el análisis de las demás muestras incluso la muestra T8H6, siguiendo el mismo procedimiento se detectaron dos moléculas diferentes pertenecientes al grupo de las 2,5-Diketopiperazinas también conocidos como ciclopéptidos (Tabla 7). Si bien las moléculas sintéticas correspondientes a estos ciclopéptidos no fueron estandarizadas previamente por UHPLC/MS, el peso molecular y los patrones de fragmentación coincidieron en, por lo que se podría considerar su posible presencia en las muestras; además, cabe resaltar que estas moléculas son producidas por bacterias tanto Gram positivas como negativas y que han sido relacionadas con procesos de QS, entre otras actividades biológicas previamente descritas.

Molécula	Formula	Estructura	Identificación KEGG
----------	---------	------------	---------------------

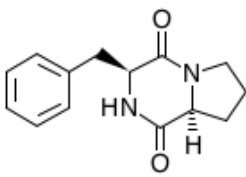
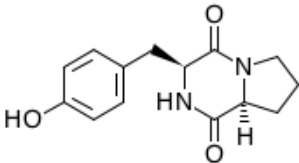
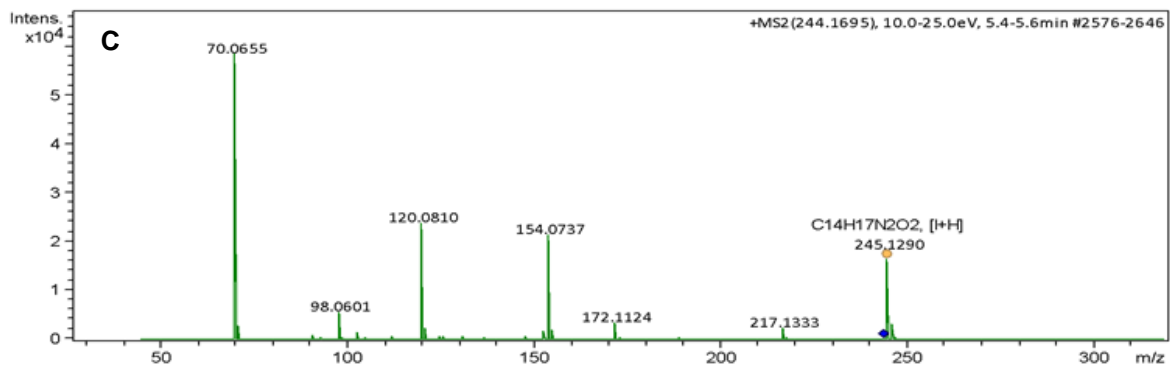
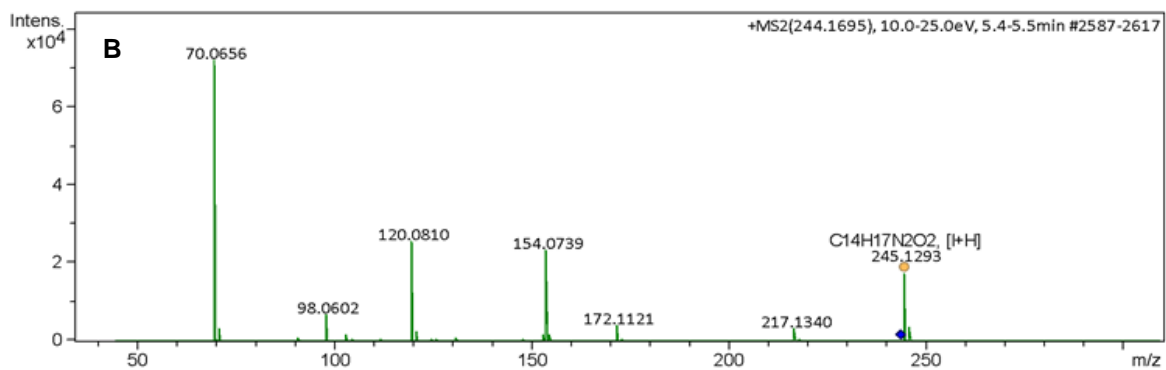
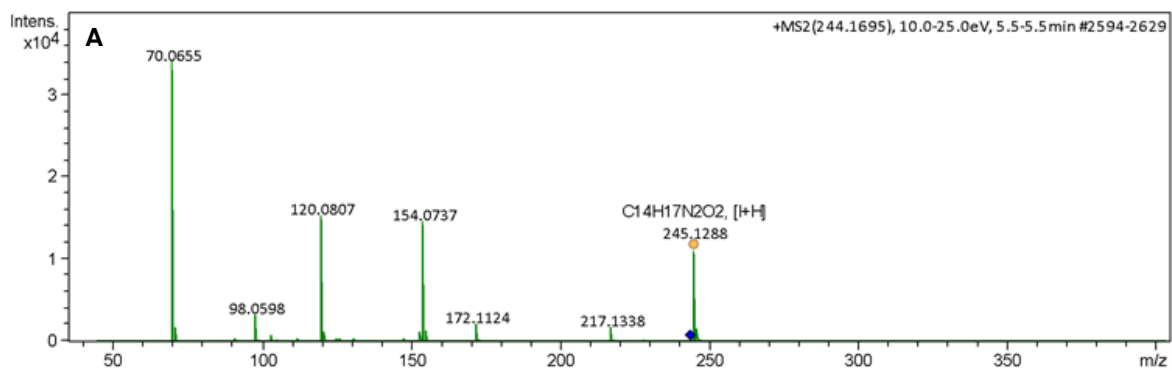
Cyclo(L-Phe-L-Pro)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂		C11847
Cyclo(L-Pro-L-Tyr) Maculosina	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃		C10605

Tabla 7. Moléculas identificadas con base en datos de KEGG.

3.2. Análisis químico de las moléculas producidas por las bacterias Gram negativas aisladas de trips provenientes de cultivos de aguacate.

En las figuras 12 y 14 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis químico de los ciclopéptidos detectados en las muestras, la detección de los ciclopéptidos Ciclo (L-Phe-L-Pro) y Ciclo (L-Pro-L-Tyr) tuvo como valores máximos de intensidad 2×10^4 y 1.2×10^4 , respectivamente; valores que fueron significativos para el análisis de estas moléculas. Adicionalmente, al analizar los datos comparando los patrones de fragmentación y las correspondientes masas de cada pico, además de la masa exacta correspondiente a la molécula en el listado de espectros, permitió determinar que la molécula detectada podría corresponder a lo reportado en la base de datos; sin embargo, es importante tener en cuenta que sin la moléculas control (sintéticas), es difícil garantizar por completo la presencia de estas, ya que estas nos ofrecen un patrón de fragmentación específico para el ensayo.

Figura 12. Espectros de masas correspondientes a la molécula Ciclo(L-Phe-L-Pro) obtenida en los extractos bacterianos de las cepas Gram negativas a través UHPLC/ MS. A) T3H1(1), [M+H] = 245.1288, B) T8H6, [M+H] = 245.1293, C) T9H2(7), [M+H] = 245.1290, D) T9H2, [M+H] = 245.1291, E) T6H1, [M+H] = 245,1296



65 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

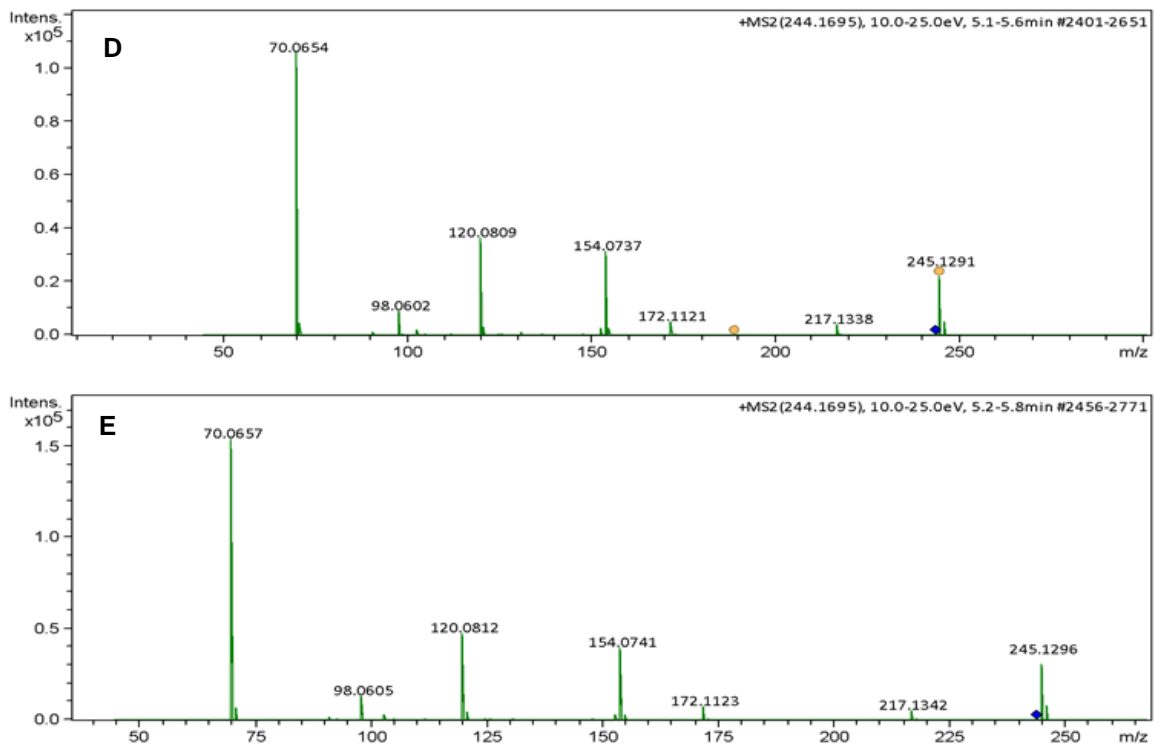
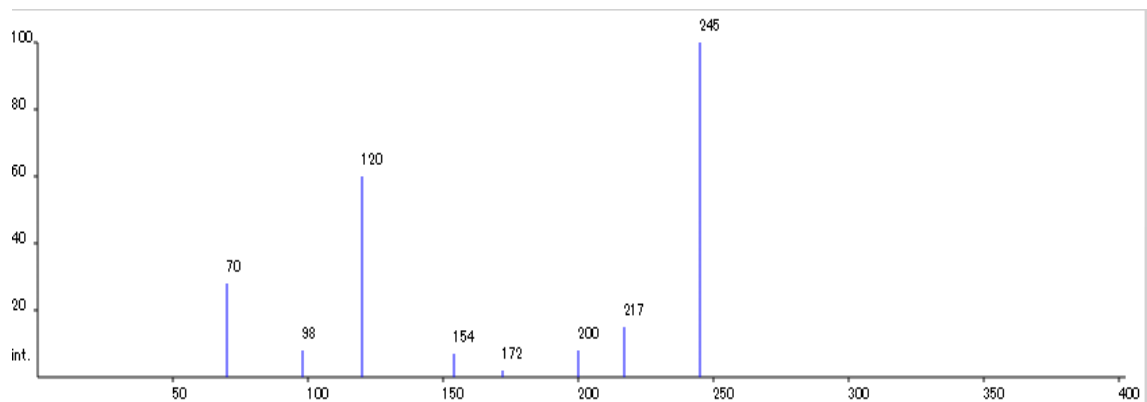


Figura 13. Patrón espectrometría de masas reportado en base de datos PubChem y ReSpect.

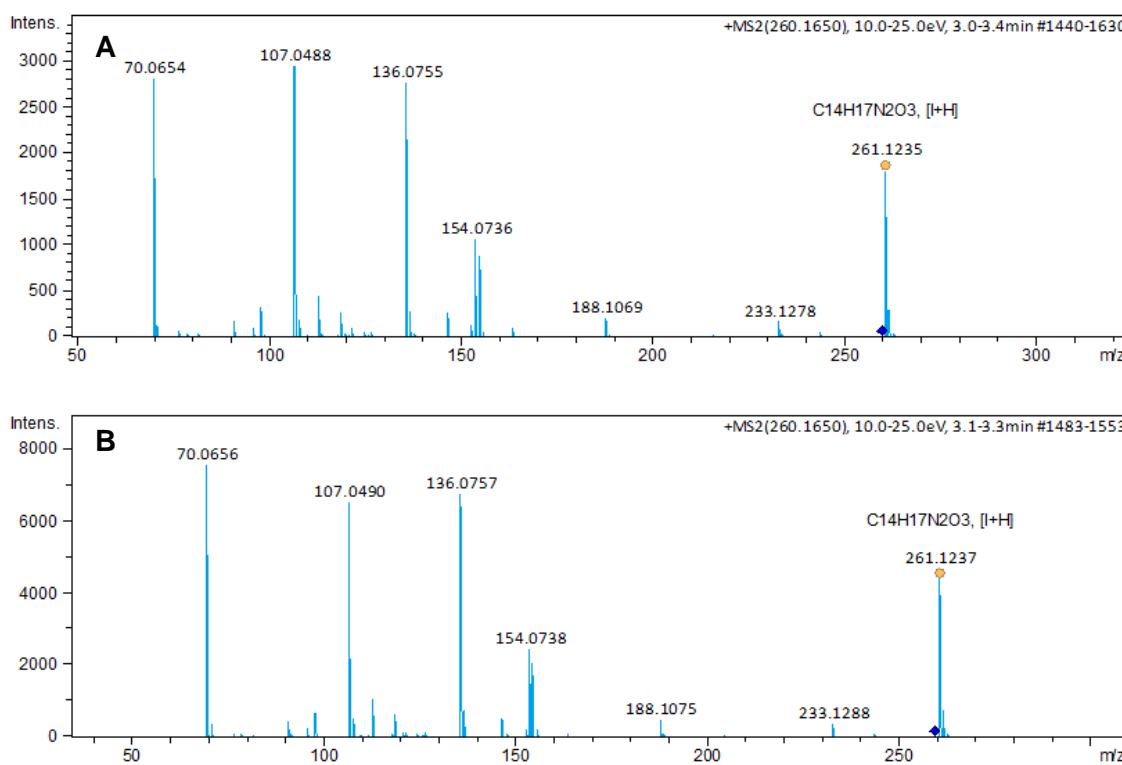


En la Figura 12, se puede observar el patrón de fragmentación de Ciclo(L-Phe-L-Pro) en la muestras, se lograron detectar siete fragmentos principales de ocho en total, entre el pico mayor detectado, se logran observar otros más pequeños que lo acompañan y corresponden a algunos variantes isotópicos, lo que al final permitió determinar que se compartían hasta 19 fragmentos. En la Figura 13, el espectro reportado en la base de PubChem y ReSpect (Marinas et al., 2010; RIKEN MSn spectral database for

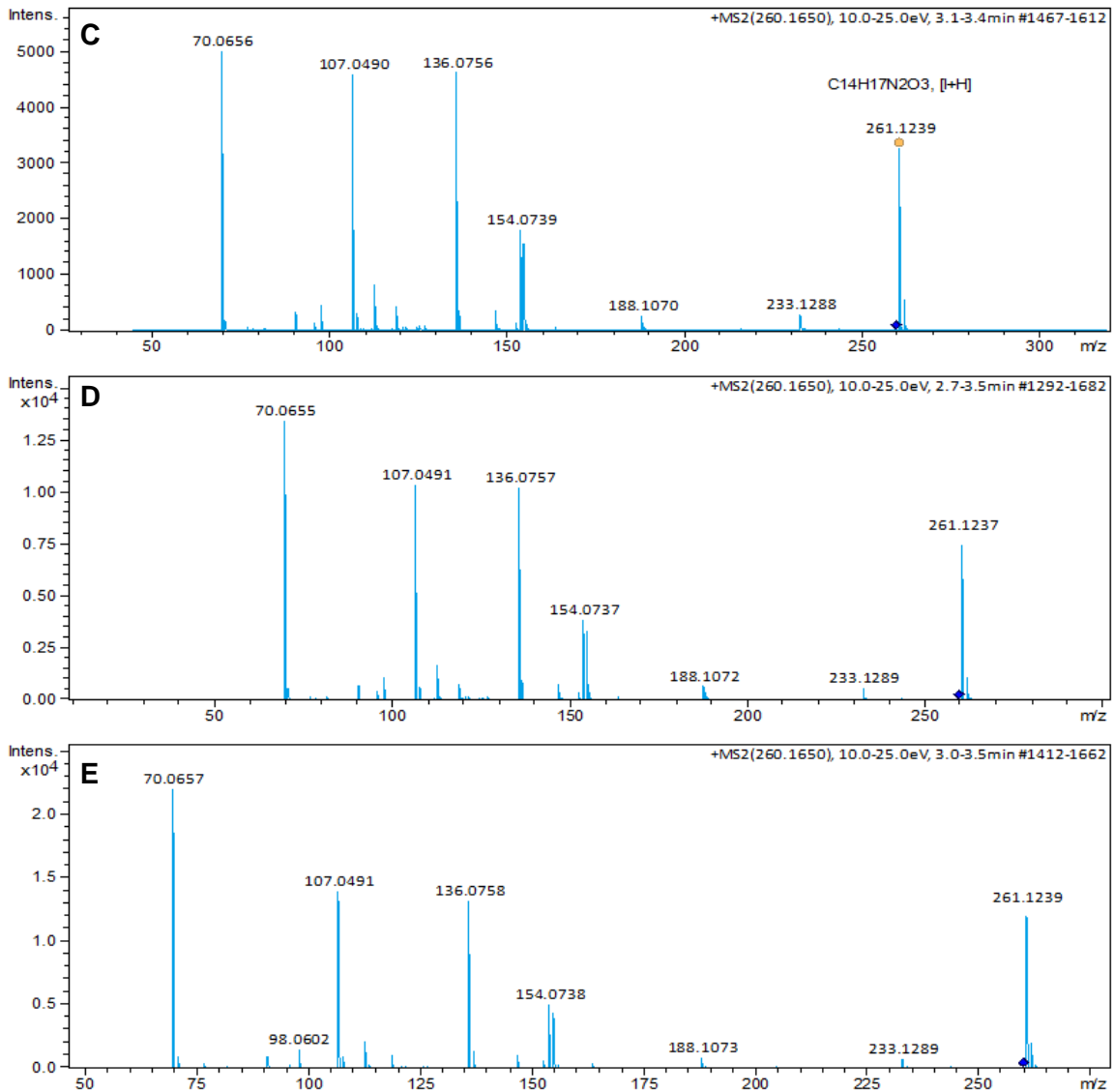
phytochemicals(ReSpect), 2008), nos permite determinar claramente la coincidencia en los picos, mostrando como única variación las intensidades características de cada muestra. El pico del ion 200 fue el más difícil de detectar, y como se observa en el espectro reportado, suele tener niveles bajos de intensidad, lo que puede dificultar su detección.

En cuanto al Ciclopéptido Ciclo(L-Pro-L-Tyr) también conocido como Maculosina, se detectó en todas las muestras, presentando coincidencias en la totalidad de los fragmentos, por ejemplo, para la muestra T6H1 se lograron detectar los 8 picos principales y junto con las variantes isotópicas se obtuvieron 20 fragmentos compartidos (Figura 14E).

Figura 14. Espectros de masas correspondientes a la molécula Ciclo(L-Pro-L-Tyr) obtenida en los extractos bacterianos de las cepas Gram negativas a través UHPLC/ MS. A) T3H1(1), $[M+H] = 261.1235$, B) T8H6, $[M+H] = 261.1237$, C) T9H2(7), $[M+H] = 261.1239$, D) T9H2, $[M+H] = 261.1237$, E) T6H1, $[M+H] = 261.1239$

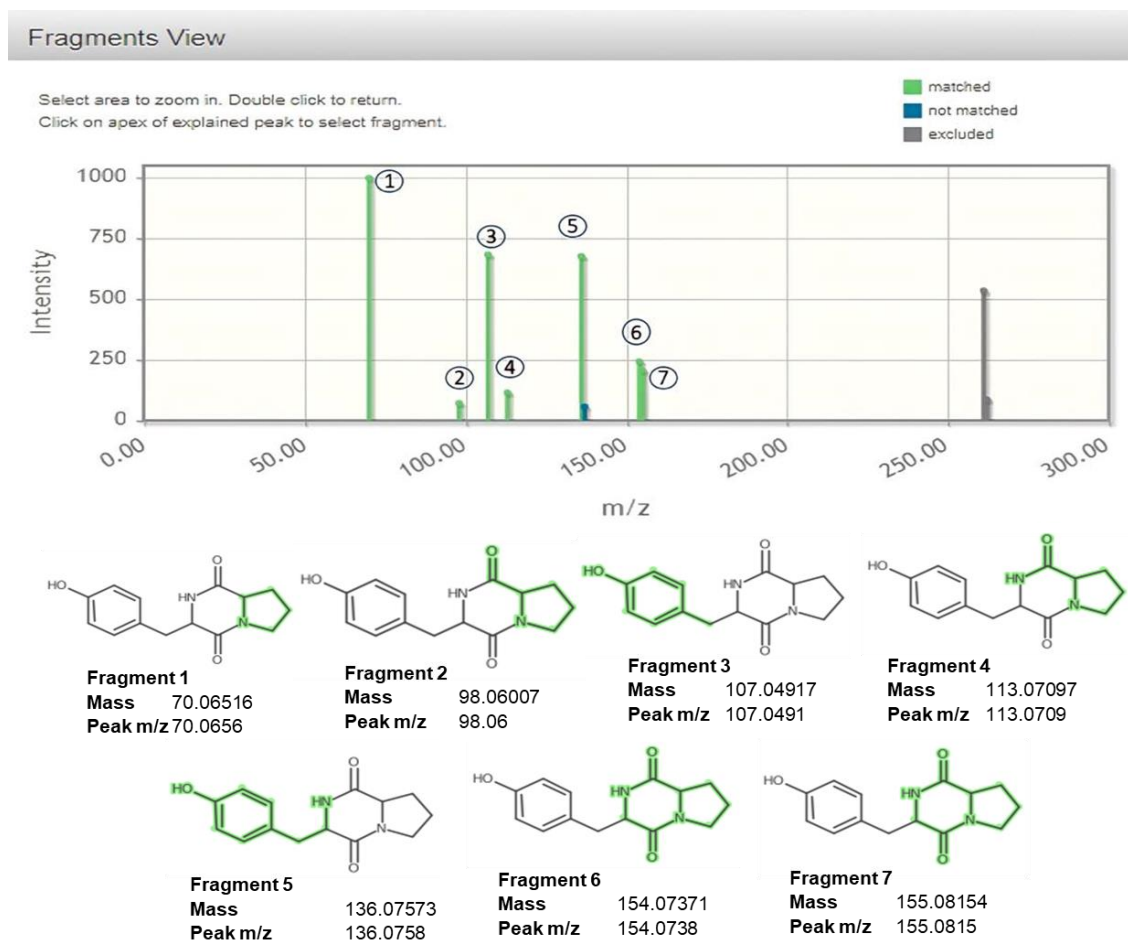


67 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing



La información espectral de Ciclopéptido Ciclo(L-Pro-L-Tyr) no está disponible en espectrometría de masas si no en RMN lo cual no permite comparar el patrón de fragmentación. Sin embargo, a través de MetFrag, un software que permite trabajar en la anotación de espectros de masas de alta precisión se logró identificar los dos ciclopéptidos descritos y para el caso de la Maculosina, el software permitió comparar el patrón de fragmentación generado contra aquellos reportados en la base de datos de KEGG, adicional a esto, genera imágenes que indican a que parte de la molécula corresponde cada pico/fragmento (Figura 15).

Figura 15. Patrón de fragmentación Ciclo(L-Pro-L-Tyr) obtenido por UHPLC/MS en la muestra T6H1 por MetFrag.



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es importante conocer un poco más sobre estas moléculas y su actividad biológica, las diketopiperazinas (2,5-DKP), también conocidos como ciclopéptidos son moléculas orgánicas que se generan principalmente por la condensación de dos α -aminoácidos y son bastante abundantes en la naturaleza. Estas moléculas muchas veces se pueden encontrar como metabolitos producidos por diversos organismos como bacterias, hongos, plantas e incluso mamíferos (Borthwick, 2012). Son estructuralmente rígidas y tienen múltiples aceptores de enlaces H, funcionalidad donante, además de múltiples sitios para modificaciones estructurales con diversos grupos funcionales, estas características fisicoquímicas les permiten unirse con alta afinidad a una gran variedad de receptores, mostrando una amplia gama de actividades biológicas (Borthwick, 2012; Mishra et al., 2017).

Algunas actividades biológicas reportadas incluyen aplicaciones médicas como inhibidores de oxitocina, del cáncer, agentes neuroprotectores, antivirales, producción de antibióticos, actividades antibacteriales y antifúngicas, incluso bioherbicidas (Sansinenea et al., 2016). Estas actividades se atribuyen principalmente a la composición de cada ciclopéptido, aquellos que poseen como base la prolina suelen ser altamente estable gracias a su estructura rígida (Borthwick 2012; Sansinenea et al. 2016).

Las moléculas detectadas (Tabla 7) se encuentran entre los derivados aromáticos de la prolina y estos en su mayoría han sido reportados en actividades de Quorum sensing (Campbell et al., 2009; Fletcher et al., 2007; Holden et al., 1999; Park et al., 2006; Wattana-Amorn et al., 2016), antagonismo y actividad antibacterial y antifúngica (Borthwick, 2012; Sansinenea et al., 2016; Ström et al., 2002; Thissera et al., 2020; Wattana-Amorn et al., 2016).

4. Discusión

Las moléculas de señal QS son químicamente diversas, podemos encontrar las N-acil homoserina lactonas (AHL), péptidos, furanonas, AHQs, DKPs, entre otras; incluso estas moléculas pueden representar solo un pequeño porcentaje de todas las que pueden existir (Fletcher et al. 2007). Las AHL son los principales autoinductores secretados por bacterias Gram negativas, y hasta el momento se han detectado más de 30 modelos de QS, los cuales suelen involucrar homólogos de proteínas reguladoras que se denominan LuxR, estas proteínas al unirse con las AHL en el espacio intracelular, controlan la expresión fenotípica de varios genes que dan como resultado la formación de biopelículas, producción de enzimas, producción de antibióticos, bioluminiscencia y factores de virulencia (Kim & Yeon, 2018; Zhou et al., 2019).

Especies bacterianas del género *Pantoea*, se han reportado en algunos estudios como productoras de moléculas AHL parte de su sistema de señalización QS, este género posee diversas especies que pueden tener efectos positivos, como la capacidad de producir diversos antimicrobianos que son utilizados actualmente en el control biológico de fitopatógenos, también algunas tienen potencial de biorremediación, por su capacidad de degradar herbicidas sin generar subproductos tóxicos, incluso algunos aislados se han

aprovechado como inmunopotenciadores para el desarrollo de fármacos; pero también se han identificado otros efectos negativos, al ser reconocidos fitopatógenos de diversos cultivos de interés agrícola, y también diversas afecciones en humanos y animales, en ambos casos los mecanismos de comunicación han sido detectados. En los estudios realizados por (Pomini, Araújo & Marsaioli 2006; Pomini, Paccola-Meirelles, and Marsaioli 2007) se reportó la producción de OOHL, HHL y BHL en la especie fitopatógena *P. annanatis*, indicando la posibilidad de que estas moléculas tengan como función acelerar el proceso de colonización de una superficie, para el caso de las especies fitopatógenas el área de la filosfera y el desarrollo de la enfermedad en el huésped.

También se ha estudiado la producción de moléculas AHL por una cepa de *P. agglomerans* encontrándose que regula la formación de “symploasmata” (Jiang et al., 2015), un ejemplo de multicelularidad entre las bacterias, que consiste en la capacidad de formar grupos multicelulares en cepas de *P. agglomerans* colonizadoras de la filosfera de diversas plantas, se ha observado la formación de estas estructuras directamente en la superficie de raíces, hojas y en los tejidos vegetales (Tecon & Leveau, 2016). Aunque aún, no se conoce exactamente la función que puede tener la formación de estas estructuras, se cree que les brinda la capacidad de tolerar ambientes adversos y colonizar superficies, esta característica podría tener una relación cercana con uno de los mecanismos de antagonismos descritos en el presente estudio, respecto a la rápida colonización y absorción de los nutrientes disponibles.

Un estudio realizado por Chalupowicz et al., (2008), demostró que una cepa de *P. agglomerans* produjo principalmente BHL y señales más débiles OHHL y OdDHL, como parte del sistema regulador de detección de QS, mecanismo que forma parte del proceso de infección y desarrollo de agallas en plantas huésped. Todo lo anterior nos indica claramente que las especies del género *Pantoea*, utilizan los sistemas de señalización QS a través de la producción de moléculas AHL para la expresión fenotípica de genes que regulan la formación de biopelículas tanto en bacterias patógenas como en bacterias promotoras del crecimiento vegetal, factores de virulencia como producción de exopolisacáridos, incluso en la producción de otros metabolitos secundarios característicos de este género.

Serratia liquefaciens como se indicó previamente, ha sido aislada de diferentes fuentes, y una de sus características importantes son contribuir en procesos de biorremediación,

promoción del crecimiento vegetal, y la formación de biopelículas; proceso que involucra sistemas de señalización QS, lo que permiten que estas se formen y mantengan un adecuado funcionamiento entre la misma población o con otras bacterias que la conformen. En un estudio realizado por Labbate et al., (2004) concluyeron que el proceso de colonización a través de movilización en enjambre está regulado por la producción de moléculas BHL (C4-HSL), que también dirigen la formación de biosurfactantes. Los resultados obtenidos permiten proponer la capacidad adicional que tiene esta especie para producir la molécula OdDHL, y no se descarta la posibilidad de que la cepa produzca BHL, ya que esta no fue evaluada.

El género *Spingomonas* sp., ya ha sido identificado previamente en la microbiota de una especie de trips, *Scirtothrips dorsalis* (Dickey et al., 2014), aunque no se da más información sobre su posible función. Estas bacterias también se han aislado de diversas fuentes como suelo, raíces de plantas, muestras clínicas, aguas, lodo activado, sedimentos, vertederos de hexaclorociclohexano, aguas y suelos contaminados con petróleo, entre otros (Chaudhary and Kim 2017). La especie *Spingomonas olei* específicamente ha sido reportada principalmente por su contribución en procesos de biorremediación al degradar hidrocarburos alifáticos e incluso petróleo crudo (Chaudhary & Kim, 2017; Koolivand et al., 2019).

Sobre otras especies de este género se conocen algunos estudios asociados al sistema QS. Saeb, (2016), estudió una cepa de *S. wittichii*, de gran interés por sus habilidades en procesos de biorremediación, en su estudio determinó la presencia de genes homólogos de virulencia compartidos con especies patógenas de humanos, entre ellos detectaron el sistema de QS rh1, este sistema en *Pseudomonas* sp., tiene influencia en la formación de biopelículas en el sistema de secreción xcp (secreción de enzimas y toxinas extracelulares) y de biosurfactantes, por lo cual se cree que esta cepa tiene un potencial en biorremediación.

Moraxella, por otro lado, es un género asociado principalmente a enfermedades en humanos y animales, del cual hay muy pocas especies reconocidas y en su mayoría han sido aisladas de muestras clínicas, siendo *M. osloensis* la de mayor relevancia médica, y aunque se ha reportado en diversas infecciones aún no se tiene claro que tan patógena

puede ser (X. Yang, 2014); sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Armbruster et al., (2010) concluyeron que *Haemophilus influenzae* promueve el desarrollo de una especie de *Moraxella*, en las biopelículas polimicrobianas a través de la señalización con AI-2. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que los reportes asociados a sistemas de señalización QS y producción de moléculas AHL asociados a *S. olei* y *M. osloensis* no son abundantes, por ende, este estudio aporta información que complementa el conocimiento de los sistemas de señalización QS y las moléculas utilizadas por bacterias Gram negativas en especial las cepas analizadas.

Las bacterias a través del sistema de señalización QS pueden dar lugar a diversos tipos de moléculas, lo cual hace necesario su identificación y caracterización. Las moléculas AHL y AHQ, se han detectado a través de técnicas de cromatografía de capa fina (TLC), método que combinado con el uso de un biosensor permite ver la respuesta a través de bioluminiscencia en presencia de estas moléculas. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en varios estudios de QS; sin embargo, posee algunas desventajas que se deben tener en cuenta, por ejemplo, no permite separar correctamente algunas moléculas de señalización, lo que puede dar lugar a falsos negativos y positivos, también los biosensores utilizados pueden responder a señales diferentes a la específica y la respuesta puede variar en intensidad lo cual no es indicio de que una muestra tenga mayor concentración que otra, lo cual podría explicar los resultados obtenidos en la detección de bioluminiscencia en las moléculas control de PQS y HHQ, donde la señal observada fue débil y se podría atribuir a la respuesta del biosensor (Fletcher et al. 2007; Ortori et al. 2011; Pomini, Araújo & Marsaioli 2006).

Aunque, los bioensayos nos permiten hacer un tamizaje rápido de moléculas de señalización QS, se requieren métodos más precisos y sensibles que proporcionen información clara sobre la estructura y la identidad de las moléculas detectadas. Adicionalmente, que permita comparar los datos espectrales de las moléculas sintéticas con los obtenidos, lo que llevo en el presente estudio a hacer pruebas mediante UHPLC/MS (Pomini, Araújo & Marsaioli 2006; Ortori et al. 2011, 2014), y se encontró que los picos obtenidos tenían intensidades inferiores a 1000, valores muy bajos que nos llevan a hablar de la presencia de trazas, dificultando la caracterización de la molécula, un problema que ha sido reportado previamente por otros investigadores.

Dificultades en la caracterización de moléculas de señalización QS, fue previamente reportado en un estudio hecho por Ortori et al., (2011), se encontró que los picos especialmente para las moléculas AHQ, eran muy bajos y una forma de corregir este tipo de resultados fue aumentando la concentración del extracto a analizar y modificando las características de la columna. Contrario a lo obtenido en nuestra investigación, en el trabajo de Ortori et al. (2011) los picos para las moléculas AHL fueron normales. Para nuestro caso, se hizo una modificación del protocolo con el fin de aumentar la señal de las moléculas AHL y AHQ en las muestras, utilizando nuevamente el sobrenadante obtenido en el paso de la preparación de los cultivos y ajustando las condiciones de manera que se mantuvieran las mismas proporciones, con el objetivo de que si estas moléculas estaban presentes en el medio, se indujera la producción de las mismas; sin embargo, esto llevo a obtener nuevamente una señal débil o nula de las moléculas. Un resultado diferente se obtuvo para los ciclopéptidos, los cuales mantuvieron su señal aun en las pruebas de inducción. La presencia de señales débiles (picos bajos) para las moléculas AHL se podrían atribuir a algunos factores asociados con la degradación de estas moléculas, de los que se han descrito principalmente tres mecanismos: 1) el químico donde cambios en el pH pueden hacer que el anillo lactonado se abra, resultando en su mayoría en el no reconocimiento de la molécula, 2) metabólica en el cual se ha registrado que algunas bacterias metabolizan estas moléculas para su crecimiento y 3) enzimática en el que algunas enzimas puede degradar o inactivar completamente estas moléculas (Huang et al., 2016; Kalia & Purohit, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, se podría plantear la hipótesis de que existe una posible degradación química o metabólica en estas moléculas, lo que estaría generando una detección inicial débil y/o nula, con igual resultado para las posteriores muestras; sin embargo, es necesario hacer estudios a futuro que permitan confirmar si estos factores están influyendo en los resultados obtenidos para las muestras analizadas.

Por otro lado, la detección de los ciclopéptidos también podría explicar la dificultad al detectar moléculas AHL, ya que se ha reportado que pueden tener una actividad de agonismo y/o antagonismo en sistemas de QS en bacterias Gram negativas, uno de los primeros estudios en describir estas actividades fue el de Holden et al. (1999), quienes purificaron e identificaron tres DKP (Ciclo (Val- Δ -Ala), Ciclo (L-Phe-L-Pro) y Ciclo (L-Tyr-L-

Pro) a partir de sobrenadantes libres de células de bacterias Gram negativas, y demostraron que estos compuestos son capaces de activar biosensores AHL basados en lux y la formación de “enjambre” en *S. liquefaciens*. Adicional, Holden et al. (1999) hicieron investigaciones sobre la competencia entre las moléculas AHL y DKP, y encontraron que los tres ciclopéptidos antagonizan OHHL, sugiriendo que éstos compiten por el sitio de unión en LuxR. Un mecanismo similar fue reportado en otros estudios, donde se aislaron de diferentes bacterias Gram negativas, entre ellas algunas promotoras de crecimiento vegetal, bacterias patógenas, y los DKP obtenidos fueron capaces de activar diversos biosensores e incluso otros patógenos (Degrassi et al., 2002; Park et al., 2006).

Adicionalmente, Campbell et al., (2009) diseñaron una biblioteca de DKPs para determinar las características estructurales necesarias para la activación e inhibición de proteínas de tipo LuxR e indagar sus mecanismos de acción. Los autores encontraron que las DKPs naturales muestran actividades antagonistas débiles con respecto a los sintéticos en ensayos con biosensores bacterianos, y experimentos adicionales sugieren que estos DKP no compiten con la señal de OHHL, si no que interfieren con la propia enzima luciferasa, ya que en presencia de esta molécula la actividad de la luciferasa se redujo en un 80%.

Al final aún no se ha logrado establecer claramente la función y el mecanismo de estas moléculas en procesos de comunicación bacteriana y se necesitarán más investigaciones para identificar su origen biosintético. Sin embargo, la producción de estas moléculas por algunos de los géneros bacterianos aquí evaluados ya se ha reportado previamente, caso particular de la bacteria *Sphingomonas* sp., aislada de lodo marino que produce ciclo(L-Pro-L-Phe), el cual funciona como una molécula de señalización QS que además promueve la producción de goma gellan en comparación con los grupos de control (Zhu et al., 2019). En un segundo estudio hecho con la bacteria *P. agglomerans*, utilizando la técnica de cocultivo, se observó que suprime la producción de metabolitos secundarios en el hongo fitopatógeno *Penicillium citrinum*, dando como resultado la formación de nuevos metabolitos, algunos con actividad antifúngica, sideróforos y también moléculas de señalización QS como DKPs y HHQ (Thissera et al. 2020).

La base de prolina en la composición de estos DKPs les confiere a estas moléculas algunas actividades antibacterianas y antifúngicas, entre otras; en un estudio hecho por Ström et al. (2002) se aisló una cepa de *Lactobacillus plantarum*, la cual fue capaz de producir tres compuestos antifúngicos, uno de ellos Ciclo(L-Phe-L-Pro), con acción

inhibitoria frente a dos hongos (*Fusarium sporotrichioides* y *Aspergillus fumigatus*) de importancia en la industria alimentaria. También se ha descrito la actividad antibacteriana de este ciclopéptido especialmente contra *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE) y otras bacterias de importancia clínica (Borthwick 2012). Ciclo(L-Tyr-L-Pro). Se reporta también su aislamiento a partir de una cepa de *Streptomyces* sp., y presentó actividad antimicrobiana frente a dos bacterias fitopatógenas: *Xanthomonas campestris* y *Ralstonia solanaceum* (Wattana-Amorn et al. 2016). También fue aislado a partir de *Lysobacter capsici*, una bacteria ampliamente utilizada en el control biológico, observándose que tiene alta actividad antimicrobiana inhibiendo casi el completo desarrollo de *Phytophthora infestans* (Cimmino et al., 2014).

Otros estudios han detectado ambos ciclopéptidos e incluso algunos nuevos, en los sobrenadantes libres de células de diferentes especies bacterianas. Yonezawa et al., (2011), aislaron Ciclo (L-Phe-L-Pro) y Ciclo(L-Tyr-L-Pro) de una cepa marina de *Bacillus* sp., en un estudio con hongos y bacterias estos ciclopéptidos solo mostraron actividad antifúngica frente a una cepa de *Aspergillus niger*. También fueron aislados de *B. thuringiensis* y *B. endophyticus* inhibiendo *F. oxysporum*, *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., *Bipolaris* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp., (Sansinenea et al. 2016). Estos reportes nos permiten sugerir que la producción de estos ciclopéptidos además de tener una función en procesos de comunicación QS, podrían influir en la actividad antifúngica registrada en las cepas Gram negativas de *P. agglomerans* y *S. liquefaciens*, y su producción podría ser otro mecanismo de antagonismo, dado que ya se ha confirmado que la fuente de estas moléculas pueden ser bacterias Gram negativas o Gram positivas, lo que lleva a pensar en el desarrollo a futuro de nuevas investigaciones, las cuales permitan aislar y purificar estas moléculas de las bacterias estudiadas, incluidas las cepas de *Bacillus* sp., en los que se contemplen pruebas *in vitro* para evaluar su actividad antimicrobiana, y hacer una caracterización química a profundidad y determinar sus mecanismos de acción.

Es importante mencionar que estos ciclopéptidos además de poseer actividades antimicrobianas, también pueden estar involucrados con procesos de comunicación planta-bacteria, como lo plantea el estudio realizado por Ortiz et al., (2012), en los que se muestra que la producción bacteriana de DKPs específicamente los reportados en este

estudio y ciclo (L-Pro-L-Val) está regulada por el sistema QS, y que estos modulan las vías de señalización de las auxinas, promoviendo el crecimiento vegetal.

Sobre las DKPs se han reportado diversas actividades biológicas (antifúngicas, antibacteriales y la presencia en sistemas de señalización QS), el poder ser aislados de diferentes fuentes bacterianas hacen a estos buenos candidatos para el desarrollo de análisis complementarios que permitan caracterizar específicamente los mecanismos que utilizan las bacterias en la formación de estas moléculas, ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan determinar la actividad de las mismas y como mejorar su producción. Determinar su posible uso en el control de hongos fitopatógenos requeriría de una amplia investigación, que permita determinar con exactitud los efectos de su posible aplicación, pues son productos derivados de la actividad bacteriana de cepas aisladas de trips; por lo cual, lo primero sería identificar cual es el rol que cumple en el proceso de comunicación celular bacteriana y con qué objetivo, para luego de esta manera garantizar que no se alteren otros aspectos no deseados de esta interacción.

Los análisis llevados a cabo en este estudio nos permitieron detectar a través de bioensayos las moléculas QS más representativas de las bacterias Gram negativas como lo son las AHL; sin embargo, el empleo de métodos más sensibles y específicos nos permitió detectar moléculas diferentes (DKPs), que además de ser reportadas por tener una influencia agonista y/o antagonista con las moléculas AHL de los sistemas de señalización QS, nos proporcionaron una visión más amplia sobre actividades biológicas adicionales que pueden ser de interés en el proceso de búsqueda de nuevas fuentes de moléculas bioactivas, esto permite considerar la necesidad de indagar a mayor profundidad si estas podrían utilizarse para potenciar las actividades antagónicas registradas en el capítulo anterior, o modular otras actividades que estas cepas puedan expresar, incluso como estas podrían afectar a su propio huésped.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- Las bacterias aisladas (*P. agglomerans* T3H1(1), *S. liquefaciens* T6H1, *B. amyloliquefaciens* T9H4 y *B. velezensis* T7H3(1)) de trips (*Frankliniella* spp., y *Scirtothrips hansonii*) mostraron actividades antagonistas en ensayos *in vitro* frente a microorganismos fitopatógenos de importancia en cultivos de aguacate y otros.
- La evaluación de actividades antifúngicas y antibacterianas permitió conocer que estas bacterias poseen ciertas características importante que las hacen buenas candidatas como ACBs.
- La detección de moléculas de señalización QS a través de métodos convencionales como bioensayos y pruebas más sensibles como UHPLC/MS, nos permitió evidenciar que las bacterias evaluadas son capaces de producir moléculas AHL y diketopiperazinas (DKP).
- La producción de moléculas de señalización DKP, además de estar involucrados en sistemas de comunicación QS, ofrecen una amplia variedad de actividades biológicas, como actividad antifúngica, antibacteriana y de señalización interespecífica, por lo cual lleva a plantearse que quizá exista puede existir una posible relación entre las actividades registradas y la producción de estas moléculas.

Recomendaciones

- Hacer estudios que permitan definir con exactitud cuáles son los mecanismos que utilizaron las bacterias con actividad antifúngica y antibacteriana para inhibir el normal desarrollo de los microorganismos fitopatógenos evaluados.

- Separar y purificar a través de cromatografía líquida los ciclopéptidos identificados con el fin de hacer pruebas antifúngicas y antibacterianas frente a hongos, bacteria y oomicetos fitopatógenos de interés agrícola.
- Desarrollar pruebas más específicos que permitan determinar la actividad que ejercen los ciclopéptidos en sistemas de señalización QS.
- Evaluar las capacidades antagónicas de las bacterias evaluadas en ensayos *in vivo*, que permitan determinar su potencial uso como producto biotecnológico.
- Separar moléculas bioactivas a partir de las cepas bacterianas caracterizadas, con el fin de evaluar su uso potencial en áreas como la agricultura para el control biológico de fitopatógenos, y en el área de la medicina donde también puede tener varias funciones positivas.

Anexos Capítulo 1

A continuación, se presentan datos suplementarios correspondientes al capítulo 1, como los boxplot obtenidos del análisis estadístico de las pruebas antifúngicas

Figura Suplementaria 1. Porcentajes de inhibición de *Cylindrocladium* sp., por las diferentes bacterias evaluadas. Cyl: *Cylindrocladium* sp.

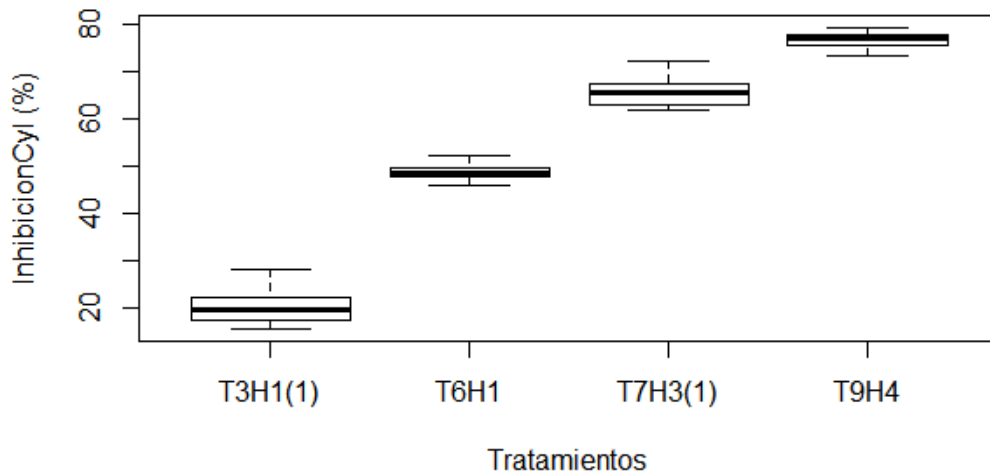


Figura suplementaria 2. Porcentajes de inhibición de *Colletotrichum gloeosporoides* por las diferentes bacterias evaluadas. Cg: *Colletotrichum gloeosporoides*

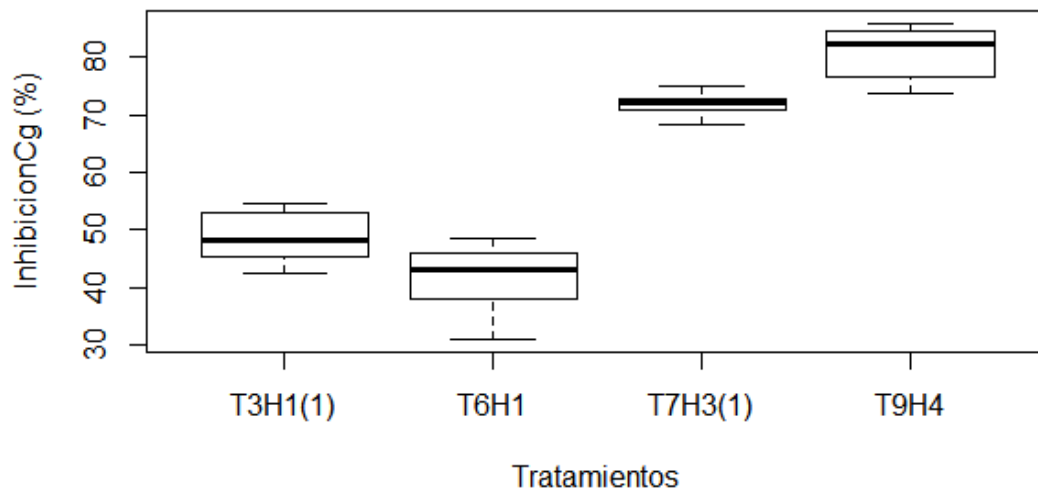


Figura suplementaria 3. Porcentajes de inhibición de *Phytophthora* sp. (EPC) por las diferentes bacterias evaluadas. EPS: *Phytophthora* sp

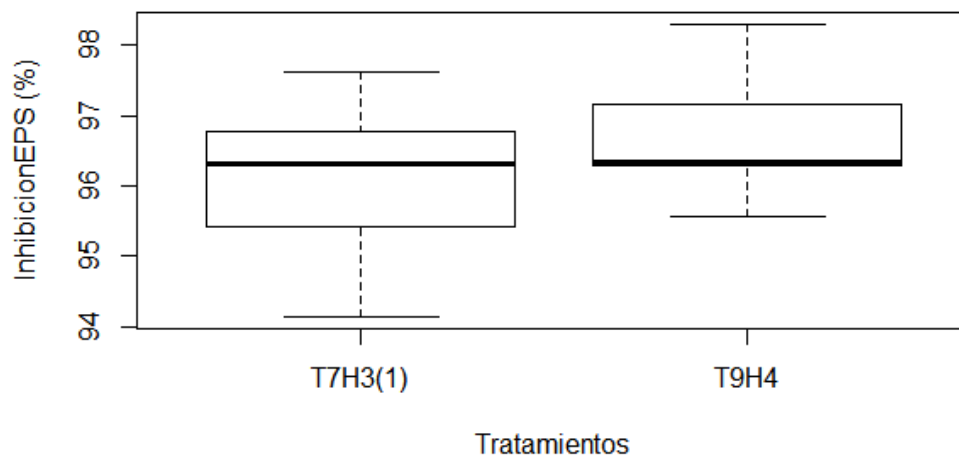


Figura suplementaria 4. Porcentajes de inhibición de *Fusarium* sp. (F4) por las diferentes bacterias evaluadas. F4: *Fusarium* sp (F4).

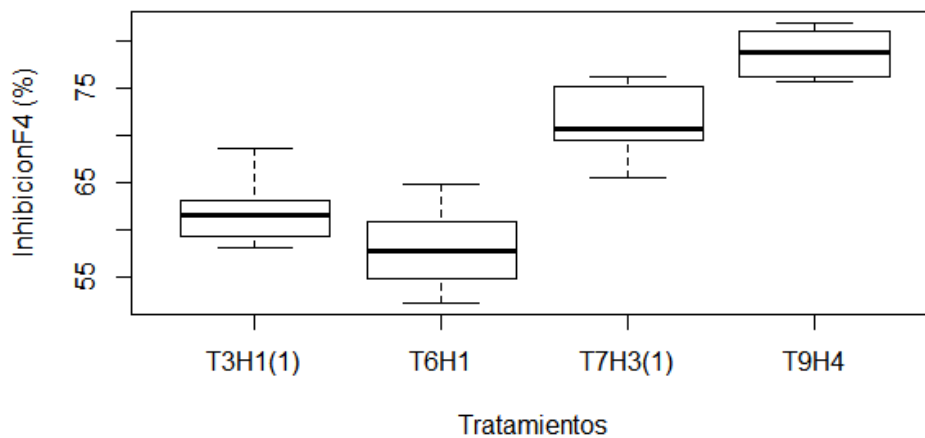


Figura suplementaria 5. Porcentajes de inhibición *Fusarium* sp. (F53) por las diferentes bacterias evaluadas. F53: *Fusarium* sp (F53).

81 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing

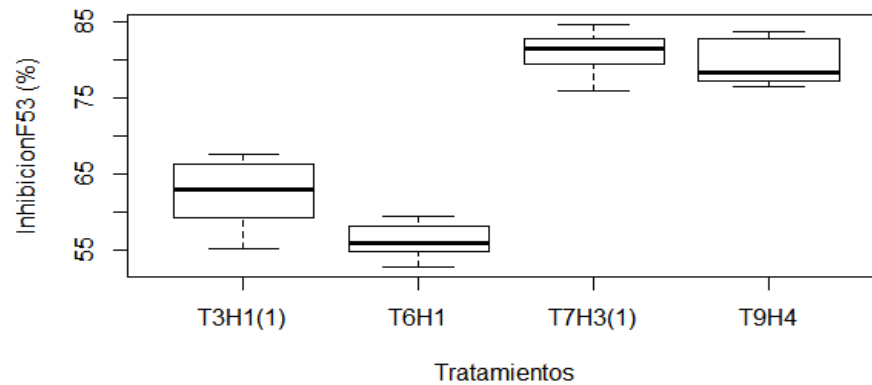
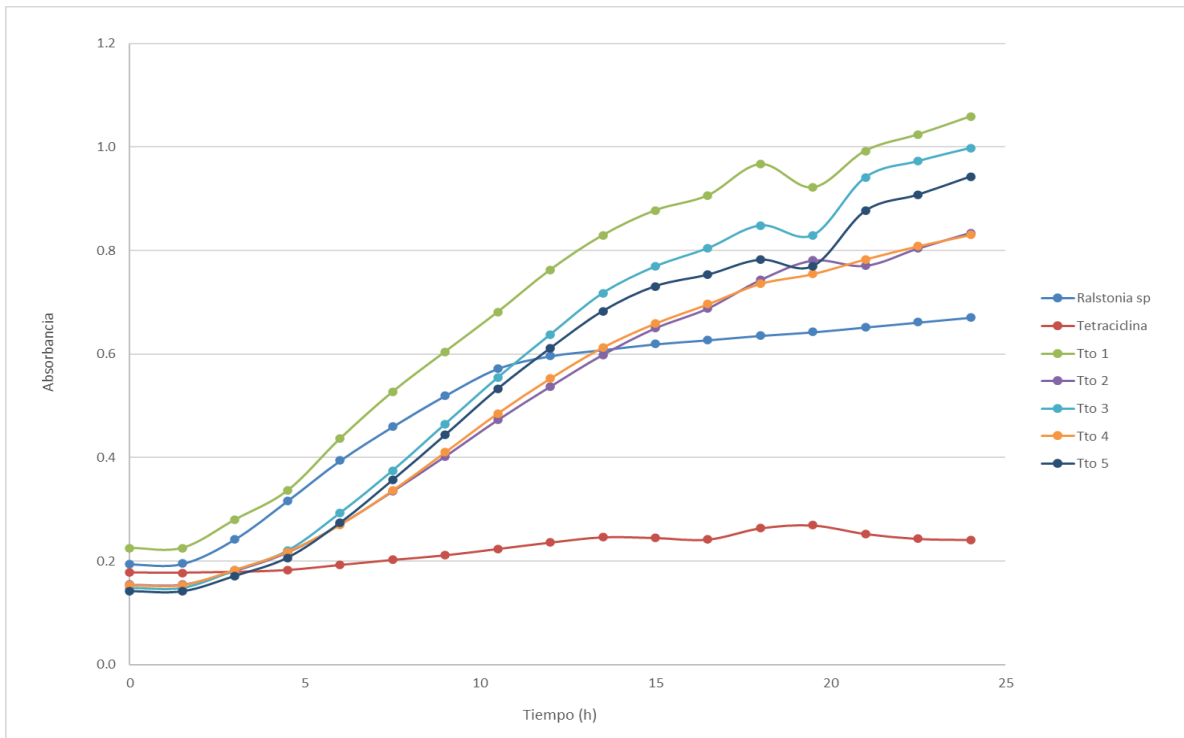


Tabla Suplementaria 1. Datos de la evaluación del efecto del sobrenadante libre de células en el crecimiento de *Ralstonia* sp.

Tiempo	<i>Ralstonia</i> sp.		Tetraciclina		Tratamiento 1 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)		Tratamiento 2 (<i>B. velezensis</i>)		Tratamiento 3 (<i>B. thuringensis</i>)		Tratamiento 4 (<i>B. safensis</i>)		Tratamiento 5 (<i>B. cereus</i>)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	0.194	0.001	0.178	0.028	0.225	0.004	0.155	0.004	0.148	0.002	0.153	0.007	0.142	0.005
1.5	0.195	0.001	0.178	0.028	0.226	0.004	0.155	0.003	0.149	0.002	0.153	0.007	0.142	0.005
3	0.242	0.003	0.179	0.011	0.280	0.007	0.182	0.004	0.183	0.001	0.183	0.006	0.171	0.005
4.5	0.316	0.005	0.183	0.011	0.336	0.013	0.217	0.004	0.220	0.005	0.218	0.007	0.207	0.010
6	0.394	0.009	0.193	0.016	0.436	0.044	0.271	0.006	0.293	0.006	0.270	0.011	0.274	0.013
7.5	0.460	0.013	0.202	0.023	0.527	0.057	0.335	0.012	0.375	0.003	0.336	0.020	0.356	0.022
9	0.520	0.010	0.211	0.030	0.604	0.053	0.402	0.020	0.465	0.012	0.410	0.029	0.444	0.035
10.5	0.572	0.021	0.224	0.030	0.681	0.057	0.473	0.029	0.554	0.016	0.485	0.039	0.533	0.044
12	0.596	0.034	0.236	0.030	0.762	0.057	0.537	0.034	0.638	0.024	0.553	0.045	0.611	0.049
13.5	0.608	0.043	0.246	0.035	0.829	0.048	0.598	0.044	0.717	0.031	0.613	0.052	0.683	0.047
15	0.619	0.056	0.245	0.039	0.877	0.042	0.650	0.054	0.769	0.040	0.659	0.058	0.731	0.043
16.5	0.627	0.067	0.242	0.045	0.906	0.049	0.688	0.060	0.804	0.036	0.696	0.068	0.753	0.030
18	0.636	0.081	0.264	0.043	0.966	0.030	0.743	0.087	0.848	0.019	0.736	0.082	0.782	0.018
19.5	0.643	0.069	0.269	0.041	0.921	0.028	0.780	0.076	0.829	0.024	0.755	0.084	0.770	0.026
21	0.652	0.051	0.253	0.043	0.992	0.030	0.770	0.051	0.941	0.030	0.783	0.110	0.877	0.040
22.5	0.661	0.054	0.243	0.046	1.024	0.032	0.804	0.054	0.972	0.029	0.809	0.121	0.908	0.042
24	0.671	0.058	0.241	0.052	1.059	0.036	0.834	0.066	0.998	0.027	0.830	0.133	0.943	0.041

Figura suplementaria 6. Efecto de sobrenadantes bacterianos en el crecimiento de *Ralstonia* sp.



Tiempo	<i>X. axonopodis</i>		Tetraciclina		Tratamiento 1 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)		Tratamiento 2 (<i>P. agglomerans</i>)		Tratamiento 3 (<i>P. cyripedii</i>)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
0	0.119	0.009	0.157	0.011	0.111	0.004	0.114	0.002	0.120	0.006
1.5	0.118	0.008	0.155	0.009	0.111	0.004	0.114	0.002	0.120	0.006
3	0.123	0.010	0.152	0.002	0.119	0.005	0.122	0.003	0.127	0.006
4.5	0.145	0.016	0.161	0.003	0.147	0.017	0.137	0.004	0.141	0.007
6	0.180	0.024	0.167	0.003	0.185	0.022	0.156	0.003	0.163	0.008
7.5	0.223	0.023	0.182	0.008	0.214	0.027	0.186	0.007	0.195	0.009
9	0.257	0.038	0.196	0.017	0.228	0.037	0.239	0.027	0.226	0.012
10.5	0.294	0.045	0.204	0.025	0.221	0.037	0.278	0.008	0.271	0.019
12	0.303	0.019	0.215	0.029	0.214	0.014	0.339	0.007	0.323	0.034
13.5	0.341	0.033	0.221	0.032	0.235	0.016	0.398	0.008	0.365	0.041
15	0.348	0.024	0.210	0.014	0.222	0.016	0.446	0.013	0.402	0.043
16.5	0.352	0.072	0.198	0.013	0.191	0.005	0.467	0.006	0.436	0.046
18	0.385	0.100	0.220	0.014	0.211	0.033	0.492	0.014	0.457	0.044
19.5	0.398	0.091	0.213	0.015	0.255	0.064	0.510	0.036	0.483	0.045
21	0.426	0.141	0.206	0.013	0.239	0.052	0.531	0.008	0.514	0.043
22.5	0.485	0.178	0.210	0.015	0.284	0.074	0.530	0.011	0.536	0.026
24	0.473	0.165	0.213	0.015	0.296	0.063	0.523	0.019	0.545	0.018

Tabla suplementaria 2. Datos de la evaluación del efecto del sobrenadante libre de células en el crecimiento de *Xanthomonas axonopodis*.

- 83 Caracterización de cepas bacterianas obtenidas de trips (Thysanoptera: Thripidae) que afectan cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill) en Antioquia: Actividad antagonista y Quorum Sensing
-

Productos asociados

Presentación e-poster en evento internacional ASM 2020:



Artículo original en proceso:

- **Título:** Bioactivity of bacterial strains obtained from thrips (Thysanoptera: Thripidae) of avocado (*Persea americana* Mill) in Antioquia, Colombia: antagonistic activity and quorum sensing metabolites.

Participaciones:

- Joven investigador Convocatoria 812, Minciencias -Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación. Código Hermes 42998 “Estudio de actividades de los aislados de la microbiota bacteriana de trips (Thysanoptera: Thripidae) procedentes de cultivos comerciales de aguacate (*Persea Americana* Miller) del oriente antioqueño” 2019.

-
- Participación proyecto de investigación de la convocatoria #808 - PROYECTOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN Y SU CONTRIBUCIÓN A LOS RETOS DE PAÍS- MINCIENCIAS-contrato no. 146-2019 Código Hermes 42409 “Bioprospección de la microbiota asociada a insectos plaga de cultivos de interés agrícola en Colombia: *Spodoptera frugiperda* (biotipos maíz y arroz) y trips del aguacate para el desarrollo de alternativas de manejo de su control – 2019”.
 - Curso: Métodos bioinformáticos I, Coursera – 2020.

Bibliografía

- Alcaraz, M. L., & Hormaza, J. I. (2007). Molecular characterization and genetic diversity in an avocado collection of cultivars and local Spanish genotypes using SSRs. *Hereditas*, *144*(6), 244–253. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0018-0661.02019x>
- Amaíz, L., Vargas, R., Medina, L., Izzeddin, N., & Valbuena, O. (2015). Evaluación del efecto antagonista de un consorcio bacteriano sobre *Rhizoctonia solani* Kühn en cultivos de arroz. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, *6*(1), 1–12.
- Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, *80*, 51–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Arévalo, P., Quintero, F., & Correa, L. (2003). Survey of thrips (Insecta: Thysanoptera) in flower crops at three localities of the municipality of Medellín, Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, *29*(2), 169–175.
- Armbruster, C. E., Hong, W., Pang, B., Weimer, K. E. D., Juneau, R. A., Turner, J., & Edward Swords, W. (2010). Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Polymicrobial Otitis media occurs via interspecies quorum signaling. *MBio*, *1*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00102-10>
- Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(2), 386–395. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>
- Baumann, P. (2005). Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects. *Annual Review of Microbiology*, *59*(1), 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>
- Borthwick, A. D. (2012). 2,5-diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews*, *112*(7), 3641–3716. <https://doi.org/10.1021/cr200398y>
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2009). Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, *135*(3–4), 187–195.

- Buckman, R. S., Mound, L. A., & Whiting, M. F. (2012). Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. *Systematic Entomology*, 38(1), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.00650.x>
- Byrne, F. J., Humeres, E. C., Urena, A. A., Hoddle, M. S., & Morse, J. G. (2010). Field evaluation of systemic imidacloprid for the management of avocado thrips and avocado lace bug in California avocado groves. *Pest Management Science*, 66(10), 1129–1136.
- Cabra, T., Rodriguez, C. A., & Villota, C. P. (2014). Capacidad antagónica y quitinolítica de microorganismos aislados de residuos de higuera (ricinus communis). *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 56–61.
- Camara de Comercio de Medellín. (2012). Cadena del aguacate en Antioquia. *Informes de Estudios Economicos*, 104. Retrieved from http://www.camaramedellin.com.co/site/Portals/0/Documentos/2017/Publicaciones regionales/1 Aguacates_Oct19.pdf http://www.camaramedellin.com.co/site/Portals/0/Documentos/2017/Publicaciones regionales/6 Cacao_Oct19.pdf
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G. D., & Blackwell, H. E. (2009). New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology*, 4(12), 1051–1059. <https://doi.org/10.1021/cb900165y>
- Cano Calle, D. (2020). Caracterización Molecular de trips (Thysanoptera: Thripidae) procedentes de cultivos comerciales de aguacate (*Persea americana* Mill) del oriente antioqueño y estudio de la diversidad microbiana asociada. Universidad Nacional de Colombia.
- Cano Calle, D., Saldamando Benjumea, C. I., Vivero Gómez, R. J., Moreno Herrera, C. X., & Arango Isaza, R. E. (2021). Two New Strains of *Wolbachia* Affecting Natural Avocado Thrips. *Indian Journal of Microbiology*, 61, 348–354.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Itkin, M., Sacher, A., Sessa, G., & Barash, I. (2008). Quorum-sensing system affects gall development incited by *Pantoea agglomerans* pv. gypsophilae. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8), 1094–1105.
- Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2017). *Sphingomonas olei* sp. nov., with the ability to degrade aliphatic hydrocarbons, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2731–2738. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002010>
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., & Wang, Q. (2016). Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 113–121.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>

- Cimmino, A., Puopolo, G., Perazzolli, M., Andolfi, A., Melck, D., Pertot, I., & Evidente, A. (2014). Cyclo(L-Pro-L-Tyr), the fungicide isolated from *Lysobacter capsici* AZ78: A structure-activity relationship study. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(2), 290–295. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1475-6>
- Dagher, F., Olishavska, S., Pillion, V., Zheng, J., & Déziel, E. (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222>
- Das, B., & Patra, S. (2017). Chapter 1 - Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology. In A. Fikai & A. M. B. T.-N. for A. T. Grumezescu (Eds.), *Micro and Nano Technologies* (pp. 1–22). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00001-9>
- De Almeida, L. G., De Moraes, L. A. B., Trigo, J. R., Omoto, C., & Cônsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS ONE*, 12(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174754>
- de Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2002). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839–4849. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000>
- de la Luz Sánchez-Pérez, J. (1999). Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 7–18.
- de Pedro-Jové, R., Puigvert, M., Sebastià, P., Macho, A. P., Monteiro, J. S., Coll, N. S., ... Valls, M. (2021). Dynamic expression of *Ralstonia solanacearum* virulence factors and metabolism-controlling genes during plant infection. *BMC Genomics*, 22(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07457-w>
- de Vries, E. J., van der Wurff, A. W. G., Jacobs, G., & Breeuwer, J. A. J. (2008). Onion Thrips, Thrips tabaci, Have Gut Bacteria That are Closely Related to the Symbionts of the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Science*, 8(23), 1–11. <https://doi.org/10.1673/031.008.2301>
- Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., & Venturi, V. (2002). Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology*, 45(4), 250–254. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3704-y>
- Dickey, A. M., Trease, A. J., Jara-Cavieles, A., Kumar, V., Christenson, M. K., Potluri, La.-P., ... Davis, P. H. (2014). Estimating bacterial diversity in *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) via next generation sequencing. *The Florida Entomologist*, 97(2), 362.

- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498–1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>
- Echeverri Florez, F., Loaiza Marín, C., & Cano Ortíz, M. del P. (2004). Reconocimiento e identificación de trips fitofagos (Thysanoptera: thripidae) y depredadores (Thysanoptera: phlaeothripidae) asociados a cultivos comerciales de aguacate *persea* spp. en los departamentos de caldas y risaralda (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*.
- El-Sayed, A. K., Hothersall, J., & Thomas, C. M. (2001). Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology*, 147(8), 2127–2139. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2127>
- El-Wakeil, N., Saleh, M., & Abu-hashim, M. (2020). *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications*. *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Enomoto, S., Chari, A., Dale, C., & City, S. L. (2017). Quorum sensing attenuates virulence in *Sodalis praecaptivus*. *Cell Host & Microbe*, 21(5), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.003>. Quorum
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2021). FAOSTAT Statistics Database. Retrieved August 20, 2004, from <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fletcher, M. P., Diggle, S. P., Cámara, M., & Williams, P. (2007). Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nature Protocols*, 2(5), 1254.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño Zapata, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.192>
- Gil, J. G. R., Sánchez, D. A. C., & Osorio, J. G. M. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 61(1), 50–61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Golonka, R., Yeoh, B. S., & Vijay-Kumar, M. (2019). The Iron Tug-of-War between Bacterial

- Siderophores and Innate Immunity. *Journal of Innate Immunity*, 11(3), 249–262. <https://doi.org/10.1159/000494627>
- Guerrero-Barajas, C., Constantino-Salinas, E. A., Amora-Lazcano, E., Tlalapango-Ángeles, D., Mendoza-Figueroa, J. S., Cruz-Maya, J. A., & Jan-Roblero, J. (2020). *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(10), 4049–4056. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10450>
- Guevara-Avendaño, E., Carrillo, J. D., Ndinga-Muniania, C., Moreno, K., Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J. A., Reverchon, F. (2018). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(4), 563–572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- Hameeda, B., Rupela, O. P., Reddy, G., & Satyavani, K. (2006). Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 43(2), 221–227.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66–74.
- Holden, M. T. G., Chhabra, S. R., De Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., ... Williams, P. (1999). Quorum-sensing cross talk: Isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 33(6), 1254–1266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01577.x>
- Horinouchi, S., Ueda, K., Nakayama, J., & Ikeda, T. (2010). Cell-to-cell communications among microorganisms. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 4, 283–337. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00098-8>
- Huang, J., Shi, Y., Zeng, G., Gu, Y., Chen, G., Shi, L., ... Zhou, J. (2016). Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere*, 157, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.032>
- Hurtado F, E., Fernández, A., & Carrasco, A. (2018). Avocado fruit—*Persea americana*. In S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, & E. S. B. T.-E. F. de Brito (Eds.) (pp. 37–48). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00001-0>
- Inam-UI-Haq, M., Gowen, S. R., Javed, N., Shahina, F., Izhar-UI-Haq, M., Humayoon, N., & Pembroke, B. (2007). Antagonistic potential of bacterial isolates associated with entomopathogenic nematodes against tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum*

- f.sp., *lycopersici* under greenhouse conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 39(1), 279–283.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., & Sa, T. M. (2008). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology*, 56(4), 327–333. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4>
- Instituto Colombiano de Agricultura (ICA). (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.). Medidas para la temporada invernal. *LLinea Agrícola*. Instituto Colombiano Agropecuario ICA Bogotá DC, Colombia.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M., & Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: Recent spread of a drosophila defensive symbiont. *Science*, 329(5988), 212–215. <https://doi.org/10.1126/science.1188235>
- Jiang, J., Wu, S., Wang, J., & Feng, Y. (2015). AHL-type quorum sensing and its regulation on symplasmata formation in *Pantoea agglomerans* YS19. *Journal of Basic Microbiology*, 55(5), 607–616. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400472>
- Kalbe, C., Marten, P., & Berg, G. (1996). Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiological Research*, 151(4), 433–439. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80014-0](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80014-0)
- Kalia, V. C., & Purohit, H. J. (2011). Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(2), 121–140. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532479>
- Khrueayu, D., & Pilantanapak, Apiradee. (2012). Antifungal activity of bioactive compound from endophytic fungi isolated from mangrove leaves. 1st Mae Fah Luang University International Conference, 7, 1–25.
- Kim, S.-R., & Yeon, K.-M. (2018). Quorum Sensing as Language of Chemical Signals. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 81, pp. 57–94). Elsevier.
- Kim, S. R., & Yeon, K. M. (2018). Quorum Sensing as Language of Chemical Signals. *Comprehensive Analytical Chemistry* (1st ed., Vol. 81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.03.010>
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., & Yu, F. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1–2), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.036>
- Koolivand, A., Abtahi, H., Parhamfar, M., Didehdar, M., Saeedi, R., & Fahimirad, S. (2019). Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. *Journal of Environmental Management*, 248(July), 109228. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.129>

- Labbate, M., Queck, S. Y., Koh, K. S., Rice, S. A., Givskov, M., & Kjelleberg, S. (2004). Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 692–698. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.692-698.2004>
- Leyton, A., Urrutia, H., Vidal, J. M., de la Fuente, M., Alarcón, M., Aroca, G., Sossa, K. (2015). Actividad inhibitoria del sobrenadante de la bacteria Antartica *Pseudomonas* sp. M19B en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50(2), 375–381. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572015000300016>
- Li, S. Bin, Fang, M., Zhou, R. C., & Huang, J. (2012). Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* - Induced blight of Anthurium. *Biological Control*, 63(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.002>
- Li, Y. H., & Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12(3), 2519–2538. <https://doi.org/10.3390/s120302519>
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, 33(5), 488–498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Lima, É. F. B., & Mound, L. A. (2016). Systematic relationships of the Thripidae subfamily Sericothripinae (Insecta: Thysanoptera). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 263, 24–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcz.2016.03.001>
- Lopes, L. P., Oliveira Jr, A. G., Beranger, J. P. O., Góis, C. G., Vasconcellos, F. C. S., Martin, J. A. B. S., ... Andrade, G. (2012). Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* *in vitro* and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*. scielo .
- March Rosselló, G. A., & Eiros Bouza, J. M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica*, 141(8), 353–357. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.02.031>
- Marinas, M., Sa, E., Rojas, M. M., Moalem, M., Urbano, F. J., Guillou, C., & Rallo, L. (2010). A nuclear magnetic resonance (¹ H and ¹³ C) and isotope ratio mass spectrometry (^d ¹³ C , ^d ² H and ^d ¹⁸ O) study of Andalusian olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 1457–1466. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Martín del campo, C., Gómez, H., & Alaníz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonista y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *E-Gnosis*, 6, 1–17.
- Miller, C., & Gilmore, J. (2020). Detection of quorum-sensing molecules for pathogenic

- molecules using cell-based and cell-free biosensors. *Antibiotics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050259>
- Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S. J., & Baek, K. H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules*, 22(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>
- Mohammadi, P., Tozlu, E., Kotan, R., & Şenol Kotan, M. (2017). Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science*, 53(3), 134–143. <https://doi.org/10.17221/55/2016-PPS>
- Mound, L., & Morris, D. (2007). *The insect Order Thysanoptera: Classification versus Systematics*. *Zootaxa* (Vol. 1668).
- Myo, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, 134(December 2018), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.017>
- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313–322.
- Nwuche, C. O. (2013). Isolation of Bacteriocin – Producing Lactic Acid Bacteria from ‘ Ugba ’ and ‘ Okpiye ’ , Two Locally Fermented Nigerian Food Condiments ., 56(February), 101–106.
- Observatory of Economic Complexity, (OEC). (2019). Aguacate Fescos o Secos. Retrieved from https://oec.world/es/visualize/tree_map/hs92/export/col/all/20804/2019/
- Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12795–12800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506131102>
- Ortiz Castro, R., Campos García, J., & López Bucio, J. (2012). Comunicación planta-bacteria basada en ciclodipeptidos de origen microbiano con actividad auxínica, (56), 59–74. Retrieved from <https://www.cic.cn.umich.mx/index.php/cn/article/viewFile/110/33>
- Ortori, C. A., Dubern, J.-F., Chhabra, S. R., Cámara, M., Hardie, K., Williams, P., & Barrett, D. A. (2011). Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4 (1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 839–850.
- Ortori, C. A., Halliday, N., Cámara, M., Williams, P., & Barrett, D. A. (2014). LC-MS/MS quantitative analysis of quorum sensing signal molecules. In *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. 255–270). Springer.
- Park, D. K., Lee, K. E., Baek, C. H., Kim, I. H., Kwon, J. H., Lee, W. K., ... Kim, K. S. (2006).

- Cyclo(Phe-Pro) modulates the expression of ompU in *Vibrio* spp. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2214–2221. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2214-2221.2006>
- Pérez, R., Terrón, T. S., & Muñoz-Rojas, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana Dde Ciencias*.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., Mcknight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11229–11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>
- Pomini, A. M., Paccola-Meirelles, L. D., & Marsaioli, A. J. (2007). Acyl-homoserine lactones produced by *Pantoea* sp. Isolated from the “maize white spot” foliar disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1200–1204. <https://doi.org/10.1021/jf063136a>
- Pontes, M. H., Babst, M., Lochhead, R., Oakeson, K., Smith, K., & Dale, C. (2008). Quorum sensing primes the oxidative stress response in the insect endosymbiont, *Sodalis glossinidius*. *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003541>
- Poppe, L., Vanhoutte, S., & Höfte, M. (2003). Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), 963–973. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003747.41051.9f>
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755.
- Retana, A., García, O., Cantu, M., & Carvajal, C. (2010). Thrips (Thysanoptera) of avocado (*Persea americana*) in Nayarit, Mexico. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(1), 47–51.
- RIKEN MSn spectral database for phytochemicals(ReSpect). (2008). Cyclo(Pro-Phe). Retrieved from <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/PM014413>
- Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneweis, D. J., & Whitfield, A. E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*, 15, 80–89.
- Rutkies, C., Schymanski, E. L., Wolf, S., Hollender, J., & Neumann, S. (2016). MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *Journal of Cheminformatics*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9>

- Saeb, A. T. M. (2016). Presence of Bacterial Virulence Gene Homologues in the dibenzo-p-dioxins degrading bacterium *Sphingomonas wittichii*. *Bioinformation*, 12(4), 241–248. <https://doi.org/10.6026/97320630012241>
- Sanaei, E., Charlat, S., & Engelstädter, J. (2021). Wolbachia host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 96(2), 433–453. <https://doi.org/10.1111/brv.12663>
- Sansinenea, E., Salazar, F., Jiménez, J., Mendoza, Á., & Ortiz, A. (2016). Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Letters*, 57(24), 2604–2607. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.117>
- Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. (2005). Aphid Protected from Pathogen. *Science*, 310(December), 2005. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16357252
- Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2000). Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods in Enzymology*, 305(1995), 288–301. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)05495-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)05495-1)
- Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., & Kotan, R. (2014). Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0035-3>
- Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B. S., & Manhas, R. K. (2011). Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6), 801–808. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i6.14>
- Singh, D., & Kumar Yadav, D. (2016). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol of Bacterial Wilt of Tomato Incited by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 07(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000327>
- Soto-Rodríguez, G. A., Rodríguez-Arrieta, J. A., González Muñoz, C., Cambero-Campos, J., & Retana-Salazar, A. P. (2017). Clave para la identificación de géneros de Thrips (Insecta: Thysanoptera) comúnmente asociados a plantas ornamentales en Centroamérica. *Acta Zoológica Mexicana*. scielomx.
- Steindler, L., & Venturi, V. (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., & Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4322–4327. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002>

- Tamayo Molano, P. J. (2007). Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, (4), 51–70.
- Tecon, R., & Leveau, J. H. J. (2016). Symplasmata are a clonal, conditional, and reversible type of bacterial multicellularity. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep31914>
- Thissera, B., Alhadrami, H. A., Hassan, M. H. A., Hassan, H. M., Behery, F. A., Bawazeer, M., ... Rateb, M. E. (2020). Induction of cryptic antifungal pulicatin derivatives from *Pantoea agglomerans* by microbial co-culture. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020268>
- Tremocoldi, M. A., Rosalen, P. L., Franchin, M., Massarioli, A. P., Denny, C., Daiuto, É. R., de Alencar, S. M. (2018). Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PloS One*, 13(2), e0192577.
- Vallejo Pérez, M. R., Téliz Ortiz, D., De La Torre Almaraz, R., López Martínez, J. O., & Nieto Ángel, D. (2017). Avocado sunblotch viroid: Pest risk and potential impact in México. *Crop Protection*, 99, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.015>
- Varón, E. H. (2015). Reconocimiento y manejo de insectos plaga en aguacate (*Persea americana*), 1–44. Retrieved from <http://www.anglogoldashantocolombia.com/wp-content/uploads/2015/11/4-manejo-integrado-de-plagas-de-aguacate3.pdf>
- Vorburger, C., Gehrler, L., & Rodriguez, P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters*, 6(1), 109–111. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0642>
- Wang, N., Wang, L., Zhu, K., Hou, S., Chen, L., Mi, D., Guo, J. H. (2019). Plant root exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated biocontrol against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00098>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Wattana-Amorn, P., Charoenwongsa, W., Williams, C., Crump, M. P., & Apichaisataienchote, B. (2016). Antibacterial activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria. *Natural Product Research*, 30(17), 1980–1983. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1095747>
- Whiley, A. W., Schaffer, B., & Wolstenholme, B. N. (2002). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=CxmvpAYkL54C>
- Winson, M. K., Swift, S., Fish, L., Throup, J. P., Jørgensen, F., Chhabra, S. R., ... Stewart,

- G. S. A. B. (1998). Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00172-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00172-4)
- Wright, S. A. I., Zumoff, C. H., Schneider, L., & Beer, S. V. (2001). *Pantoea agglomerans* strain-EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 284–292. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.284-292.2001>
- Wu, S., Tang, L., Zhang, X., Xing, Z., Lei, Z., & Gao, Y. (2018). A decade of a thrips invasion in China: lessons learned. *Ecotoxicology*, 27(7), 1032–1038.
- Yang, W., Xu, Q., Liu, H. X., Wang, Y. P., Wang, Y. M., Yang, H. T., & Guo, J. H. (2012). Evaluation of biological control agents against Ralstonia wilt on ginger. *Biological Control*, 62(3), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.05.001>
- Yang, X. (2014). Moraxellaceae. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 826–833. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00441-9>
- Yonezawa, K., Yamada, K., & Kouno, I. (2011). New diketopiperazine derivatives isolated from sea urchin-derived *Bacillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(1), 106–108. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.106>
- Zafar, T., & Sidhu, J. S. (2011). Avocado: Production, Quality, and Major Processed Products. In *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing* (pp. 525–543). <https://doi.org/10.1002/9780470958346.ch26>
- Zhang, H., Mahunu, G. K., Castoria, R., Apaliya, M. T., & Yang, Q. (2017). Augmentation of biocontrol agents with physical methods against postharvest diseases of fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.020>
- Zhao, J., Quan, C., Jin, L., & Chen, M. (2018). Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria. *Journal of Biotechnology*.
- Zhou, J. W., Ruan, L. Y., Chen, H. J., Luo, H. Z., Jiang, H., Wang, J. S., & Jia, A. Q. (2019). Inhibition of Quorum Sensing and Virulence in *Serratia marcescens* by Hordenine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 784–795. research-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05922>
- Zhu, H., Sun, S. wei, Li, H., Chang, A., Liu, Y. chen, Qian, J., & Shen, Y. ling. (2019). Significantly improved production of Welan gum by *Sphingomonas* sp. WG through a novel quorum-sensing-interfering dipeptide cyclo(L-Pro-L-Phe). *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.189>
- Zientz, E., Dandekar, T., & Gross, R. (2004). Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 745 LP – 770. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.745-770.2004>.