



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR MICHOACÁN



**EVALUACIÓN DE *BACILLUS SUBTILIS* EN LA
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE
FRAMBUESA EN CAMPO**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
SUSTENTABLE**

Presenta:

Karla Mariana Ramírez Rojas

Directores de tesis:

M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo

Dr. José Venegas González

Jiquilpan, Michoacán, México, diciembre de 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 13:00 horas del día 8 del mes de diciembre del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CIIDIR IPN Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Evaluación de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal de frambuesa en campo del alumno:

Apellido Paterno:	Ramírez	Apellido Materno:	Rojas	Nombre (s):	Karla Mariana
-------------------	---------	-------------------	-------	-------------	---------------

Número de registro: B 1 8 0 9 7 2

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 29 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

El porcentaje de similitud está relacionado con frases cortas similares y algunas adecuadamente referidas a la fuente original o nombres científicos que se encuentran distribuidos a lo largo del documento, por lo que no se considera de relevancia para indicar plagio.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

Cumple con los requerimientos indicados para su aprobación.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS


Dr. José Venegas González
Director de Tesis
Nombre completo y firma


M. en C. Ernesto Oregel Zamudio
Nombre completo y firma


Dra. María Valentina Angoa Pérez
Nombre completo y firma


M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo
2° Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma


Dr. Edgar Villar Luna
Nombre completo y firma


Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante
Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán, el día 11 del mes de diciembre del año 2020, el (la) que suscribe Karla Mariana Ramírez Rojas alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B180972, adscrito(a) al CIIDIR IPN Unidad Michoacán, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo y el Dr. José Venegas González, y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento vegetal de frambuesa en campo”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: karlithamariana@hotmail.com; goyoque@hotmail.com y jvenegasg@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Karla Mariana Ramírez Rojas

Nombre y firma del alumno(a)

Información de contacto: goyoque@ipn.mx

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), le agradezco por el financiamiento otorgado durante la maestría. Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por los múltiples apoyos como la BEIFI, la Beca Tesis, así como también a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP), entre otros, que sirven como motivación para la formación de maestros durante la investigación.

A una institución de tan alta calidad donde no solo es posible desarrollarte como estudiante sino como un mejor ser humano, con un excelente ambiente académico y de mucho respeto que te hace sentir como en casa, al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR IPN Unidad Michoacán) y a todos los que forman parte del mismo que de alguna u otra manera colaboraron durante mi periodo estudiantil, gracias al cual esta investigación fue posible.

Mis respetos y admiración para los miembros del comité revisor por todas las atenciones prestadas para la realización de este trabajo:

M. en C. Ernesto Oregel Zamudio

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dr. Edgar Villar Luna

Más que agradecida con mis excelentes directores de tesis:

Dr. José Venegas González

M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo

Expreso mi más profundo agradecimiento a mi amiga y directora de tesis la M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo, por su amistad, entusiasmo, motivación, colaboración e instrucción durante el desarrollo de esta investigación. Al Dr. José Venegas González por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo por su amistad, afecto, apoyo, consejos, dirección y enseñanzas, por su excelencia como profesor, como director pero principalmente como ser humano.

A los miembros de mi comité tutorial el M. en C. Ernesto Oregel Zamudio, la Dra. María Valentina Angoa Pérez y el Dr. Edgar Villar Luna por sus sugerencias, soluciones y acertadas contribuciones en cada detalle para mejorar y poder lograr la excelencia requerida de este proyecto.

A los técnicos de Laboratorio por brindarme su apoyo y guía en el proceso de análisis de las muestras, pero sobre todo por los consejos, risas, pláticas que hicieron más ameno el desarrollo de mis experimentos.

A mis profesores que compartieron conmigo sus conocimientos y experiencias durante mi formación como Maestro en Ciencias, mi más grande admiración para mi querida directora la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante que es un excelente modelo a seguir por su calidad humana y profesional, al Dr. Francisco Covarrubias Villa por su valor y valentía, por todos los conocimientos pero sobre todo por las experiencias y consejos compartidos.

A mis compañeros y grandes amigos, Elida, Amairani, Armando, Alejandro, Soe, Paola, Jorge, Leo, Jonathan, Vladimir, Angel, Joel y Memo con especial cariño los llevo en el corazón por haber formado parte de este ciclo tan importante en nuestras vidas y desando siempre lo mejor para ustedes éxito como profesionales, mucha salud, amor y calidad de vida para todos. A Samuel Macario quién fue el que me aconsejo y recomendó la maestría mi querido compañero desde la universidad por sus consejos, apoyos y motivación. A mis mejores amigas Ytzy Ávalos y Fernanda Gudiño, por todo su apoyo durante los momentos difíciles, las amo y admiro y deseo siempre lo mejor para ustedes. A todos mis compañeros y amigos mil gracias por todo lo bueno y malo que hemos compartido durante este viaje llamado vida.

A mi madre por ser mi más grande apoyo, ejemplo y motor para salir siempre adelante y cumplir con todas las metas que me propongo, espero lograr que este orgullosa de mí y siempre hacerla feliz. A mi novio Yibrán por siempre estar a mi lado en los momentos en que más lo necesité y sobre todo por siempre impulsarme en mi desarrollo profesional para ser mejor. Los amo por ser parte de mi familia y les dedico este trabajo donde he puesto el corazón y he tratado de dar lo mejor de mí, para poder regresarles un poquito de todo lo bueno que hacen por mí, sin olvidarme de mis fieles compañeras Lola y Niky. A mi papá Juan con todo cariño te regalo y te dedico todos mis éxitos y fracasos hasta el cielo. A mi

tío el Dr. Octavio Ramírez Rojas por todo su apoyo y consejos que me motivaron a continuar con mi preparación.

Gracias a Dios por siempre poner los medios y la sabiduría, salud y fuerza para poder lograr los objetivos y metas propuestas durante no solo este periodo si no toda mi vida.

A todas las personas que hicieron posible este trabajo y contribuyeron directa o indirectamente sin darse cuenta, muchas gracias, espero poder corresponderles y contribuir para mejorar la calidad de vida en esta sociedad, desarrollando mi profesión de manera ética y sobre todo con respeto hacia todos los seres vivos y al medio ambiente, aplicando todos los conocimientos y experiencias aprendidas.

Resumen

Para cumplir las necesidades de producción, el cultivo de frambuesa requiere de altas dosis de insumos agrícolas para una adecuada nutrición, control de fitopatógenos y organismos no deseados, con muy poca integración de bioinsumos, tales como el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV). Las RPCV solubilizan el fósforo que se encuentra en formas poco disponibles, fijar nitrógeno atmosférico, estimular la síntesis de hormonas de crecimiento o controlan fitopatógenos, entre otras actividades benéficas. Sin embargo, pese a que se aplican RPCV, su uso es llevado de forma empírica sin evaluación de su eficiencia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una cepa local de *Bacillus subtilis* (GOS 01 B-67748) sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de frambuesa variedad “Evita” de un cultivo con manejo convencional, ubicado en la región de Zamora, Michoacán, con 2 tratamientos y 4 repeticiones, el tratamiento 1 con inoculación de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 y un testigo sin inoculación de la bacteria.. La bacteria se aplicó cada 15 días en el sistema radical de frambuesa. En plantas tratadas con *B. subtilis* hubo mayor número de cañas (29 ± 6), yemas productoras (9.5 ± 1.4), área foliar ($70\text{ cm}\pm 2.7$), clorofila (43 Unidades SPAD ± 3.7) que el tratamiento control (sin bacteria). El 100% de las raíces fueron colonizadas por bacterias del género *Bacillus* spp., en los tratamientos con GOS 01 B 67748 y se presentó menor incidencia de hongos fitopatógenos *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., en contraste con el testigo que presentó ausencia total de bacterias del género *Bacillus* y mayor incidencia de *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Phytophthora* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. Adicionalmente *B. subtilis* disminuyó el pH (7.4) respecto al testigo (7.6) sin bacteria y la CE ($0.83\ \mu\text{S}/\text{cm}$) del suelo respecto a las condiciones iniciales (pH 7.06 y CE $1.77\ \mu\text{S}/\text{cm}$) del cultivo y en tejido vegetal logró incrementar la cantidad de hierro ($173\text{ ppm}\pm 7.25$) y manganeso ($414\text{ ppm}\pm 85$) presentes en las hojas.

Palabras clave. *Bacillus subtilis*, *Rubus Idaeus* L, agricultura, biofertilizantes, bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Abstract

To meet the production needs, the raspberry crop requires high doses of agricultural inputs for adequate nutrition, control of phytopathogens and unwanted organisms, with very little integration of bio-inputs, such as the use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The PGPR solubilize phosphorus found in little available forms, fix atmospheric nitrogen, stimulate the synthesis of growth hormones or control phytopathogens, among other beneficial activities. However, despite the application of PGPR, its use is carried out empirically without evaluation of its efficiency. The objective of this work was to evaluate the effect of inoculation with a local strain of *Bacillus subtilis* (GOS 01 B-67748) on the growth and development of raspberry plants variety “Evita” from a cultivation with conventional management, located in the región of Zamora Michoacán, whit 2 tratments and 4 repetitions, treatment 1 wit inoculation of *B. subtilis* GOS 01 B-67748 and a control without inoculation of the bacteria. The bacterium was applied (1×10^{12} CFU / ml) every 15 days in the root system of a raspberry crop (with conventional management). In plants treated with *B. subtilis* there was a greater number of canes (29 ± 6), producing buds (9.5 ± 1.4), leaf area ($70 \text{ cm} \pm 2.7$), chlorophyll ($43 \text{ SPAD Units} \pm 3.7$). 100% of the roots were colonized by bacteria of the genus *Bacillus* spp, in the treatments with GOS 01 B 67748 and there was a lower incidence of phytopathogenic fungi *Aspergillus* sp and *Penicillium* sp, in contrast to the control that presented a total absence of bacteria of the *Bacillus* genus and higher incidence of *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Phytophthora* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp). Additionally, *B. subtilis* decreased the pH (7.4) whit respect to the control (7.6) and the EC ($0.83 \mu\text{S} / \text{cm}$) of the soil, with respect to the initial conditions (pH 7.06 and EC $1.77 \mu\text{S} / \text{cm}$) of the culture and in plant tissue it managed to increase the amount of iron ($173 \text{ ppm} \pm 7.25$) and manganese ($414 \text{ ppm} \pm 85$) present in the leaves.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Rubus Idaeus* L, agriculture, biofertilizers, plant growth promoting bacteria.

Índice

Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
Producción de Frambuesa en México	4
Frambuesa	5
Propiedades nutraceuticas de la frambuesa	6
Compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas.....	8
Manejo del cultivo de frambuesa.....	9
Fertilización del cultivo de frambuesa	12
Consecuencias del uso excesivo de fertilizantes.....	13
Plagas y enfermedades que afectan al cultivo de frambuesa	14
Bioinsumos.....	15
Biofertilizantes.....	17
Bioplaguicidas	18
Bioestimulantes	19
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	20
Mecanismos que utilizan las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal	21
<i>Bacillus subtilis</i>	22
Mecanismos utilizados por <i>B. subtilis</i> para promover el crecimiento vegetal.....	25
Justificación.....	27
Hipótesis.....	29
Objetivos	29
Objetivo general:	29
Objetivos específicos:	29
3. Metodología	30
Área experimental.....	30
Producción de inóculo de <i>B. subtilis</i>	30
Diseño experimental y variables evaluadas.....	31

Evaluación de los nutrimentos de suelo rizosférico y hojas de planta de frambuesa tratada con <i>B. subtilis</i> (GOS 01 B-67748) en campo.	31
Variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con <i>B. subtilis</i> (GOS 01 B-67748) en campo.....	32
Presencia de <i>B. subtilis</i> en raíz de planta de frambuesa tratada con <i>B. subtilis</i> (GOS 01 B-67748).	33
Identificación de hongos presentes en el sistema radical de planta de frambuesa	34
4. Resultados.....	36
Análisis químico del suelo de frambuesa	36
Análisis foliar	38
Evaluación de variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con <i>B. subtilis</i> (GOS 01 B-67748) en campo	39
Determinación de la presencia de <i>B. subtilis</i> en raíz de planta de frambuesa tratada con <i>B. subtilis</i> (GOS 01 B-67748).....	41
5. Discusión	43
7. Referencias.....	51

Índice de tablas

Tabla 1 Contenido Nutricional de la frambuesa	6
Tabla 2 Análisis del suelo antes de la aplicación de <i>B. subtilis</i> al cultivo de frambuesa	36
Tabla 3 Análisis de suelo inicial y post-aplicación de <i>B. subtilis</i>	37
Tabla 4 Análisis foliar de frambuesa a los 120 días.....	38
Tabla 5 Análisis foliar de frambuesa a los 200 días.....	39
Tabla 6 Contenidos medios de clorofila (Unidades SPAD) en plantas de frambuesa con los tratamientos	40
Tabla 7 Variables de crecimiento vegetativo en plantas de frambuesa con los tratamientos	40
Tabla 8 Incremento en las variables vegetativas en plantas de frambuesa con la inoculación de <i>B.</i> <i>subtilis</i>	41
Tabla 9 Porcentaje de presencia de bacterias del género <i>Bacillus</i> en los trozos de raíces de planta de frambuesa	41
Tabla 10 Porcentaje de presencia de hongos en raíces de las plantas de frambuesa de los tratamientos.	42

Índice de figuras

Figura 1 Indicadores de madurez del fruto de frambuesa cosechado-----	11
Figura 2 Cultivo de frambuesa a media caña, inicio del ciclo productivo -----	30

1. Introducción

La producción de frambuesa (*Rubus Idaeus* L) demanda una amplia necesidad de nutrimentos y protección contra enfermedades durante su ciclo vegetativo lo cual genera un consumo excesivo de insumos químicos para obtener los rendimientos (≈ 18 ton/ha) (SIAP, 2018) y calidad requeridos por los productores y consumidores (Neilsen *et al.*, 2017; Piechowicz *et al.*, 2018). Sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes sintéticos, genera repercusiones negativas de carácter económico, dado que eleva los costos de producción (Jara-Peña *et al.*, 2003); de carácter ambiental, contamina y atenta contra la biodiversidad y de carácter social, porque puede dañar la salud de los consumidores (Patle *et al.*, 2020). Recientemente, nuevas biotecnologías permiten aumentar la productividad de los cultivos a la par de disminuir las dosis de fertilizante químico aplicado (Boetto *et al.*, 2016). Una de ellas es la incorporación de microorganismos benéficos para mejorar las condiciones del cultivo, debido a la relación simbiótica mutualista que establecen con la planta (Moreno-Reséndez *et al.*, 2018).

La micro y macrofauna del suelo juegan un papel fundamental tanto para el reciclaje de los nutrimentos como para el desarrollo óptimo de las plantas (Arana, 2015), la fertilidad del suelo y la salud de la planta (Satyaprakash *et al.*, 2017). Los exudados que las plantas excretan a través de la raíz que ingresan al suelo, son aprovechados por los microorganismos que se encuentran en la rizósfera, los cuales pueden ejercer efectos positivos en la planta, de esta manera se genera una relación simbiótica mutualista donde ambos organismos resultan beneficiados (Montiel *et al.*, 2017). El suelo rizosférico posee una amplia diversidad de microorganismos entre estos se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), por mecanismos directos o indirectos, benefician a las plantas (Kumar *et al.*, 2015). *B. subtilis* es una rizobacteria que puede promover el crecimiento vegetal y tener un efecto antagónico sobre los fitopatógenos debido a que puede producir antibióticos y enzimas líticas, además de nitrógeno orgánico (Khabaz *et al.*, 2015). La capacidad de esporulación de *B. subtilis* y la multiplicidad en los mecanismos de la bacteria que promueven el crecimiento vegetal hace que este pueda ser considerada como uno de los mejores inoculantes microbianos (Kashyap *et al.*, 2019).

En estudios anteriores, se demostró la eficiencia promotora de crecimiento vegetativo de *B. subtilis* debido a sus características, es una bacteria capaz de adaptarse a temperaturas extremas, condiciones climáticas adversas, cambios bruscos de temperatura y heladas (-12.3 °C a -35.5 °C) disminuyendo el impacto negativo del estrés abiótico provocado a plantas de frambuesa y promoviendo el crecimiento aumentando el número de cañas y de yemas productoras lo cual se ve reflejado en aumento de productividad y rentabilidad del cultivo (Belyaev *et al.*, 2017).

Las bacterias del género *Bacillus* tienen capacidad antagónica al ser exitosos agentes de control biológico debido a su capacidad para producir compuestos antimicrobianos que pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos, facilitar la colonización radicular y reforzar la resistencia sistémica de las plantas; además, su aplicación representa una ventaja ante los agroquímicos al no atender contra el ambiente ni la salud de los consumidores debido a su baja o nula toxicidad y alta biodegradabilidad (Falcão *et al.*, 2014), incluso se ha introducido como una técnica segura en el tratamiento poscosecha de frutos como alternativa de control biológico de hongos y bacterias (Tunsagool *et al.*, 2019). En un trabajo realizado por Adesemoye, *et al.*, (2008) en invernadero en cultivo de Okra (*Abelmoschus esculentus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), y espinaca (*Spinacia oleracea*), la aplicación de *B. subtilis*, aumentó el peso seco de hoja de tomate, okra y espinaca africana. En planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Afroditá) *B. subtilis* promovió el crecimiento debido a la producción de auxinas e indujo resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, además redujo la actividad de la principal enzima encargada del ablandamiento de la membrana celular (Mena Violante, *et al.*, 2007).

Los metabolitos secundarios o moléculas bioactivas de las bacterias del género *B. subtilis*, sus son ampliamente utilizadas como alternativas de control biológico debido a su acción inhibitoria de fitopatógenos, alterando la estructura del micelio o formando una barrera física en la superficie de la planta que dificulta la adherencia del patógeno (Cruz-Martín *et al.*, 2019).

La FDA (Food and Drug Administration) considera a *B. subtilis* como una sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) debido a su baja o nula toxicidad, que no causa efectos negativos al ser ingerido por organismos, además de funcionar como un probiótico y mejorar complicaciones intestinales mediante la modificación de la microbiota,

aumentando y manteniendo la benéfica (Ducray *et al.*, 2020) y de esta manera conferir beneficios a la salud humana (Hatanaka *et al.*, 2020).

Algunos estudios han indicado que la aplicación de bioinsumos, con aislados de *Bacillus* spp. o *Trichoderma* spp., disminuye la incidencia de fitopatógenos causantes de enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo debido a que actúa como biofertilizante y biopesticida y además altera la composición de la microbiota de la rizósfera en plátano, pepino y papa, sin generar un impacto negativo en el ambiente (Wang *et al.*, 2019). Las bacterias utilizadas como biofertilizante pueden presentar un comportamiento similar a los agentes de control comerciales (Calvo Garrido *et al.*, 2019).

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por *B. subtilis* pueden ser utilizados en el manejo poscosecha para la conservación de los frutos, debido a que a diferencia de los compuestos orgánicos no volátiles, las sustancias antibacteriales o antifúngicas pueden ser absorbidas más fácilmente en estado gaseoso por las plantas en forma de señales químicas; por ende, estos compuestos pueden servir para el manejo y calidad de frutos poscosecha y pueden ser implementados como atmósferas modificadas para una conservación más eficiente y además inocua para los consumidores (Zhao *et al.*, 2019).

En las prácticas agrícolas convencionales en Zamora Michoacán, se incorporan de manera empírica microorganismos para la promoción de crecimiento sin evaluar su eficiencia y efecto en el cultivo. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta a la inoculación con una cepa local de *Bacillus subtilis* (GOS 01 B-67748) de las plantas de frambuesa de un huerto ubicado en la región de Zamora.

2. Marco teórico

Producción de Frambuesa en México

En 2017 en México se sembró una superficie total de 6 649 ha y se cosechó un volumen de 120.2 mil ton de frambuesa de las cuales el 60.1% fue destinado a exportación (SIAP, 2018). México se ha convertido en uno de los principales productores y exportadores de frambuesa, principalmente para Estados Unidos de Norteamérica (Cruzat y Barrios, 2016). De acuerdo a la SIAP y SAGARPA en 2018, los principales estados productores de frambuesa son: en primer lugar, Jalisco con un total de 56 013 ton, segundo lugar Michoacán con una producción de 21 620 ton y en tercero Baja California con 9 965 ton, cubriendo el total de 99.8% de la producción nacional de frambuesa.

En la mayoría de los cultivos de frambuesa en México se aprovecha la capacidad de la planta de producir nuevos brotes cada temporada o año lo que evita la siembra continua de la misma que es costosa, algunas variedades de frambuesa se adaptaron correctamente a las zonas agrícolas de México por su bajo requerimiento de horas frío (Muratalla-Lúa *et al.*, 2013).

La producción de frambuesa en México ha mantenido un aumento constante durante la última década por su alto valor nutricional y debido a que la mayoría de la producción es destinada a Europa y Estados Unidos de América, lo que requiere de altos niveles de calidad en el manejo del cultivo, tratamientos de cosecha y pos cosecha (Trujano-Fragoso *et al.*, 2017).

Las características que han permitido un rápido crecimiento productivo y la tasa alta de comercialización a nivel mundial de frambuesa son la rentabilidad económica, el retorno rápido de la inversión, la generación de mano de obra, el mercado destino de exportación, su atractivo sensorial, los beneficios a la salud y sus propiedades biológicas, por lo anterior hace que este se considere como un alimento funcional o superalimento y por ende que tenga un alto valor comercial en el mercado mundial (González *et al.*, 2019).

La calidad y cantidad de frutos en los cultivos está determinada por varios factores entre ellos la densidad de planta, manejo y fertilización del cultivo, lo cual se traduce en rentabilidad del cultivo, reducción de gastos, competitividad en el mercado y calidad de producción (Zarate *et al.*, 2017).

Frambuesa

La frambuesa (*Rubus Idaeus* L), es un arbusto perenne originario de regiones templadas del Norte de Asia y de Europa Oriental; la especie se registró por primera vez en el monte Ida Grecia (Morales, *et al.*, 2009). Pertenece la familia de las Rosáceas, que incluye especies ornamentales y especies frutales de consumo masivo (Skrovankova *et al.*, 2015). El género *Rubus* cuenta con 12 subgéneros y aproximadamente de 100 a 750 especies y pertenece al subgénero de las zarzas y al grupo de las berries pese a que su fruto es una polidrupa y no una baya (Ochoa *et al.*, 2019).

La planta de frambuesa es semirastrera y puede alcanzar una altura máxima de 2 m, por lo tanto, requiere de una estructura de soporte para encausar las guías que facilita la cosecha y disminuye pérdidas por contaminación y daños al fruto al evitar que el contacto con el suelo (Ruiz-Anchondo *et al.*, 2008). Las raíces de frambuesa son delgadas y superficiales, los tallos brotan de estructuras subterráneas que emiten ramas aéreas cada año con dos años de duración promedio, los tallos son semierectos, de estructura leñosa y espinosa, de sección circular con diámetro de 3.5 a 5 mm y el color característico puede variar entre verde o marrón; el follaje de hojas pinnaticompuestas, foliadas y alternas verdes por el haz y blanquecinas aterciopeladas por el envés; arbustos con flores hermafroditas en el racimo terminal blancas o verdosas, con cinco pétalos caducos con estambres y pistilos numerosos, en cada pistilo se encuentra un ovario que encierra un óvulo en el que se desarrolla una drupa, es una planta multidrupa de estructura convexa, se caracteriza por tener frutos pequeños, de forma ovoide y color rojo, con estructura pilosa (Leyva *et al.*, 2017).

Entre las características organolépticas del fruto, resulta ser muy aromático y perfumado, de sabor principalmente acidulado y jugoso; debido a estas características se ha implementado

en la industria alimentaria en jugos, mermeladas, helados, saborizantes entre otros productos que se comercializan en el mercado (Rubio *et al.*, 2014).

El fruto de frambuesa tiene excelentes características nutraceuticas que elevan su valor nutricional, por su limitado aporte calórico y su alto contenido de vitaminas, proteínas, antocianinas y compuestos fenólicos los cuales tienen propiedades antioxidantes que reducen los efectos ocasionados por la oxidación de los radicales libres, que le atribuyen propiedades anticancerígenas y antidiabéticas (Pamplona, 2003).

Propiedades nutraceuticas de la frambuesa

En la actualidad las demandas de los consumidores son mayores puesto que al consumir un producto proveniente del campo no solo se interesan por sus características organolépticas, sino en la calidad nutricional e inocuidad en el proceso productivo (Figuroa *et al.*, 2019).

La frambuesa ha sido considerada un alimento funcional, por su alto valor nutricional y aporte de beneficios a la salud. Algunos compuestos nutricionales de la frambuesa se mencionan en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Contenido Nutricional de la frambuesa

Nutriente	Valor por 100 g de porción comestible	Unidad
Energía	52	Kcal
Agua	85.75	%
Carbohidratos	11.9	%
Fibra Dietética Total	6.5	%
Grasa Total	0.65	%
Proteína	1.20	%

Azúcar	4.42	mg
Vitamina A	33	µg
Vitamina B-1	32	mg
Vitamina B-2	38	mg
Vitamina B-3	598	mg
Vitamina B-5	329	mg
Vitamina B-6	55	mg
Vitamina B-9	21	µg
Vitamina C	26.2	mg
Vitamina E	870	mg
Vitamina K	7.8	µg
Colesterol	0	mg
Calcio	25	mg
Magnesio	22	mg
Sodio	1	mg
Potasio	151	mg
Fósforo	29	mg

(USDA, 2018)

Incluir frutas y vegetales dentro de la dieta, está estrechamente relacionado a un estilo de vida saludable y a la disminución de algunas enfermedades y patologías (Giampieri *et al.*, 2013), el consumo frambuesa, se relaciona con el retraso de la aparición de ciertas enfermedades crónico degenerativas debido a su alto contenido de compuestos fenólicos: elagitaninos (sanguina H-6, lambertianina C, sanguina H-10, potentiina, pedunculagina,

etc.) y conjugados del ácido elálgico, antocianos (principalmente derivados de cianidina: cianidina-3-soforósido) y flavonoides (quercetol y derivados); polisacáridos que son reguladores de la expresión génica y celular, ha mostrado actividad antimicrobiana, donde las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las Gram positivas; compuestos volátiles responsables de su aroma y sabor, característico y muy apreciado (unos 300 componentes volátiles, entre ellos la 4-(4- hidroxifenil) butan-2-ona se considera el más importante para definir el sabor típico de la frambuesa denominado cetona de frambuesa (Ezzahra Housni *et al.*, 2018).

El aporte de hidratos de carbono y lípidos en la frambuesa es escaso en comparación con el contenido de Vitamina C y ácido fólico (Rodoni *et al.*, 2017). También, en las hojas de frambuesa fueron encontrados flavonoides, taninos y ácidos fenol carboxílicos, derivados del queratol, con una actividad antioxidante moderada (Costea *et al.*, 2016).

Compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas

Los compuestos fenólicos forman parte de los metabolitos secundarios de las plantas, su principal clasificación es en flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos, que tienen propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antivirales, antiulcerosas y efectos vasodilatadores, los cuales pueden prevenir enfermedades como cáncer, problemas cardíacos, Alzheimer, artritis reumatoide, lesiones de la piel, desórdenes neurológicos, entre otros, causados por estrés oxidativo provocado por procesos celulares internos y agentes ambientales externos (Huyut *et al.*, 2017). La principal fuente de ingreso de compuestos fenólicos para los seres humanos es la dieta (Alonso *et al.*, 2002). Entre los compuestos fenólicos encontrados en la frambuesa se encuentra el ácido elálgico, un polifenol que reduce el daño oxidativo del ADN, lo cual puede prevenir el cáncer (Trujano-Fragoso *et al.*, 2017).

Las antocianinas predominan dentro de los compuestos fenólicos encontrados en la frambuesa, son encargados de funciones tales como adaptación a condiciones de estrés, crecimiento y pigmentación de los tejidos vegetales, al ser consumidos tienen la capacidad

de neutralizar los radicales libres que provocan oxidación celular y en la industria se utilizan como colorantes naturales (Demirbas *et al.*, 2017).

Los flavonoides conforman un grupo de compuestos con estructura polifenólica variable son metabolitos secundarios de las plantas con una importante aplicación en la industria cosmética, nutraceútica, farmacéutica y médica, debido a que por sus propiedades otorgan beneficios a la salud, por su capacidad antioxidante, anticancerígenas, antimutagénica combinadas con su capacidad como regulador de la actividad enzimática celular en plantas animales y bacterias, en las plantas son responsables del pigmento y aroma de las flores y además, actúan como un filtro contra los rayos UV; son encontrados en frutas, verduras, tejidos de las plantas y flores (Takahashi y Ohnishi, 2004) y las protegen de condiciones de estrés biótico y abiótico, en los frutos atraen polinizadores que a su vez favorecen la germinación de semillas y dispersión de esporas (Panche *et al.*, 2016).

Manejo del cultivo de frambuesa

La frambuesa es una planta perenne, la parte aérea tiene un ciclo bienal, es decir, que dura dos temporadas de crecimiento y un sistema radical que puede durar hasta varios años, a su vez los tallos pueden ser manejados como productores anuales o bienales y puede ser clasificada de acuerdo a su color, origen o etapa de producción, su estado de floración como primocañas que son los tallos que se encuentran en estado vegetativo y floricañas cuando pasan al estado de floración (Chile, 2002). Para asegurar la producción, la densidad de caña es un factor determinante para el rendimiento y desarrollo adecuado del cultivo (Alvarado-Raya *et al.*, 2017).

Las características adecuadas para el establecimiento de un huerto de frambuesa de acuerdo a SAGARPA-SIAP en 2017 son: altitud de 2000 a 3000 msnm, nivel de lluvia de 700 a 1200 mm, climas templados con rangos de temperatura que oscilan de 5 a 20 ° C esenciales para procesos como floración, fotosíntesis y crecimiento. Preferencia edafológica por suelos ricos en materia orgánica (mayor a 1.5 %) y tendencia ligeramente ácida en rangos de pH de 5.8 a 6.8, de textura franco arenosa, Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) de 15 a 30 cmol kg⁻¹ y una conductividad eléctrica menor a 1.5 ds m⁻¹ (Morales *et al.*, 2009).

Para el establecimiento del sistema productivo de frambuesa en suelo, se debe realizar previamente un análisis de fertilidad para analizar el contenido de nutrimentos y materia orgánica presentes. El contenido de materia orgánica del suelo deberá ser mayor a 3 %, para favorecer la capacidad de retención de agua y asegurar el mantenimiento de la humedad en el suelo. En el cultivo de frambuesa se utiliza acolchado plástico debido a que favorece el control de malezas. La distancia entre surcos de frambuesa debe ser de mínimo 1.8 m y entre plantas debe ser de entre 0.6 a 0.9 (Morales *et al.*, 2017).

El método de siembra en el cultivo de frambuesa es la propagación de raíces que consiste en la siembra de porciones de raíces desinfectadas de 10 y 15 cm de longitud y 5mm de diámetro, es una forma de reproducción asexual, efectiva dado que cada célula contiene la información genética necesaria para generar una nueva planta de características similares, dado que la reproducción de semillas no garantiza la uniformidad genética de la descendencia (Toogood, 2000). El riego deberá efectuarse de 2 a 3 veces por semana y la cantidad de agua proporcionada será en dependencia de las condiciones ambientales y las características propias del suelo o sustrato en el que se establece el huerto de frambuesa (Campos-Mota *et al.*, 2004).

Con la finalidad de proteger al cultivo de condiciones climáticas adversas como lluvias fuertes o granizadas, radiación solar o depredadores y disminuir los daños que se reflejan en pérdidas económicas y de producción, se integran cubiertas plásticas conocidas como macro túneles a la producción de berries; la protección que otorga se encuentra en un punto medio respecto a la producción a campo abierto y en invernadero, (Zermeño González *et al.*, 2019). El macro túnel modifica el microclima del cultivo a condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas, puede aumentar la temperatura interna en rangos de 28 y 6.7 % con respecto a la temperatura ambiental (Cruz-Andrés *et al.*, 2018) puede extender el periodo productivo del cultivo, mejorar el tamaño y calidad del fruto, permite obtener mayores rendimientos, además un beneficio adicional es que facilita el manejo del cultivo (Heidenreich *et al.*, 2012).

La aplicación de los fertilizantes puede ser proporcionada a través del sistema de riego, para mejorar su distribución y eficiencia, se debe realizar de acuerdo a los requerimientos específicos de la variedad empleada y con base a el análisis de suelo previamente realizado, para atender los requerimientos nutrimentales específicos del cultivo para evitar la

acumulación de sales que se presenta comúnmente a consecuencia de la fertilización química (Velásquez *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la frambuesa es una planta semirastrera, razón por la cual necesita una estructura de soporte resistente para evitar el contacto del fruto con el suelo y facilitar la recolección de los frutos al momento de la cosecha, el sistema de tutoreo, debe establecerse acorde a los hábitos de crecimiento de la variedad establecida, para que este no reduzca el potencial productivo de la especie sembrada (Saba Albitres *et al.*, 2019). La polinización es de suma importancia, sin embargo, en macro túneles no es necesario introducir polinizadores al sistema productivo como ocurre en invernadero; en caso de que los polinizadores nativos no fuesen suficientes, se deberá introducir colmenas dentro de la plantación (Poveda-Coronel *et al.*, 2018).

La cosecha de la frambuesa procedente de cultivos establecidos en macro túneles, tiene un promedio de vida de anaquel de aproximadamente una semana bajo condiciones de almacenamiento en frío, la manipulación de la fruta tanto para cosecha y almacenamiento debe realizarse de una manera cautelosa, al momento de la cosecha se debe desprender el fruto cuidadosamente del receptáculo, uno de los indicadores de madurez del fruto es el color rojo, sin embargo cuando el fruto va destinado a exportación debe ser cosechado antes de la total maduración del mismo **Figura 1**, es decir cuando este cumpla con una tonalidad más clara que el color rojo que lo caracteriza (Parra-Quezada R. A, *et al.*, 2008).



Figura 1 Indicadores de madurez del fruto de frambuesa cosechado.

A la izquierda rojo característico de la frambuesa para cosechar. Derecha color de frambuesa cuando es destinada a exportación. Fuente: Archivo propio.

También debe evitarse durante la cosecha de frambuesa la exposición al sol, coleccionar frutos dañados o húmedos debido a que disminuye la calidad y la inocuidad de los frutos (Céspedes *et al.*, 2020). El tratamiento postcosecha debe incluir protección contra microorganismos como hongos y bacterias, además del deterioro que ocasionan las cepas patógenas específicas de las frutas algunas son patógenas para los seres humanos en especial las que producen toxinas (Saleh *et al.*, 2019).

Fertilización del cultivo de frambuesa

La fertilización tiene una relación directa con el rendimiento del cultivo y las propiedades químicas del suelo, la forma más común de aplicar los fertilizantes a los cultivos de frambuesa, es la fertirrigación (Rubio *et al.*, 2014). La fertirrigación o fertirriego es una de las maneras más eficientes para aplicar los fertilizantes a los cultivos, mediante riego por goteo, el sistema de riego es incorporado a los cultivos para contrarrestar problemas como reducción o exceso de lluvias y de esta manera asegurar la supervivencia del cultivo y garantizar la calidad y producción requeridas por el mercado actual (Seidel *et al.*, 2017).

Para cumplir los requerimientos específicos del cultivo se debe contar con análisis de suelo y foliar en los diferentes estados fenológicos, para atender las deficiencias específicas y realizar una fertilización eficiente y sostenible (Morales *et al.*, 2009). Los requerimientos generales para satisfacer las demandas nutricionales del cultivo de frambuesa expresados en unidades por hectárea son de nitrógeno de 80 a 100, de Fósforo 80-100, Potasio 100-150, Mg 30-40 y Calcio 20-30. (García, 2016); cabe destacar que estos requerimientos son diferentes de acuerdo a la variedad de frambuesa establecida. Los requerimientos nutricionales del cultivo de frambuesa en kilogramos por hectárea son: de Nitrógeno de 30 a 90 kg/ha, Fósforo de 20 a 40 kg/ha cada 2 a 3 años y de Potasio de 60 a 12 kg/ha.

La frambuesa requiere condiciones adecuadas de suelos, con un buen sistema de drenaje para disminuir problemas tales como asfixia radicular por exceso de humedad, pudrición del tallo o de la raíz y contar con buena aireación (Velázquez *et al.*, 2017).

Consecuencias del uso excesivo de fertilizantes

Es difícil visualizar a la agricultura moderna independiente de insumos químicos para asegurar rendimientos altos de los sistemas productivos, la tecnificación de las prácticas agrícolas busca asegurar mayores rendimientos de los cultivos para aumentar la producción de alimentos en el mundo (Bongiovanni *et al.*, 2006). Sin embargo, esto se logra a base del uso de dosis masivas de insumos, como combustibles fósiles, plaguicidas, fertilizantes, semillas híbridas, riego, entre otros, el manejo inadecuado de estos insumos, ha acelerado los procesos de erosión, desertificación, contaminación ambiental, reducción de la biodiversidad e incremento de las plagas y enfermedades en los cultivos que cada vez es más difícil y costoso el manejo del cultivo (Laurin *et al.*, 2006).

Los fertilizantes inorgánicos tienen una baja eficiencia ($\leq 50\%$) para ser asimilados por los cultivos, los restos de fertilizante no incorporados por las plantas generan un impacto ambiental negativo como contaminación de mantos acuíferos con nitratos (NO_3), eutrofización, lluvia ácida, salinización del suelo, pérdida de fertilidad del sistema productivo y a una escala mayor favorecen el calentamiento global (Bojórquez *et al.*, 2010). La eficiencia de asimilación por las plantas es de Nitrógeno, -50%, de Potasio -40% y de Fósforo -10% proveniente de fuentes inorgánicas (Baligar *et al.*, 2007).

Para reducir los requerimientos de fertilizante en los cultivos y optimizar el sistema productivo y a su vez reducir los costos de producción se han integrado prácticas agroecológicas al cultivo que aprovechen el reciclaje de nutrientes y el mantenimiento de la biodiversidad, como la integración de microorganismos benéficos (Jara *et al.*, 2003). Al estimular el crecimiento vegetal de los cultivos con la introducción de microorganismos benéficos o enemigos naturales se influencia a su vez el rendimiento de los mismos de una manera positiva, lo cual implica mayor productividad y rentabilidad para los productores, el incremento del rendimiento por aplicación de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) es debido a la capacidad de las mismas para producir metabolitos secundarios y vitaminas (Viese *et al.*, 2003).

Plagas y enfermedades que afectan al cultivo de frambuesa

El cultivo de frambuesa requiere de un manejo adecuado que incluya protección contra enfermedades bióticas, por lo tanto requiere de altas dosis de insumos químicos para obtener los rendimientos y calidad requeridos por los productores, las principales plagas que afectan al cultivo de frambuesa son: araña roja (*Tetranychus urticae*), la mosca del vinagre (*Drosophila suzukii*), trips (*Frankliniella occidentalis*, *Thripstabaci*), cabritos (*Aegorhinusspp.*), mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*), pulgones (*Amphorophora rubi*) (Piechowicz *et al.*, 2018). El cultivo de frambuesa, es afectado por enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos que causan pérdidas de aproximadamente el 60%, su control se realiza mediante agroquímicos como fungicidas y bactericidas (Rebollar *et al.*, 2001).

Los principales patógenos son: la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, causante de tumores en la raíz y cuello de las plantas, una vez que altera la estructura celular la modificación realizada es irreversible e induce la enfermedad conocida comúnmente como “agalla del cuello” no es necesaria la presencia de la bacteria para inducir la enfermedad, la agalla sirve de albergue para otros microorganismos (France, 2009); *Erwinia amylovora*, causante del fuego bacteriano que es considerada la enfermedad más destructiva para las plantas de la familia de las rosáceas que contiene frutos de baya desde su primer reporte en 1793, el principal síntoma son las puntas de las cañas ennegrecidas, conforme la enfermedad progresa por los tejidos estos se oscurecen se marchitan y mueren (Bastas, 2014); *Pseudomonas sp* y *Xhantomonas sp* son causantes de tizones y manchas en tejidos y frutos, *Clavibacter sp* causante de marchitamientos vasculares (Morales *et al.*, 2004).

Los hongos que afectan al cultivo son *Botrytis cinerea* causante de la pudrición gris que afecta tejidos como cañas, flores y frutos. La roya es ocasionada por *Pucciniastrum americanum* y daña tanto hojas como frutos. *Didymellac applanata* y *Leptosphaeria coniothyrium* ocasionan tizón de yemas y cañas respectivamente. *Phytophthora cactorum* que ocasiona pudrición de raíces que se puede extender hasta el cuello de la planta. Oídio, peste o ceniza ocasionada por *Spherotheca macularis*, la cual puede afectar todos los tejidos presentes de la frambuesa. Otras especies de hongos fitopatógenos de importancia al cultivo de frambuesa son *Verticillium dahliae*, *Rhizopus*, *Mucor spp...*, *Botryosphaeria dothidea*,

Alternaria sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium Armillatia*, *Cylindrocarpon* sp., *Cephalosporium* sp., *Rhizoctonia* sp., principalmente (Morales, *et al.*, 2017).

La prevención es la herramienta principal para el control de patógenos y se logra mediante el monitoreo constante del cultivo; la araña roja (*Tetranychus urticae*), moscas de la fruta (*Anastrepha*), escarabajo japonés (*Popillia Japonica*), chinches (*Cimex lectularius*) y pulgones (*Aphididae*), son las principales plagas que afectan al cultivo de frambuesa, la mejor estrategia para el control es el manejo integrado del cultivo, que introduzca prácticas agroecológicas como el control biológico y otras alternativas que permitan reducir el uso de pesticidas de origen químico (González *et al.*, 2010). El control de organismos no desea dosis con aplicación de plaguicidas, bactericidas o fungicidas recomendados por la EPA o la lista más reciente de productos autorizados para la frambuesa por la Asociación Nacional de exportadores de Berries (ANABERRIES A.C., 2020), cuando el cultivo es destinado para exportación hacia Estados Unidos de Norte América (Heidenreich *et al.*, 2012).

Una tecnología amigable utilizada son las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, que ha resultado ser una alternativa exitosa por su capacidad de movilizar nutrientes y antagonismo contra patógenos de los cultivos (Zhoinska *et al.*, 1992). Las RPCV se introducen de manera artificial al cultivo a fin de obtener beneficios, como la promoción de crecimiento vegetal (Walnright *et al.*, 1992)

La calidad de la producción de frambuesa depende del manejo del cultivo y las prácticas agrícolas, que influyen tanto en las características organolépticas y físicas del fruto, como en sus propiedades nutricionales, en algunos casos con la finalidad de mejorar algunas características tanto productivas como de calidad de los frutos se han encontrado hibridaciones (Trujano-Fragoso *et al.*, 2017).

Bioinsumos

Actualmente la producción agrícola tiene como objetivo principal satisfacer las necesidades de la población mundial que se encuentra en aumento constante de manera sostenible, sin embargo, la intensificación de las prácticas agrícolas está lejos de alcanzar los objetivos de

sostenibilidad deseada, debido a que para cumplir con los requerimientos de producción para satisfacer la demanda alimentaria, se requiere de una constante aplicación de insumos químicos lo cual genera consecuencias negativas tales como disminución de la biodiversidad, pérdida de fertilidad de suelo, aparición de plagas resilientes, incremento de los costos de producción, entre otros (Lima *et al.*, 2019).

Las prácticas agrícolas convencionales son factores limitantes para el desarrollo sostenible de la actividad agraria debido al impacto negativo en la seguridad y soberanía alimentaria y en la preservación del medio ambiente que ocasionan (Çakmakçi *et al.*, 2019), lo que ha llevado a buscar soluciones más amigables con el ambiente que involucren prácticas agrícolas más inocuas, como la integración de bioinsumos a los cultivos que actúan como biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas que pueden inducir el sistema de defensa vegetal, promover el crecimiento vegetal o actuar como pesticidas y de esta manera disminuir el uso de insumos químicos, manteniendo la productividad requerida sin comprometer la salud de consumidores, sin generar un impacto negativo en el ambiente y sin elevar los costos de producción para poder competir en el mercado (Srivastava *et al.*, 2019).

Los bioinsumos se componen de extractos de plantas, microorganismos vivos o sus metabolitos secundarios, actúan como biofertilizantes, biostimuladores y bioplaguicidas y se utilizan como estrategia para un manejo sostenible de plagas y enfermedades; además, tienen la capacidad de mejorar el rendimiento, productividad, calidad o sanidad de los cultivos vegetales sin generar impactos negativos al medio ambiente y son más económicos que los insumos químicos (Mamani de Marchese *et al.*, 2018).

En este sentido las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, son una de las alternativas utilizadas para lograr una agricultura más sostenible; generalmente son utilizadas como biofertilizantes, a largo plazo los efectos pueden ser similares a los de la fertilización mineral, pero sin repercusiones negativas al ambiente (Robledo-Buriticá *et al.*, 2018). La inhibición total o parcial de poblaciones de patógenos por otros microorganismos se entiende como control biológico, la selección, uso y manejo de microorganismos pertenecientes a la flora del suelo ha demostrado ser una alternativa factible para el control de problemas fitosanitarios en los cultivos (Campi *et al.*, en 1991). Los microorganismos forman parte de la microbiota del suelo y cumplen un papel fundamental, realizando

funciones de control biológico o de promoción de crecimiento vegetal, al ser microorganismos propios del suelo o microorganismos endofíticos de las plantas, se puede concluir que están adaptados a las condiciones naturales y de estrés del campo (Moreno-Velandia *et al.*, 2018).

Es importante mencionar que la mayor parte de la información que se tiene de casos de éxito del uso de microorganismos es en laboratorio como cultivo *in vitro* o condiciones controladas, sin embargo, al llevarlos a las condiciones naturales a las que están adaptados, cumplirán los objetivos que los productores esperan con su aplicación, más no en todos los casos los microorganismos actúan de la misma manera en campo que en condiciones controladas como en el laboratorio, por lo cual los resultados obtenidos varían dependiendo de factores bióticos, abióticos y de las características propias del microorganismo o cepa utilizada (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

Biofertilizantes

Cualquier material sintético o natural que al aplicarlo al suelo o tejidos de las plantas suministre uno o más nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo es considerado un fertilizante o abono, los fertilizantes pueden ser divididos en dos categorías fertilizantes químicos y biofertilizantes (Zhang *et al.*, 2018).

Para disminuir las consecuencias negativas derivadas del uso desmedido de fertilizantes inorgánicos y residuos no asimilados por las plantas, los biofertilizantes a base de microorganismos resultan ser una alternativa que permite sustituir parcialmente la fertilización sintética como soluciones sustentables y buenas prácticas agrícolas debido a que son amigables con el medio ambiente (Lagler, 2017).

Los biofertilizantes compuestos de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y las micorrizas son de los más conocidos y estudiados, debido a que promueven la capacidad de asimilación de nutrientes por las plantas e incrementan la disponibilidad de nutrientes primarios en la rizósfera (Srivastava *et al.*, 2019).

Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: **1)** Microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. **2)** Microorganismos capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Bojórquez *et al.*, 2010).

Bioplaguicidas

Los plaguicidas debido a su baja especificidad y elevada toxicidad, presentan muchos riesgos para ecosistemas, microorganismos, polinizadores y organismos benéficos, afectan negativamente la calidad de agua y suelo; en países en desarrollo su uso se lleva sin considerar las restricciones y especificaciones de su utilización por ende el impacto negativo aumenta causando daño a consumidores, jornaleros, productores y a todo organismo que esté en contacto con ellos o residuos de ellos (EPA, 2016)

Uno de los desafíos más importantes en la actualidad es mejorar la productividad agrícola y la sustentabilidad, debido a que la agricultura moderna afronta una crisis ambiental, económica y social debido a la intensificación de la tecnología para lograr producciones elevadas y lograr competir en el mercado, tales como el uso de plaguicidas químicos o sintéticos (Girón *et al.*, 2018).

Los principales factores que reducen la capacidad de producción agrícola es el daño ocasionado por fitopatógenos, lo que conlleva al uso indiscriminado de plaguicidas de origen químico para su control, lo que ocasiona daños en la salud tanto de productores como consumidores debido a su elevada toxicidad y persistencia en los ecosistemas. Por lo anterior, se requiere de más investigación para mantener la producción agrícola con plaguicidas menos tóxicos tanto para el ambiente como para los consumidores, por ende los bioplaguicidas resultan ser una solución aceptable ante la problemática antes mencionada (Salgado-Garciglia *et al.*, 2019).

Los bioplaguicidas por su capacidad de control biológico se utilizan como alternativa en el manejo integrado de plagas; tienen propiedades fúngicas, insecticidas y bactericidas, son derivados de materiales naturales como animales, plantas y microorganismos y o sus extractos metabólicos, se caracterizan por tener una alta especificidad por el patógeno y presentar bajo riesgo tanto como consumidores y operadores como para el medio por lo cual promueven el desarrollo sustentable de la agricultura al tener la capacidad de disminuir de manera gradual el uso de plaguicidas sintéticos (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

Para el desarrollo de un bioplaguicida se requiere de recursos humanos altamente calificados, capaces de explotar las técnicas implicadas en la biotecnología moderna, para comprender la ecología de la interrelación del microorganismo biocontrolador con la planta hospedera, la plaga y su impacto con el ambiente para lograr implementar una biotecnología sostenible y sustentable que no genere repercusiones negativas (García *et al.*, 2018)

Bioestimulantes

En la agricultura las condiciones para el desarrollo de un cultivo no siempre son las ideales puesto que constantemente se presentan situaciones desfavorables que dificultan la productividad y calidad de los cultivos; para mitigar las pérdidas ocasionadas se emplea una gran cantidad de insumos químicos, lo que además de elevar los costos de producción genera repercusiones negativas tanto en el medio ambiente como en la salud de los consumidores; por ende, las nuevas biotecnologías se encaminan a formular productos que permitan elevar los rendimientos y a su vez disminuir las condiciones de estrés, de origen natural, menor toxicidad, mayor biodegradabilidad e igual eficiencia, tales como los bioestimulantes (Veobides-Amador *et al.*, 2018).

Un bioestimulante se define como un activador o catalizador de reacciones químicas y fisiológicas para el óptimo desarrollo de la planta, se compone principalmente de aminoácidos provenientes de extractos de plantas, animales, vegetales o algas; se clasifica de acuerdo a su función, uso y tipo de actividad (Casillas *et al.*, 1986). Los bioestimulantes

se diferencian de los bioplaguicidas o biofertilizantes, dado que favorecen el desarrollo de las plantas no solo por la presencia de nutrientes, promotores de crecimiento o compuestos de defensa (Yakhin *et al.*, 2017).

Los bioestimulantes principalmente realizan funciones tales como favorecer el desarrollo de microorganismos benéficos, promover los procesos vitales de la planta, incrementar la tolerancia al estrés abiótico; en cuanto a nutrientes mejora su absorción, disponibilidad, traslocación y uso, por ende, mejoran el rendimiento y calidad de los cultivos. Cada vez son más utilizados en la agricultura moderna debido a que tienen potencial para disminuir el uso de productos químicos (Quintero *et al.*, 2018), al activar y desplazar reacciones bioquímicas y fisiológicas hacia el objetivo que se busca con su aplicación durante la germinación, desarrollo o crecimiento vegetativo (Batista *et al.*, 2017).

Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

El término Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) refiere a las bacterias que habitan la rizósfera y generan efectos positivos en la planta, fue descrito por J. W. Kloepper y M. N. Schroth en 1978. El éxito de las RPCV se debe a su alta capacidad de colonización de los cultivos al ser en su mayoría microorganismos endófitos que habitan en los tejidos de las plantas y a la competencia o antagonismo que establecen contra otros microorganismos patógenos (Moreno *et al.*, 2018). Ejemplos de géneros bacterianos que han sido reconocidas como RPCV son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* (Ahemad y Kibret 2013) y *Herbaspirillum* (Cabra Cendales *et al.*, 2017). La aplicación de las RPCV puede ser con el revestimiento de la semilla, inoculación al suelo o a la planta (Espinoza Palomeque *et al.*, 2017). Las RPCV se pueden clasificar en general en dos grupos; rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal RPCV y rizobacterias biocontroladoras de crecimiento vegetal RBCV (Cabra-Cendales *et al.*, 2017).

La raíz es la estructura que crece al interior de la tierra y que mantiene fija a la planta en el suelo, tiene como función principal absorber el agua y los nutrientes disponibles en el suelo, por ende, el sistema radical es parte fundamental para garantizar el rendimiento adecuado de los cultivos (Coll *et al.*, 2019). El suelo que se encuentra próximo a la raíz de las plantas se conoce como rizósfera, fue definido por primera vez por Hitlner en 1904; en este espacio en específico ocurren reacciones fisicoquímicas y bioquímicas de suma importancia para el desarrollo de las plantas (Kovacs *et al.*, 2019). El suelo no rizosférico pese a que tiene una disminución de la actividad microbiana es necesario para dar estabilidad a los agregados del suelo, así como para evitar su erosión y las pérdidas de nutrientes y juega un rol fundamental para el desarrollo de las plantas (Jia *et al.*, 2018). La planta absorbe sus nutrientes o segrega sus exudados por medio de las raíces hacia el suelo en el que se desarrolla una amplia diversidad de organismos macroscópicos como artrópodos y microscópicos los cuales pueden ser de vida libre, parásitos o saprófitos, necesarios para el mantenimiento natural del ecosistema (Guzmán *et al.*, 2012).

Los microorganismos y las plantas establecen una relación simbiótica donde se promueve la capacidad de absorción de nutrientes y agua, aumento de biomasa, la tolerancia a condiciones de estrés abiótico y contaminación, para promover el desarrollo óptimo del cultivo y favorecer el crecimiento vegetativo (Ahemad y Kibret, 2013).

Mecanismos que utilizan las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal

Las RPCV pueden promover el crecimiento por diversos mecanismos y pueden ser por acción directa o indirecta (Moreno *et al.*, 2018). Los mecanismos de promoción directa se establecen cuando la RPCV provee compuestos que estimulan el crecimiento de la planta como las auxinas o cuando facilitan la disponibilidad de los nutrientes a las plantas. Los mecanismos de promoción directa son: fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico, producción de nitritos, acumulación de nitratos, secreción de sideróforos, entre otros (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Los mecanismos indirectos de promoción son:

disminución o eliminación de fitopatógenos, producción de metabolitos secundarios, antibióticos, inducción de resistencia sistémica, producción de sideróforos y competencia de nutrientes o de espacio en el nicho ecológico. Las RPCV liberan ciertos exudados que protegen a las plantas de diversos patógenos; además, la competencia por espacio y nutrientes disminuye la capacidad de establecimiento de colonias patógenas (Samaniego-Gamez *et al.*, 2017).

Bacillus subtilis

El género *Bacillus* fue nombrado por Ferdinand Cohn por primera vez en 1872 para incluir a las bacterias con forma de bastoncitos capaces de crecer en filamentos. Fue hasta 1876 que Koch y Cohn independientemente determinaron que dos especies (*B. subtilis* y *B. anthracis*) en condiciones de estrés producían una estructura altamente resistente al calor y capaz de sobrevivir en condiciones extremas de humedad, sequía, calor, entre otras, a la que denominaron endoespora o espora bacteriana (Hardwood, 1989).

B. subtilis es una bacteria considerada RPCV, es Gram positiva (Saha *et al.*, 2012), cosmopolita se ha encontrado en el agua, aire, (Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018); puede crecer y proliferarse en los tejidos de las plantas (Pezpita *et al.*, 2020), en la capa superficial del suelo, suelo rizosférico de gran variedad de plantas e incluso en los intestinos y heces de algunos animales, la cual se ha adaptado a diversos hábitats, debido a su versatilidad metabólica (Luche *et al.*, 2016).

Bajo condiciones de estrés nutricional *B. subtilis* tiene la capacidad de producir esporas (García *et al.*, 2018), es decir una pared gruesa que rodea su ADN y estructuras celulares internas, con forma circular u ovalada (Jang *et al.*, 2018), que otorga resistencia a factores físicos perjudiciales como desecación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos, pueden vivir en condiciones de temperatura de 55 a 70 °C, pueden soportar pH ácidos de hasta 2 (Lisboa, 2003) y condiciones de estrés abiótico, tales como salinidad. Las esporas pueden regresar a la forma vegetativa cuando las condiciones son óptimas para el desarrollo microbiano (Abd Allah *et al.*, 2018).

La espora se caracteriza estructuralmente por un citoplasma deshidratado rodeado por varias capas protectoras: una corteza similar a un peptidoglicano, que es el principal factor de la resistencia al calor y un pelaje multicapa, formado por proteínas que contribuyen a la resistencia a productos químicos, enzimas líticas y de la adecuada interacción de la espora con compuestos que desencadenan la germinación, algunas especies formadoras de esporas tienen una capa adicional el exosporium, en *Bacillus subtilis* no está presente (Isticato *et al.*, 2020).

La capacidad de producir esporas y metabolitos de defensa, otorga altas posibilidades a *Bacillus subtilis* respecto a diversos microorganismos para promover el crecimiento vegetal y subsistir en los sistemas agrícolas tanto en agua, como en suelo o planta (Saha *et al.*, 2012).

Los lipopeptidos cíclicos de *B. subtilis* son reguladores fundamentales en la estimulación de resistencia sistémica inducida, en la síntesis del ácido jasmónico y etileno, iturina A, fengicina y surfactina, contribuyen a inducir la transcripción de genes de resistencia defensivos para plantas, dan lugar a la transcripción de genes relacionados con la defensa que conduce a la patogénesis relacionada a producción de proteínas y aumento de las actividades de glucanasa, quitinasa, peroxidasa, activan la expresión de genes de defensa son importantes en las vías de señalización del ácido salicílico y jasmónico, respectivamente, participa en el proceso de resistencia activando el nivel transcripcional de los genes (Tunsagool *et al.*, 2019). Los metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis* pueden controlar enfermedades y por ende proporcionar una alternativa para potenciar el crecimiento vegetativo y desarrollo óptimo de las plantas o cultivos (Shternshis *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios que produce *B. subtilis* que son utilizados como antibióticos son: difucidina, oxidifucidina, subtilisina A, bacilomicina B, bacitracina y subtilina que ataca la pared celular de los hongos; su alta eficiencia como fungicida se debe a su capacidad colonizadora del área radicular de los cultivos, la actividad antifúngica de los péptidos generada por especies de *Bacillus* funciona como antibiótico a través de moléculas de esteroles y fosfolípidos que estimulan la formación de poros, afectando la permeabilidad de la membrana celular fúngica; puede secretar varios tipos de péptidos como los lipopéptidos cíclicos antimicrobianos secretados durante el proceso de fermentación (Shen

et al., 2019). La actividad enzimática relacionada con la defensa es más eficiente cuando se trata con *B. subtilis*, incluyendo enzimas como peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amoniaco liasa, glucanasa y quitinasa (Wu *et al.*, 2019), por lo cual se le atribuye su amplia aplicación en la industria agrícola (Savluchinske *et al.*, 2004).

En el manejo de frutos poscosecha *B. subtilis* puede servir como una alternativa más inocua para los consumidores y personal encargado de su manejo, venta o distribución, al no generar residuos tóxicos que ocasionan repercusiones negativas asociadas a la salud; dado que puede inhibir la actividad de enzimas patogénicas para reducir la descomposición de los tejidos vegetales, activando las enzimas antioxidantes (peroxidasa, polifenol oxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) en la fruta para eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno en las frutas con el fin de reducir el daño de las células vegetales y activar las enzimas de resistencia a enfermedades (fenilalanina-monialiasa, quitinasas, β -1,3-glucanasa) para mejorar la resistencia y calidad de los frutos (Zhao *et al.*, 2019).

En experimentos anteriores con inoculación de *B. subtilis* se mostró su capacidad para inhibir a *Fusarium* sp., debido a su capacidad antagonista y competitiva; además, es un microorganismo capaz de modificar la estructura de la pared celular en los tejidos vegetales, debido a la acumulación de lignina (Illa *et al.*, 2019), además *B. subtilis* puede colonizar hifas de hongos como *Aspergillus niger* (Kovács *et al.*, 2019). *B. subtilis* puede formar películas bacterianas que sirven para recubrir los tejidos de las hojas y actúan como membrana protectora para el ingreso de sustancias y organismos no deseados (Huang *et al.*, 2019).

La absorción y disponibilidad de elementos en el suelo es beneficiada en rangos de pH menores a 7, (Frias-Moreno *et al.*, 2019). la adición de microorganismos como *B. subtilis* pueden favorecer dicha absorción debido a su capacidad para producción de ácidos orgánicos los cuales modifican el pH del suelo (Anguilano-Cabello *et al.*, 2019).

La FDA (Food and Drug Administration) considera a *B. subtilis* como una bacteria GRAS (Generally Recognized as Safe) debido a que no se le reconoce actividad patogénica o que atente contra la salud humana (Zhou *et al.*, 2013) actualmente se ha reconocido su capacidad funcional como probiótico de alta calidad (Ducray *et al.*, 2020), debido a que a nivel genoma no contiene genes resistentes a antibióticos que contengan plásmidos, ni

contiene factores de virulencia dañinos que codifiquen genes, además las bacterias de *B. subtilis* forman parte de la microbiota gastrointestinal normal, (Sultana *et al.*, 2019), puede inhibir la aparición de colitis ulcerosa, puede alterar positivamente la microbiota intestinal, reparar la barrera de la mucosa intestinal y favorecer la respuesta inmune, otorgando antes bien beneficios a la salud (Wu *et al.*, 2019).

Las cepas de *Bacillus subtilis* se utilizan para balancear la microbiota benéfica al promover el desarrollo de *Lactobacillus* en el tracto digestivo de algunos animales, las esporas de *B. subtilis* se introducen de manera oral al organismo, al llegar al intestino delgado las esporas germinan, proliferan, reesporulan y producen enzimas hidrolíticas, antioxidantes y proteínas de superficie que favorecen el desarrollo de los *Lactobacillus*, por lo cual su consumo genera beneficios debido a que se sabe que una buena microbiota está estrechamente relacionada con una buena salud (Yu *et al.*, 2019).

B. subtilis es una bacteria importante tanto como para el estudio académico como para el procedimiento industrial, se ha utilizado para comprender la biología el ciclo celular y las diferenciaciones bacterianas y en la industria para la producción de antibióticos, proteínas y aditivos alimentarios (Wu *et al.*, 2019).

Mecanismos utilizados por *B. subtilis* para promover el crecimiento vegetal

Los efectos de *B. subtilis* y su modo de aplicación varían desde inoculaciones directas al suelo dirigidas a la raíz, aplicaciones en semillas, follaje y frutos, lo cual puede mejorar la salud de las plantas, aumentar la nutrición y optimizar la actividad fisiológica de las plantas, aumentando el rendimiento de los cultivos, mejorando la tolerancia del estrés biótico y abiótico de las plantas, además de la calidad final de los frutos es afectada positivamente y por tanto la vida de anaquel aumenta (Chávez *et al.*, 2019).

B. subtilis puede promover el crecimiento vegetal mediante el control de fitopatógenos debido a que puede producir antibióticos (bacilisina, bacilomicina, iturina A, surfactina, fengicina), sideróforos, compuestos volátiles [pirazina y 2, 3-dimetil-5- (1-metilpropil)] y enzimas líticas (β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa, lipasa, amilasa); además la bacteria puede realizar la fijación de nitrógeno atmosférico (Khabaz *et al.*, 2015).

Tiene la capacidad de inducir el mecanismo de resistencia sistémica en las plantas y favorecer la síntesis de proteínas relacionadas con la partenogénesis (Sosa-Pech *et al.*, 2019).

Algunas cepas de *B. subtilis* pueden solubilizar fósforo y otros minerales como zinc insoluble, debido a su capacidad para producir ácidos orgánicos, ácido cianhídrico, agentes quelatantes y moldeado de proteínas (Mumtaz *et al.*, 2017). Adicionalmente algunas especies de *Bacillus*, pueden fijar nitrógeno, descomponer materia orgánica y de esta manera promover la fertilidad del suelo y el ciclaje de nutrientes (Wu *et al.*, 2019).

Las esporas de *B. subtilis* permanecen inactivas, pero se mantienen disponibles bajo condiciones adversas. Además, forma parte de las bacterias de vida libre intermediarias en las reacciones de fijación de nitrógeno atmosférico y solubilización de fosfatos por su necesidad de obtener energía (Ramírez *et al.*, 2017).

B. subtilis es un microorganismo capaz de producir auxinas como el ácido indolacético (AIA), regula la diferenciación vascular, desarrollo de la raíz, dominancia apical y división y expansión celular; el ácido acético o auxina es capaz de estimular el crecimiento en respuesta a estímulos de la luz y puede ser sintetizada mediante diversas rutas metabólicas (Mena Violante *et al.*, 2017). Las plantas superiores son capaces de sintetizar ácido indol acético, sin embargo, algunas bacterias rizosféricas (aproximadamente el 80%) tienen una biosíntesis similar de este compuesto (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

B. subtilis también produce citocininas las cuales regulan el crecimiento y la productividad de los cultivos (Sun *et al.*, 2017). La capacidad de esporulación de *B. subtilis* y la multiplicidad en los mecanismos que emplea la bacteria para promover el crecimiento vegetal hace que este pueda ser considerado como uno de los mejores inoculantes microbianos (Kashyap *et al.*, 2019).

Justificación

El estado de Michoacán ocupa el segundo lugar en la producción de frambuesa en México. Para asegurar la producción del cultivo, se utiliza un alto consumo de fertilizantes e insumos agrícolas. Para obtener altos rendimientos de fruto de frambuesa (≈ 18 ton/ha) se requiere el uso de fertilizantes químicos que aseguren una buena nutrición de las plantas, además de fungicidas y bactericidas para el control de organismos no deseados, así como de herbicidas para reducir la competitividad en el desarrollo del cultivo. El uso de agroquímicos ocasiona graves daños a la salud, al ambiente, la biodiversidad y ocasiona pérdida de la fertilidad de suelos a largo plazo.

De acuerdo a datos obtenidos por comunicación personal con productores agrícolas en Zamora Michoacán se utilizan aproximadamente 750 kg/ha de fertilizante en los cultivos de frambuesa. El municipio de Zamora se caracteriza por ser de los principales productores de berries generalmente la producción está destinada para exportación, sin embargo, para cumplir con los requerimientos de calidad necesarios para el mercado de exportación, es necesaria la aplicación de insumos químicos para la garantizar la producción del cultivo, lo cual puede traer consecuencias negativas tales como degradación del suelo, contaminación del ambiente e incluso daños a la salud de los consumidores.

Se conoce que los fertilizantes inorgánicos tienen una baja eficiencia ($\leq 50\%$) para ser asimilados por los cultivos, el resto generan un impacto ambiental negativo como contaminación de mantos acuíferos, eutrofización, lluvia ácida, salinización del suelo, pérdida de fertilidad del sistema productivo y calentamiento global. Por lo anterior, es necesario integrar dentro del sistema productivo prácticas agroecológicas más sostenibles tales como la integración de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, como *Bacillus subtilis* que se reconoce como un buen inoculante para promover el crecimiento vegetal.

Además, el uso de agroquímicos eleva significativamente los costos de producción de los cultivos, lo que genera pérdidas para los productores. Actualmente, el mercado exige productos agrícolas inocuos con menos utilización de insumos químicos y manejo más sustentable del cultivo. Sin embargo, el manejo convencional del cultivo es el que

prevalece en la región. El uso de compost, *Trichoderma harzianum* son productos que actualmente se suman al manejo del cultivo de berries como frambuesa, aunque con nula o poca claridad de su efecto, debido a la carencia de evaluación de los efectos que se tienen y a la falta de investigación en general en la región de Zamora, Michoacán.

Es conocido que el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal como *B. Subtilis* resultan ser una alternativa de apoyo en el manejo convencional de algunos cultivos por su capacidad de promover el crecimiento de cultivos debido a que pueden solubilizar fósforo, fijar de nitrógeno atmosférico, producir hormonas de crecimiento o controlar algunos fitopatógenos.

Sin embargo, aun cuando se utilizan productos a base de microorganismos benéficos en los cultivos de frambuesa no se tiene claridad del efecto que realiza al cultivo, debido a que, éstos son aplicados de manera empírica. La aplicación de productos a base de microorganismos no ha llamado la atención de los productores debido a la falta de información y de evaluación de sus efectos, razón por la cual no es tan común su aplicación en los cultivos.

Actualmente, en el CIIDIR IPN Michoacán se cuenta con una bacteria de *B. subtilis* registrada ante el Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de USA como GOS 01 B-67748 que ha mostrado promover el crecimiento vegetal de zarzamora y de estolones de fresa (Comunicación personal). Además de su capacidad para el control de varios hongos patógenos de frutillas. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la cepa GOS 01 B-67748 como promotora de crecimiento del cultivo de frambuesa en condiciones de campo, con el seguimiento sistemático de la evaluación de variables de crecimiento del cultivo que puedan indicar el efecto promotor de crecimiento vegetal de la cepa.

Hipótesis

La cepa GOS 01 B-67748, de *B. subtilis* promoverá el crecimiento de frambuesa en campo, en un cultivo ubicado en Zamora Michoacán.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el efecto de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 sobre el crecimiento y desarrollo de frambuesa (*Rubus Idaeus* L) a nivel campo.

Objetivos específicos:

- Determinar los nutrimentos de suelo rizosférico y hojas de planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* a nivel campo.
- Evaluar variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* a nivel campo.
- Determinar la presencia de bacterias del género *Bacillus* en raíz de planta de frambuesa con *B. subtilis*.

3. Metodología

Área experimental

El trabajo experimental de desarrollo en $\frac{1}{4}$ de ha de una parcela de frambuesa Var. Evita con un año de siembra recién podada la planta a media caña (40 cm). **Figura 2**, ubicada en Zamora, Michoacán (con coordenadas Latitud: 19.867023 y Longitud: -102.165786, Altitud 1712 m.s.n.m) propiedad del Sr. Gonzalo Salcedo Gallegos. El cultivo contaba con acolchado, macro túnel y 42 surcos (0.5 m de ancho) de 70 m lineales de largo con una densidad de planta de 20 caña/metro².



Figura 2 Cultivo de frambuesa a media caña, inicio del ciclo productivo

Producción de inóculo de *B. subtilis*

Se utilizó la cepa GOS 01 B-67748, la producción de inóculo se realizó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a 37 °C por 24 h. Se colectó la bacteria con ayuda de un asa bacteriológica con varios enrosques y se colocó en un frasco de vidrio con 300 mL de agua

purificada esterilizada hasta ajustar a 1×10^{12} UFC/mL. El inóculo se vertió en un biorreactor de acero inoxidable de 100 L con 60 L de medio Papa Infusión y se incubó por 5 días a temperatura ambiente (15-30 °C). Después, se recuperó la masa microbiana del biorreactor por centrifugación con un equipo desnatador y se ajustó a 2 L de suspensión bacteriana a 1×10^{12} UFC/mL con el uso de agua purificada esterilizada como efluente. La suspensión bacteriana se colocó en un portaobjetos para su observación al microscopio para determinar la población de esporas y células presentes, el conteo de la población se realizaba por triplicado.

Diseño experimental y variables evaluadas

B. subtilis se comenzó a aplicar un día después de la poda a media caña de la planta a dosis de 2 L de solución bacteriana por 200 L de agua. La aplicación se repitió cada 15 días durante cinco meses. La nutrición y manejo del cultivo fue totalmente convencional.

Los tratamientos fueron plantas de frambuesa y plantas de frambuesa sin bacteria. El diseño experimental se hizo en 4 bloques tomados al azar por tratamiento de 50 m de largo con una densidad con 20 plantas/m.

Evaluación de los nutrientes de suelo rizosférico y hojas de planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) en campo.

Antes de comenzar con las aplicaciones de *B. subtilis* se colectó una muestra de suelo rizosférico de planta de frambuesa para realizar el análisis fisicoquímico del suelo.

Después de 10 aplicaciones de la bacteria y 15 días antes de la siguiente aplicación, se tomaron muestras de suelo rizosférico de planta de frambuesa para su determinación nutricional.

El análisis nutricional se realizó de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. Se determinaron macronutrientes calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) y potasio (K) y

micronutrientes hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), y cobre (Cu). Conductividad eléctrica (CE) y pH en extracto de saturación, con un equipo portátil de marca HANNA INSTRUMENTS. El Nitrógeno (N) total mediante macro Kjeldhal por procedimientos de digestión, (SEMARNAT, 2000), Fósforo (P) mediante la técnica de Olsen y colaboradores (1954), Boro (B) mediante la técnica de Azometina H (Wolf, 1974). Además, la textura (Procedimiento de Bouyoucos) (Bouyoucos, 1962), Materia Orgánica (MO) (Técnica de Walkley y Black) (Walkley y Black, 1934), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) mediante la técnica CIC con Acetato de Amonio 1 N ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), pH 7 (Chapman, 1965).

Después de la séptima y onceava aplicación de la bacteria, se determinó el contenido nutrimental de hojas de frambuesa tratada. Se cortó una hoja ubicada a 30 cm del tallo, medida desde el ápice hacia abajo, las hojas se introdujeron en bolsas de plástico e inmediatamente después en una hielera sin tocar el hielo. Se consideraron 10 hojas de diferentes plantas por zona de muestreo. En laboratorio se secaron las hojas a temperatura ambiente (18 -25 °C) y después se molieron en mortero de porcelana y tamizaron y pasaron por la malla de número 20 (U.S. STD. SIEVE) con abertura de 0.841 mm. Los macronutrientes y micronutrientes se determinaron mediante la técnica de Método Orgánico B del Microondas Multiware 60. El Nitrógeno total se determinó mediante la técnica de Kjeldahl, Fósforo mediante el Método por colorimetría del Fósforo-vanadomolibdato.

Variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) en campo

Después de 15 días de la primera y cuarta aplicación de la bacteria, se contaron las yemas productoras en 30 cm de tallos productores desde el ápice hacia abajo, en 10 plantas por bloque de tratamiento.

En la sexta aplicación de la bacteria, se contó el número de frutos por cargador en 15 plantas por bloque de los tratamientos.

En la sexta aplicación de la bacteria, se midió el ancho del tallo con un vernier manual a 15 plantas por bloque de los tratamientos.

Durante la séptima y octava aplicación de la bacteria, se tomaron completamente al azar 20 frutos por bloque de cada tratamiento y se les determinó el peso con una balanza analítica y el diámetro ecuatorial y polar con un vernier manual.

Después de 15 días de la octava aplicación de la bacteria, se contabilizó en 10 zonas el número de varetas en un metro lineal de cada bloque de los tratamientos.

En la octava y doceava aplicación de la bacteria, se tomaron 15 hojas por bloque de cada tratamiento y se analizó el área foliar con el programa Image J.

Durante la cuarta, sexta, séptima y décima aplicación de la bacteria, se determinó el contenido de clorofila en el foliolo medio de la hoja de frambuesa que se encontraba 30 cm del tallo medido desde el ápice hacia abajo. Se utilizó el SPAD 502 marca Minolta para el muestreo. Se analizaron 15 folíolos de cada bloque de los tratamientos.

Presencia de *B. subtilis* en raíz de planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748)

Quince días después de la onceava aplicación de la bacteria, se colectaron trozos de raíz de frambuesa de aproximadamente 6 cm de longitud se tomaron con guante estériles. Se tomó un trozo de raíz por planta y se consideraron 10 plantas por bloque de cada tratamiento. Cada trozo de raíz fue envuelto en papel aluminio y colocado en bolsas con cierre hermético estériles e inmediatamente se colocaron en la hielera.

En el laboratorio, se cortaron trozos de raíz de aproximadamente 0.5 cm y sembraron en Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubaron a temperatura ambiente (18 -25 °C) hasta la aparición de bacterias. Se determinó en los trozos el porcentaje de presencia de bacteria del género *Bacillus*.

Para la identificación morfológica de *Bacillus*, se realizó un frotis de bacteria sobre porta objetos y visualizó en el microscopio compuesto e identificó mediante las claves morfológicas propuestas por Realpe *et al.*, (2002).

Identificación de hongos presentes en el sistema radical de planta de frambuesa

En los trozos de raíz de frambuesa se presentaron algunos hongos que también fueron identificados. Para esto, se purificaron, se tomó un fragmento de micelio y se colocó en caja Petri con medio PDA, éstas se incubaron a 25 °C hasta que hubo desarrollo micelial. Posteriormente el micelio se transfirió a PDA para la purificación del hongo.

De los hongos purificados se tomó una muestra con cinta adhesiva, se colocó sobre una porta objetos y se identificaron morfológicamente mediante las claves propuestas por Montero en 2018, con apoyo del microscopio compuesto.

También se realizó la identificación molecular de los hongos purificados. Se realizó la extracción de ADN mediante la técnica propuesta por Tapia *et al.* (2006), con mínimas modificaciones. Posteriormente el ADN se sometió a PCR para la amplificación de las regiones ITS 1 e ITS 4 mediante el Kit de la marca Bioline (MyTaq™ DNA Polymerase). El programa de amplificación consistió en 1 ciclo de 5 min a 94 °C y 35 ciclos de 0.3 s a 94 °C, 0.35 s a 60 °C y 0.35 s a 72 °C y una extensión final de 10 min 72 °C y 10 min de enfriamiento a 8 °C. Se corroboró la presencia de amplicones en un gel de agarosa al 1%. Los resultados se enviaron a secuenciar en la empresa Macrogen Corea. Para la identificación de la especie, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia de la base de datos del NCBI. Se consideró como identificación positiva cuando el porcentaje de cobertura y la identidad fueron superiores al 95%.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba e Tukey ($\leq 0,05$) con el programa Statistical Analysis System versión 9.4 para Windows 10.

4. Resultados

Análisis químico del suelo de frambuesa

El análisis químico del suelo, permitió analizar las condiciones iniciales en las que se encontraba el suelo del cultivo de frambuesa las cuales se muestran en la **Tabla 2**. Las condiciones establecidas se calificaron de acuerdo a lo establecido en la NOM 021 SEMARNAT 2000. El sodio al no ser un nutriente esencial para la planta de frambuesa no está reportado en la NOM 021 SEMARNAT 2000.

Tabla 2 Análisis del suelo antes de la aplicación de *B. subtilis* al cultivo de frambuesa

Parámetro (Unidad de medida)	Resultado	InterpretaciónNOM 021 SEMARNAT 2000
pH	7.06	Neutro (6.6-7.3)
CE (dS/cm)	1.77	Muy ligeramente salino (1.1-2.0)
Textura	Arcilla 69%, Limo 14% y Arena 17%.	Arcilla
M.O (%)	1.34	Bajo (0.6-1.5)
Fósforo (mg Kg ⁻¹)	53.9	Alto >11
Boro (mg Kg ⁻¹)	0.78	Bajo (0.39-0.79)
Nitrógeno (%)	0.03	Muy bajo <0.05
Calcio (cmol Kg ⁻¹)	20.7	Alta (>10)
Magnesio (cmol Kg ⁻¹)	0.70	Baja (0.5-1.3)
Sodio (cmol Kg ⁻¹)	1.6	No aplica
Potasio (cmol Kg ⁻¹)	1.8	Alta (>0.6)
CIC (cmol Kg ⁻¹)	34.9	CIC Alta (25-40)
Cobre (mg Kg ⁻¹)	1.84	Adecuado >0.2
Zinc (mg Kg ⁻¹)	1.68	Adecuado >1.0
Hierro (mg Kg ⁻¹)	0.33	Deficiente Marginal <0.5

Manganeso (mg Kg ⁻¹)	33.62	Adecuado >1.0
----------------------------------	-------	---------------

Las características químicas del suelo se modificaron respecto a las condiciones iniciales para ambos tratamientos. El segundo análisis de suelo se realizó en la etapa productiva de frambuesa. Donde se presentó diferencia significativa en pH y CE con una disminución de tales parámetros, en plantas que se trataron con *B. subtilis* en comparación con las plantas testigo (**Tabla 3**). En lo que respecta a pH hubo una tendencia mínima a la alcalinización lo cual permite reclasificar ambos tratamientos como medianamente alcalinos, de acuerdo a lo establecido en la NOM 021 SEMARNAT 2000. La CE disminuyó en relación a las condiciones iniciales del cultivo, siendo menor la presencia de sales en el tratamiento con bacteria y permitiendo dar una nueva clasificación como suelo con efectos despreciables de sales (**Tabla 3**). La cantidad de sodio también aumentó en ambos tratamientos, respecto a las condiciones iniciales del cultivo, seguramente debido a la aplicación de fertilizantes e insumos químicos durante el ciclo productivo. La CIC no cambió su clasificación, sin embargo, tuvo ligero aumento en ambos tratamientos, con un valor mayor en el testigo (**Tabla 3**). El calcio se comportó de manera similar. El magnesio pasó de una concentración inicial baja a alta, con una concentración ligeramente mayor en el testigo. El potasio y el sodio también aumentaron respectivamente a las condiciones iniciales pasando de una clasificación media a alta (**Tabla 3**). El fósforo se mantuvo dentro de la misma clasificación que al inicio, con una concentración mayor en el testigo. El nitrógeno se mantuvo dentro de la clasificación baja en el segundo análisis, sin embargo, la concentración aumentó ligeramente en el tratamiento con la bacteria.

Tabla 3 Análisis de suelo inicial y post-aplicación de *B. subtilis*

Determinaciones	Inicio	<i>B. subtilis</i>	Testigo
pH	7.06	7.4 ±0.18 B	7.6 ±0.18 A
CE dS/Ms	1.77	0.83 ±0.03 B	1.01 ±0.01 A
CIC Cmol (+)/Kg	34.9	35.55 ±2.6 A	38.55 ±0.9 A
Calcio Cmol (+)/Kg	20.7	31.6±1.6 A	32.41 ±1.1 A
Magnesio Cmol (+)/Kg	0.70	40.03 ±4.191 A	40.81 ±1.3 A

Sodio Cmol (+)/Kg	1.59	4.87 ±0.5 A	4.42 ± 0.4 A
Potasio Cmol (+)/Kg	1.78	4.84 ± 0.5 A	4.53 ± 0.3 A
Fósforo (mg/kg)	53.96	67.32 ±26.8 A	83.06 ±26.0 A
Nitrógeno %	0.032	0.022 ±0.004 A	0.017 ±0.006 A

Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente.

Análisis foliar

En la **Tabla 4**, se presentan los análisis foliares de hoja de frambuesa, realizados después de la séptima aplicación de *B. subtilis* en planta de frambuesa a 120 días de tratamiento y no se presentaron diferencias significativas en los elementos. Los elementos que presentaron un incremento positivo con el tratamiento de *B. subtilis*, fueron potasio (K), manganeso (Mn) y zinc (Zn). Los elementos restantes calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), hierro (Fe), fósforo (P) y nitrógeno (N) presentaron valores mayores para el testigo; a excepción del sodio (Na) el no presentó diferencias entre los tratamientos.

Tabla 4 Análisis foliar de frambuesa a los 120 días

	<i>B. subtilis</i>	Testigo	Óptimo (Jones <i>et al.</i> , 1991)
Ca %	0.061 ±0.02 A	0.1 ±0.05 A	0.8-1.5
Mg %	0.209 ±0.02 A	0.254 ±0.01 A	>0.3
Na %	0.012 ±0.0 A	0.012 ±0.0 A	
K %	1.25 ±0.03 A	1.21 ±0.04 A	1.5-3.0
Cu ppm	8.66 ± 0.8 A	9.52 ± 1.0	3-50
Fe ppm	67.50 ± 10.7 A	71.95 ± 9.8 A	30-150
Mn ppm	185.48 ±29 A	175.65 ± 29 A	50-250
Zn ppm	20.47 ± 10.7 A	5.33 ± 8.8 B	3-5
P %	0.292 ± 0.09 A	0.410 ± 0.05 A	0.3-0.5
N%	2.01 ±0.9 A	2.04 ± 1.0 A	2.5-4.0

Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente.

En la **Tabla 5**, se presentan los análisis foliares de hoja de frambuesa, realizados después de la onceava aplicación de *B. subtilis* en planta de frambuesa a los 200 días de tratamiento. Hubo diferencia significativa en los elementos hierro (Fe), manganeso (Mn) y fósforo (P) con valores mayores para el tratamiento con *B. subtilis*. El calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) tuvieron valores similares entre los tratamientos, lo mismo ocurrió con el cobre (Cu) el cual no fue detectado en esta ocasión en ninguno de los tratamientos, en el caso del nitrógeno (N) y zinc (Zn) los valores presentados fueron menores para el tratamiento con *B. subtilis* respecto al testigo.

Tabla 5 Análisis foliar de frambuesa a los 200 días

	<i>B. subtilis</i>	Testigo	Óptimo
Ca %	0.2 ±0.09 A	0.2 ±0.02 A	0.8-1.5
Mg %	0.01 ±0.01 A	0.01 ±0.01 A	>0.3
Na %	1.2 ±0.001 A	1.2 ±0.001 A	
K %	1.2 ±0.03 A	1.2 ±0.02 A	1.5-3.0
Cu ppm	ND	ND	3-50
Fe ppm	173 ±7.25 A	95 ±7.6 B	30-150
Mn ppm	414 ±85 A	252 ±107 B	50-250
Zn ppm	33 ± 5 A	36 ± 5 A	3-5
P %	0.31 ±0.19 A	0.12 ±0.10 B	0.3-0.5
N%	1.4 ± 1.2 A	2.7 ±0.2 A	2.5-4.0

Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente. (Jones *et al.*, 1991)

Evaluación de variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) en campo

En la **Tabla 6**, se presentan los resultados de cuatro muestreos de clorofila tomadas entre los 60 y 120 días del crecimiento de plantas de frambuesa con los tratamientos. La clorofila mostró un incremento significativo a los 90 y 105 días en plantas del tratamiento con *B. subtilis* en comparación con las plantas testigo.

Tabla 6 Contenidos medios de clorofila (Unidades SPAD) en plantas de frambuesa con los tratamientos

Núm. de aplicaciones de <i>B. subtilis</i>	Días	<i>B. subtilis</i>	Testigo
4	60	40.2 ± 3.5 A	40.0 ± 3.5 A
6	90	41.1 ± 3.6 A	38.8 ± 3.6 B
7	105	42.8 ± 3.7 A	41.0 ± 3.8 B
10	120	41.6 ± 4.2 A	40.2 ± 4.2 A

Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente.

Las variables de crecimiento analizadas en plantas de frambuesa con los tratamientos se muestran en la **Tabla 7**. Se presentaron siendo significativamente mayores las variables de área foliar, número de yemas productoras, ancho del tallo, número de frutos por cargador y peso del fruto en plantas con el tratamiento de *B. subtilis* en comparación con las testigos.

Tabla 7 Variables de crecimiento vegetativo en plantas de frambuesa con los tratamientos

Variable de crecimiento	<i>B. subtilis</i>	Testigo
Área foliar (cm)	70.34 ± 2.7 A	63.33 ± 4.9 B
Número de yemas productoras (cm)	9.5 ± 1.4 A	8.6 ± 1.5 B
Número de cañas	29 ± 6 A	26 ± 6 B
Ancho del tallo (cm)	0.51 ± 0.7 A	0.41 ± 0.7 B
Número de frutos por cargador	33 ± 7.9 A	30 ± 7.1 B
Peso del fruto a los 105 días (g)	6.1 ± 1.2 A	5.4 ± 1.3 B
Peso del fruto a los 120 días (g)	5.5 ± 0.7 A	4.7 ± 0.8 B
Diámetro polar del fruto a los 105 días (cm)	2.5 ± 0.3 A	2.4 ± 0.3 A
Diámetro polar del fruto a los 120 días (cm)	2.3 ± 0.3 A	2.2 ± 0.4 A
Diámetro ecuatorial del fruto a los 105 días (cm)	1.9 ± 0.2 A	1.6 ± 0.3 A
Diámetro ecuatorial del fruto a los 120 días (cm)	1.8 ± 0.12 A	1.8 ± 0.12 A

Medias seguidas por letras distintas difieren significativamente.

El incremento de las variables de crecimiento en porcentaje se presenta en la **Tabla 8**.

Tabla 8 Incremento en las variables vegetativas en plantas de frambuesa con la inoculación de *B. subtilis*

Parámetro	Incremento con la inoculación <i>B. subtilis</i>	
	Porcentual	Absoluto
Área foliar (cm)	10%	7.01
Número de yemas productoras (30 cm)	10%	0.9
Número de cañas	10%	3
Ancho del tallo (cm)	20%	0.1
Número de frutos por cargador	9%	3
Peso del fruto a los 105 días (g)	12%	0.7
Peso del fruto a los 120 días (g)	15%	0.8

Se presentan las variables con diferencia significativa estadísticamente.

Determinación de la presencia de *B. subtilis* en raíz de planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748).

En la **Tabla 9**, se muestra el porcentaje de presencia de bacterias con características del género *Bacillus* en cada bloque de los tratamientos. En los trozos de raíces de plantas que se trataron con *B. subtilis* se presentó en un 100% bacterias con características similares a las del género *Bacillus*, colonias de aspecto liso, mucoide o rugoso y los bordes ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos (Realpe *et al.*, 2020). En los trozos de raíces de plantas testigo, no se presentó bacterias con esas características

Tabla9 Porcentaje de presencia de bacterias del género *Bacillus* en los trozos de raíces de planta de frambuesa

Bloque	Tratamientos	
	<i>B. subtilis</i> (%)	Testigo (%)
1	100A ± 0	0 B ± 0
2	100A ± 0	0B ± 0

3	100A ± 0	0B ± 0
4	100A ± 0	0B ± 0

Hongos presentes en raíces de plantas de frambuesa de los tratamientos

En los trozos de raíces de plantas del tratamiento con *B. subtilis*, fue evidente la presencia de *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp. En las raíces de plantas testigo, los aislamientos correspondieron a *Botrytis* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Phytophthora* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., En la **Tabla 10** se muestran los porcentajes de su presencia.

Tabla 10 Porcentaje de presencia de hongos en raíces de las plantas de frambuesa de los tratamientos.

Especie de hongos	<i>B. subtilis</i>	Testigo
<i>Aspergillus</i> sp	77.5 %	33%
<i>Penicillium</i> sp	67%	40%
<i>Botrytis</i> sp	0 %	68%
<i>Colletotrichum</i> sp	0 %	30%
<i>Rhizopus</i> sp	0 %	18%
<i>Alternaria</i> sp	0 %	2.5 %
<i>Fusarium</i> sp.	0 %	20%
<i>Cladosporium</i> sp	0 %	10%
<i>Phytophthora</i> sp	0 %	53%

Las especies identificadas molecularmente fueron: *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*.

5. Discusión

Análisis químico del suelo de frambuesa

El pH aumentó en ambos tratamientos (*B. subtilis*=7.4, Testigo=7.6) respecto a las condiciones iniciales del cultivo (7.06), similar a lo ocurrido en el experimento de un sistema de rotación soya-tomate, con incorporación de biomasa verde y aplicación de inóculos microbianos individuales, donde el pH aumentó significativamente en todos los tratamientos respecto a las evaluación inicial; debido a la acumulación de elementos solubles la CE aumentó sin presentar riesgos para el desarrollo de las plantas, lo cual fue opuesto a lo ocurrido en este experimento donde la CE disminuyó respecto a las condiciones iniciales (1.77 dS/m) siendo significativamente menor para el tratamiento con *B. subtilis* posiblemente debido a la solubilización de bases por acción de los microorganismos (Castro Barquero *et al.*, 2015).

En plantas de frambuesa con *B. subtilis* GOS 01 B-67748 disminuyó la conductividad eléctrica del suelo a 0.83 dS/m en comparación con el testigo 1.01 dS/m esto coincide con lo reportado por Escobar *et al.* (2011), quienes encontraron que *B. subtilis* pueden reducir CE del suelo de 6,1 dS/m a 1,6 dS/m dado que estabilizan las sales solubles del suelo. Esta respuesta en la CE en el suelo es contraria a lo que suele pasar con la fertilización química, como se ha demostrado en algunos trabajos como el realizado por Orozco *et al.*, en 2016, quienes en una plantación de manzanas (*Malus domestica* Borkh) cv. Golden Supreme, en campo aplicaron dos tratamientos T-1 biofertilización + fertilización química, (biofertilizante: (*Azotobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhizobium etli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense*, *Actinomyces* spp. y *Lactobacillus* spp.), aminoácidos, enzimas, ácidos húmicos y fúlvicos, con aporte de macro y micro elementos minerales), T-2 (fertilización química) como testigo que representó el manejo tradicional del productor durante 3 años y se obtuvo que la CE incrementó en ambos tratamientos debido a la acumulación de sales ocasionadas por la fertilización química.

Variables de promoción de crecimiento en planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) en campo

En un experimento realizado en invernadero con frambuesa de variedad “Heritage” se encontró que la inoculación con combinaciones de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) generaron un impacto positivo en el aumento del contenido de clorofila (BF4=37.24, BF5=37.85 y Control=29.22) (Balci *et al.*, 2020), similar a lo ocurrido en este experimento donde la cantidad media de clorofila fue mayor para el tratamiento con *B. subtilis* respecto al control. Además, se conoce que la inoculación de cultivos como fresa (*Fragaria xananassa*) con RPCV contribuye a disminuir el impacto negativo del estrés abiótico que ocasiona la salinidad (Karlidag, 2013).

Respecto a diámetro polar y ecuatorial no presentaron diferencias significativas en este experimento sin embargo se observó una tendencia positiva para el tratamiento con *B. subtilis* respecto al testigo, lo que concuerda con lo obtenido por Juárez *et al.*, en 2018, en un experimento realizado en melón *Cucumis melo*, L a nivel invernadero inoculado con *B. subtilis* y un control sin inóculo bacteriano, donde en el diámetro ecuatorial a los 105 días (séptima aplicación de *B. subtilis*) no hubo diferencias significativas pero los tratamientos inoculados con cepas de *B. subtilis* tuvieron una longitud mayor respecto al control a los 120 días ambos (octava aplicación de *B. subtilis*) tratamientos pueden considerarse estadísticamente iguales (*B. subtilis*=1.9 Testigo=1.6, *B. subtilis*=1.8, Testigo=1.8), en lo que respecta al diámetro polar hubo diferencias significativas a los 105 y a los 120 días respectivamente (*B. subtilis*=2.5 Testigo=2.4, *B. subtilis*=2.3 Testigo=2.2) , manteniendo un valor menor para el control sin inoculación.

En un cultivo de frambuesa con inoculación de *B. subtilis* pre plantación (1×10^6 UFC/mL) ubicado en Siberia con condiciones climáticas adversas como heladas, *B. subtilis* logró disminuir los daños por estrés abiótico y logró promover el crecimiento vegetal debido a que aumentó el número de cañas productoras (5.9) respecto al control con (4.9) y el número de yemas productoras a 94.5 para el tratamiento con *B. subtilis* y 59.7 para el control, generando un impacto positivo en el rendimiento del cultivo (Belyaev *et al.*, 2017) lo que concuerda con lo obtenido con la inoculación de *B. subtilis* 01 B-67748 en frambuesa, que

aumentó el número de cañas a 29 mientras el control fue de 26, el número de yemas productoras fue de 9.5 para el tratamiento con *B. subtilis* y el control de 8.6.

En cacao (*Theobroma cacao*) *B. subtilis* mediante el mecanismo de colonización de la hoja aumentó el área foliar 64.37 cm² respecto al control 56.42 cm² lo cual fue similar a lo ocurrido en este experimento que aumentó el área foliar a 70.34 cm² respecto al control de 63.33 cm² e incrementó la altura del tallo (15.26 cm) 7.6% respecto al control (14.18 cm) y el largo del sistema radicular que son tejidos vegetales de interés productivo (Falcão, *et al.*, 2014). El largo del tallo en plántulas de *Solanum lycopersicum* mostró promoción de crecimiento al adicionar caldo de fermentación de una concentración de 1x10⁷ UFC de cepas de *B. subtilis* presentando diferencias estadísticas significativas la cepa BS8 debido a que incrementó el largo del tallo un 45 %, BS14 un 33%, y BSN un 17 % respecto al control (Anguiano *et al.*, 2019). *Bacillus subtilis* GIBI 200, mostró capacidad para solubilizar fostatos y producir ácido indol acético (5.47 µg / ml), en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) “Santa Clara” incrementando el largo del tallo y de raíz en un 10.4% y un 17.2% respectivamente, debido al incremento de la longitud de ambos parámetros de crecimiento la masa tanto fresca y seca tuvo un comportamiento similar, la producción de ácido indol acético se relaciona a la estimulación de crecimiento vegetal, debido a que incrementa la división celular y la diferenciación de los tejidos, parámetros que se ven reflejados en un aumento de biomasa, en raíces y semillas aumenta la absorción de nutrientes y agua, lo cual corrobora la capacidad de promoción de crecimiento de *B. subtilis* (Cabra Cendales *et al.*, 2017).

La aplicación de *B. subtilis* en el fruto del chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.), incrementó significativamente la altura de plantas respecto al testigo, aumento el volumen de la raíz y la acumulación de Fósforo en los frutos, en lo que respecta al peso del fruto si bien la diferencia no fue significativa se tuvo un aumento (37.41g) en el tratamiento con *B. subtilis* del peso del fruto respecto al control (36.94 g) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2020), en este trabajo el aumento del peso del fruto fue estadísticamente diferente, es decir en la séptima y octava aplicación de *B. subtilis* respectivamente, siendo mayor para el tratamiento con *B. subtilis* (105 días *B. subtilis*=6.1 g Testigo=5.4 g y 120 días *B. subtilis*=5.5 g Testigo=7.4 g) El peso del fruto es un indicador de calidad bioquímica del fruto, el aumento está

relacionado con el efecto bioestimulante, biofertilizante y biorregulador respecto al control tratado con fertilización química (Alarcón Zayas *et al.*, 2018).

Análisis foliar

Los resultados del análisis del tejido vegetal reportados en este estudio en comparación con los óptimos propuestos por Jones *et al.*, en 1991, muestran deficiencias en ambos tratamientos en los elementos como Ca, Mg, K. En lo que respecta a Cu en el mes de octubre estaba dentro del rango óptimo, sin embargo, para el mes de noviembre no fue detectado concentración del metal en el tejido vegetal de las plantas, lo que puede ocasionar pérdida de agua por exudación. Los elementos que se encontraron en condiciones adecuadas en el tejido de las plantas fueron Fe, Mn, Zn y P. Puesto que el sodio no es considerado un nutriente esencial de las plantas debido a esto no se encuentra registrado su requerimiento. En estudios realizados se ha demostrado que la inoculación de *Bacillus* aumentó el nitrógeno foliar en frijol, café, sauce, plátano y álamo, mientras que resultados contrastantes fueron reportados para girasol donde no ocurrió un aumento del nitrógeno foliar (Jang *et al.*, 2018), similar a lo ocurrido en este experimento en las dos ocasiones analizadas (A 5 aplicaciones de *B. subtilis*=2.01% Testigo=2.04% a 8 aplicaciones de *B. subtilis*=1.4% Testigo=2.7%).

De acuerdo al experimento realizado por Castro Barquero *et al.* (2015) la inoculación con microorganismos incrementa el contenido foliar de los elementos, debido a, a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias que hacen solubles formas poco disponibles de nutrimentos adyacentes a la raíz por lo cual incrementan la absorción de nutrientes por la planta; en lo que respecta al fósforo el incremento del elemento lo relaciona a la capacidad de solubilización del mismo por acción de los microorganismos, como en este trabajo en el cual a los 200 días que se analizó el fósforo presentó diferencias estadísticas positivas para el tratamiento con *B. subtilis* respecto al testigo (200 días, *B. subtilis*=0.31, Testigo=0.12).

En lo que respecta al nitrógeno en el tejido foliar fue encontrado en menor cantidad para el tratamiento con *B. subtilis* respecto al testigo, (a los 120 días *B. subtilis*=2.01, Testigo=2.04; a los 200 días *B. subtilis*=1.4 Testigo=2.7), esta disminución pese a que no es

significativa puede atribuirse a que tanto los microorganismos como las plantas, son dependientes del mismo en forma inorgánica (nitratos (NO₃) y amonio (NH₄) para realizar sus funciones vitales (Ramírez *et al.*, 2017).

Presencia de *B. subtilis* en raíz de plantas de frambuesa

En un experimento realizado por Jiménez en 2018 se determinó que *B. subtilis* se desarrolla en rangos de temperatura de 15 a 37° Cy pH de 5 a 8. Las condiciones de pH presentadas en el huerto de frambuesa se encontraban en 7.06 al inicio, 7.4 en el tratamiento con *B. subtilis* y 7.6 en el testigo, los cuales se encuentran dentro del rango óptimo de crecimiento de la bacteria, se puede suponer que las condiciones de pH para el establecimiento o desarrollo de la bacteria en las raíces de la planta se presentaron, además se corrobora con la presencia del género *Bacillus*, en las raíces de plantas de frambuesa que se trataron con *B. subtilis* GOS 01 B-67748

Kashyap en 2019, aplicó *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, en un cultivo de cerezas (*Prunus avium* L.) en campo y demostraron su capacidad colonizadora en hoja de cereza y actividades antagónicas por competencia de nutrimentos o de nicho ecológico, se promovió el crecimiento de la planta al controlar hongos patógenos. Se pudo aislar bacterias del género *Bacillus spp.*, de las hojas y los aislados se identificaron como, *B. methylotrophicus* CBMB205 (100%) y *B. amyloliquefaciens* sub sp. *plantarum* FZB42 (99.9%).

Presencia de hongos

El tratamiento de cultivos en condiciones controladas con inoculación de microorganismos benéficos eficientes y competitivos de la rizósfera como *B. subtilis*, otorga beneficios que pueden ser observados desde el punto de vista sanitario tanto como en el rendimiento de los mismos, en un experimento realizado por Illa *et al.*, en 2019 en maní (*Arachis hypogaea*) en condiciones controladas en macetas estériles la aplicación de microorganismos como *B. subtilis* y *Trichoderma harzianum* presentaron un porcentaje de emergencia mayor de semillas 90 para el tratamiento con fungicida y *B. subtilis*, 80 para el fungicida y

Trichoderma harzianum, 90 para la combinación de fungicida, *B. subtilis* y *Trichoderma harzianum*, respecto al testigo 50% y al fungicida 70% debido al control de hongos patógenos; en condiciones de campo ocurrió algo similar en las variables de crecimiento rendimiento, tamaño de grano y formación de biomasa, los tratamientos con biológicos superaron al testigo (Illa *et al.*, 2019), lo que concuerda con lo obtenido en plantas de frambuesa que se trataron con *B. subtilis* que presentaron mayor número de yemas productoras de frutos, de cañas, de frutos por cargador, diámetro de tallo en comparación con las plantas testigo. En las plantas tratadas con *B. subtilis* GOS 01 en este trabajo, las raíces presentaron una menor proporción de los hongos *Colletotrichum* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. *Fusarium* sp. *Cladosporium* sp. *Phytophthora* sp., se ha demostrado en algunos estudios que el efecto antifúngico de *B. subtilis* está estrechamente relacionado con las síntesis de lipopéptidos como fengicina, surfactina e iturina, que poseen propiedades antimicrobianas, se ha encontrado que algunas especies de *Bacillus* pueden controlar a *Xanthomonas oryzae*, *sclerotiorum*, y *Fusarium graminearum* (Xu, *et al.*, 2019).

En un experimento de Benoit en 2015 se encontró que de la misma manera que las bacterias del género *Bacillus* se adhieren a la raíz de la planta, lo hacen al interactuar con *Aspergillus niger*, adhiriéndose al hongo y creciendo en las hifas, alterando su metabolismo al disminuir la producción de surfactina; puesto que la transcripción de genes de defensa antifúngicos de *B. subtilis* y antibacterianos de *Aspergillus* disminuye con la unión de bacterias al micelio, la relación establecida explica porque *Aspergillus* spp., fue encontrado en el 77.5 % de las raíces de frambuesa inoculadas con *B. subtilis*.

En un experimento *in vitro* se cultivó una colonia de la cepa de *B. subtilis* ALB629 en el centro en placas de PDA y alrededor hongos patogénicos, donde *B. subtilis* mostró antagonismo, la inhibición más fuerte se observó para *Colletotrichum* sp., presentando claros halos de inhibición (Falcão *et al.*, 2014), en este experimento la cepa de *B. subtilis* inhibió el crecimiento de *Colletotrichum* sp., el cual no fue encontrado en las raíces sembradas en PDA procedentes del cultivo de frambuesa inoculadas con la bacteria, en el testigo se encontró el hongo en el 30% de los tratamientos lo que sugiere que GOS 01 presenta beneficios en términos de antagonismo contra hongos fitopatógenos. En un experimento realizado en pistache (*Pistacia Vera*) en campo y en laboratorio, se encontró que las bacterias del género *Bacillus*, poseen capacidades antimicotoxigénicas, al ser capaces de biodegradar las micotoxinas *in vitro* e *in vivo* y reducir la cantidad de esporas

producidas y la contaminación por aflatoxinas tanto en campo como en almacenamiento (Siahmoshteh *et al.*, 2017). Las bacterias del género *B. subtilis*, han sido ampliamente utilizadas debido a que su capacidad antagónica contra otros microorganismos debido a que la bacteria impide que se desarrollen microorganismos causantes de fitopatologías lo que permite promover el crecimiento vegetal en varios cultivos, (Hernández-Gómez *et al.*, 2016).

6. Conclusiones

- En general el suelo del cultivo de frambuesa, se encontraba en condiciones para el establecimiento del cultivo de acuerdo a la NOM 021 SEMARNAT 2000. Respecto al contenido nutrimental del suelo rizosférico de la planta de frambuesa tratada con *B. subtilis* GOS 01 B-67748 no se observó diferencia en comparación con las plantas testigo, sin embargo, se disminuyó el pH y conductividad eléctrica con la aplicación *B. subtilis* en las raíces de plantas. En las hojas únicamente se observó un incremento en el contenido de hierro y manganeso.
- Las plantas de frambuesa tratadas con *B. subtilis* presentaron mayor número de yemas productoras de frutos, de cañas, de frutos por cargador, diámetro de tallo, peso de fruto en comparación con las plantas testigo.
- También se presentaron bacterias del género *Bacillus* en un 100% de las raíces de plantas tratadas con GOS 01 B-67748. La presencia de *Colletotrichum* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Phytophthora* sp. fue reducida en las raíces tratadas con *Bacillus subtilis* GOS 01 B-67748

7. Referencias

Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Hashem, A., Radhakrishnan, R., Al-Huqail, A. A., Al-Otibi, F. O. N., ...&Egamberdieva, D. (2018). Endophytic bacterium *Bacillus subtilis* (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 37-44.

Ahemad, M. &Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001.

Alarcón-Zayas, A., Barreiro-Elorza, P., Boicet-Fabré, T., Ramos-Escalona, M., & Morales-León, J. Á. (2018). Influencia de ácidos húmicos en indicadores bioquímicos y físico-químicos de la calidad del tomate. *Revista Cubana de Química*, 30(2), 243-255.

Alonso, J. G., Periago, M. J., Guevara, M. L. V., & Cantos, E. (2002). Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva y frutas rojas. In *Anales de veterinaria de Murcia* (Vol. 18, pp. 103-114). Recuperado a partir de <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/16651>

Alvarado-Raya, H. E., Avitia-García, E., & Castillo-González, A. M. (2017). Producción de frambuesa ‘Autumn Bliss’ con diferentes densidades de caña en el Valle de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(1), 17.

ANABERRIES, A.C. (2019). Asociación Nacional de Exportadores de Berries. Lista de Plaguicidas 19-20. Lista de productos autorizados FRAMBUESA. Zapopan, Jalisco, México.

Anguiano-Cabello, J. C., Flores-Olivas, A., Olalde-Portugal, V., Arredondo-Valdés, R., & Laredo-Alcalá, E. I. (2019). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 6, 13.

Arana, R.M R. (2015). Evaluación e identificación preliminar de la macrofauna asociada al cultivo de piña en la localidad de Poroto AnanasComosus. *Tecnología y desarrollo*, 13, 1.

Balci, G., Keles, h., & Cakmakci, R. (2020). The Effects of Biofertilizers on Some Physiological Responses in Heritage Raspberries. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6), 1422-1427.

Baligar V.C., Fageria N.K. & He Z.L. 2001. Nutrient Use Efficiency in Plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32 (7-8): 921–950.

Bastas, K. K., & Sahin, F. (2014). Screening of blackberry and raspberry cultivars for susceptibility to fire blight disease in Turkey. *HortScience*, 49(12), 1492–1497. <https://doi.org/10.21273/hortsci.49.12.1492>

Batista Sánchez, D., Murillo Amador, B., Nieto Garibay, A., Alcaráz Meléndez, L., Troyo Diéguez, E., Hernández Montiel, L., & Ojeda Silvera, C. M. (2017). Mitigación de NaCl por efecto de un bioestimulante en la germinación de *Ocimum basilicum* L. *Terra Latinoamericana*, 35(4), 309-320.

Belyaev, A. A., Shternshis, M. V., Chechenina, N. S., Shpatova, T. V., & Lelyak, A. A. (2017). Adaptation of primocane fruiting raspberry plants to environmental factors under the influence of *Bacillus* strains in Western Siberia. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 7016-7022.

Benoit, I., van den Esker, M. H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D. J., Blei, F., Zhou, M., ... & Kovács, Á. T. (2015). *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental microbiology*, 17(6), 2099-2113.

Boetto, M. N., & Avila, G. T. (2016). Prácticas agroecológicas para la agricultura familiar. *Sociales Investiga*, (2), 121-125.

Bojórquez, A. D. A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Sánchez, M. Á. A., Montoya, L. G., & Pérez, E. N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 6(1), 51-56.

Bongiovanni, R., Mantovani, E., Best, S., & Roel, Á. (2006). *Agricultura de precisión: integrando conocimientos para una agricultura moderna y sustentable*. Prociur/IICA. Montevideo, Uruguay.

Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils 1. *Agronomy journal*, 54(5), 464-465.

Cabra Cendales, T., Rodríguez González, C. A., Villota Cuasquer, C. P., Tapasco Alzate, O. A., & Hernández Rodríguez, A. (2017). Bacillus effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 37-44.

Çakmakçı, R., & Çakmakçı, S. (2019). Effects of Organic and Conventional Agriculture on Food Quality and Environmental Sustainability. *ICOFAAS 2019*, 337. Antalya, Turquía.

Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., & Fermaud, M. (2019). Microbial antagonism toward Botrytis bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in plant science*, 10.

Campi L., y Silva, S. (1992) Perspectivas para el control biológico de *Botrytis Cinerea*, en frambueso. *Revista Acolmex*: 31. 5-10.

Campos-Mota, L., Baca-Castillo, G. A., Jaén-Contreras, D., Muratalla-Lúa, A., & Acosta-Hernández, R. (2004). Fertirriego y micorriza en frambuesa roja cultivada en tepetate. *Agrociencia*, 38(1), 75-83.

Casillas, J. C., Londoño, J., Guerrero, H., & Buitrago, L. A. (1986). Análisis cuantitativo de la aplicación de cuatro bioestimulantes en el cultivo del rabano (*Raphanus sativus* L.). *Acta Agronomica*, 36(2), 185-195.

Castro Barquero, L., Murillo Roos, M., Lorío, L. U., & Mata Chinchilla, R. (2015). Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (MM) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 39, 21-36

Céspedes, C., & Gonzalez, M. I. (2020). Manual de producción de frambuesas orgánicas. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigación Regional Quilampu*, Chullán, Chile

Chapman, H. D. (1965). Cation-exchange capacity. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 891-901.

Chávez, F. H. R., Violante, H. G. M., Rubi, M. A., Bravo, J., Juárez, M. D. R. A., Rodríguez, S. E. V., & Portugal, V. O. (2019). *Bacillus subtilis* and Its Effect on the Postharvest of Fruit and Flowers. In *Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol* (pp. 63-80). Springer, Cham. Bacilli in Climate Resilient Agriculture and Bioprospecting. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_4

Chile, F. (Gobierno de 2002). Frambuesas en Chile: sus variedades y características. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, Santiago de Chile. https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75369_archivo_01.pdf

Coll, J. B., Rodrigo, G. N., García, B. S., & Tamés, R. S. (2019). *Fisiología vegetal*. Comercial Grupo ANAYA, SA., Madrid, España.

Colli, M. O. U. (2019). Ectomicorrizas: las redes sociales y nutricionales ocultas en el bosque tropical. *Revista de Biología Tropical*, Blog-Blog. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/36149/36806>

Costea, T., Vlase, K., Gostin, I., Olah, N. K., & Predan, G. M. I (2016) Botanical characterization, phytochemical analysis and antioxidant activity of indigenous red raspberry. (*Rubus Idaeus* L.) leaves. *Studia Universitatis Vastle Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii*, 26(4), 463-472.

Cruz-Andrés, O. R., Pérez-Herrera, A., Martínez-Gutiérrez, G. A., & Morales, I. (2018). Cubiertas de macrotúneles y su efecto en las propiedades nutraceuticas del chile de agua. *Revista fitotecnica mexicana*, 41(4A), 555-558.

Cruz-Martín, M., Mena, E., Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Rodriguez, E., & Alvarado-Capó, Y. (2020). Protein compounds of *Bacillus subtilis* with in vitro antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet). *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 265–269. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00136-9>

Cruzat, R., & Barrios, E. (2016). Resultados y Lecciones en Renovación del Material Varietal de Frambuesas y su Desarrollo Productivo: Proyecto de Innovación en IV

Región de Coquimbo: Frutales/Berries. Fundación para la innovación Agraria. Gobierno de Chile. Santiago de Chile.

Demirbas, A., Yilmaz, V., Ildiz, N., Baldemir, A., & Ocoy, I. (2017). Anthocyanins-rich berry extracts directed formation of Ag NPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Molecular Liquids*, 248, 1044–1049. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.130>.

Ducray, H. A. G., Globa, L., Pustovyy, O., Roberts, M. D., Rudisill, M., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2020). Prevention of excessive exercise-induced adverse effects in rats with *Bacillus subtilis* BSB3. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/jam.14544>

DOF (2002) Especificaciones para suelos, muestreo y análisis. *Diario Oficial de La Federación* 85. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

EPA (2016). Environment Protection Agency. Human Health Risk Assessment on Chlorpyrifos, in Environment Protection Agency. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/revised-human-health-risk-assessment-chlorpyrifos>

Escobar, O. Z., Saravia, J. C. O., Guependo, R. C., & Ospina, J. A. P. (2011). Evaluación de tecnologías para la recuperación de suelos degradados por salinidad. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1), 5769-5779.

Espinosa Palomeque, B., Moreno Reséndez, A., Cano Ríos, P., Álvarez Reyna, V. D. P., Sáenz Mata, J., Sánchez Galván, H., & González Rodríguez, G. (2017). Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afrodita en invernadero. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 169-178.

Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnica mexicana*, 36(3), 251-258.

EzzahraHousni, F., Lares-Michel, M., Aguilera-Cervantes, V. G., Guízar Mateos, I., Bracamontes Del Toro, H., Nava, M., & María, R. (2018). Impacto de la producción de berries sobre el comportamiento alimentario en una población de Jalisco, México. *Revista mexicana de trastornos alimentarios*, 9(1), 11-23.

Falcão, L. L., Silva-Werneck, J. O., Vilarinho, B. R., da Silva, J. P., Pomella, A. W. V., & Marcellino, L. H. (2014). Antimicrobial and plant growth-promoting properties of the cacao endophyte *Bacillus subtilis* ALB 629. *Journal of applied microbiology*, 116(6), 1584-1592.

Figuerola, A., & Heinrich, M. (2019). Nutrición Salud Super alimentos 0. *Nutrición. Biomedicina y Nutrición*. <https://biomedicinaynutricion.com/category/superalimentos/>

France, A. I. (2009). Capítulo 4: Enfermedades. Aspectos relevantes en la producción de frambuesa. *Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigaciones Agropecuarias Raihuen*. Villa Alegre, Chile. c Pág 45-60.

Frias-Moreno, M. N., Olivas-Orozco, G. I., González-Aguilar, G. A., Benitez-Enriquez, Y. E., Paredes-Alonso, A., Jacobo-Cuellar, J. L., ... & Parra-Quezada, R. A. (2019). Yield, quality and phytochemicals of organic and conventional raspberry cultivated in Chihuahua, Mexico. *NotulaeBotanicaeHortiAgrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 522-530.

Gamboa-Angulo, J. J., Ruíz-Sánchez, E., Alvarado-López, C. J., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Valdiviezo, V. M., & Medina-Dzul, K. B. (2020). Efecto de biofertilizantes microbianos en las características agronómicas de la planta y calidad del fruto del chile xcat'ik (*Capsicum annuum* L.). *Revista terra latinoamericana*, 38(4), 817-826.

García, A. D., Álvarez, M. I. G., Bernal, E. P. G., Diaz, A. M. S., Barrera, F. M. C., Moreno, D. M. L., ... & Cotes, A. M. (2018) Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas. V. 2 Capítulo 12 Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. (AGROSAVIA)*. Colombia. 632-680.

García, A. G. R., García, L. I. V., & Reyes, M. P. (2018). La germinación de las esporas de *Bacillus subtilis* activa la respuesta celular de daño al material genético. *Jóvenes en la ciencia*, 3, 289-293.

García, R.J.C. 2016. El cultivo de la frambuesa. Sistemas de Plantación y Cultivo del Frambueso. Sesión del Diplomado Internacional en el Cultivo de Berries. Intagri. Gto., México. <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/el-cultivo-de-la-frambuesa>

García, Zoraide. (2006). *Agricultura, expansión del comercio y equidad de género*. Contribución de la Dirección de Género y Población de la FAO a la publicación interagencial de las Naciones Unidas: Gender and Trade: Challenges and Opportunities, 2004. Colaboración de la Dirección de Agricultura y Comercio de la FAO, pp. 1-3. Roma..

Girón, J. M., Rivera, J. V. M., Lopera, K. I. M., & Delgado, I. C. R. (2018). La agroecología: alternativa de desarrollo sustentable ante la crisis ambiental en un mundo globalizado. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(2), 63-76.

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Romandini, S., Bompadre, S., Diamanti, J., ... Battino, M. (2013). The potential impact of strawberry on human health. *Natural Product Research*, 27(4-5), 448-455. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.706294>

González, F., Rebollar, S., Hernández, J., Morales, J., & Ramírez, O. (2019). Situación Actual Y Perspectivas De La Producción De Berries En México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 44(1345-2019-3240), 260-272.

González, M., Céspedes, M., Manual de producción de Frambuesa Orgánica. (2010, Boletín INIA-N° XXX).

Granados Montero, M. D. M. (2018). Identificación morfológica de hongos fitopatógenos: taller básico 2018. http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/79022/Manual_hongos_y_key_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypiumhirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.

Hardwood, C. 1989. Introduction of the biotechnology of *Bacillus*. in: *Bacillus* (Ed.) C. Hardwood, Plenum Press. New York, pp. 412.

Hatanaka, M., Kanzato, H., Tsuda, R., Nadaoka, I., Yasue, M., Hoshino, T., ... Takara, T. (2020). Safety evaluation of the excessive intake of *Bacillus subtilis* C-3102 in healthy Japanese adults: A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel-group,

comparison trial. *Toxicology Reports*, 7(December 2018), 46–58.

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.009>

Heidenreich, C.; Pritts, M.; Demchak, K.; Hanson, E. 2012. High Tunnel Raspberries and Blackberries. Department of Horticulture, Cornell University. Nueva York, EE. UU. 51

Hernández-Gómez, m. D. L. Á., Sánchez, a. K., & Pacheco Aguilar, J. R. (2016). Efecto antagónico de *Bacillus subtilis* Q11 contra el hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. *de la Salud*, 3(6), 28-30

Huang, J., Liu, S., Zhang, C., Wang, X., Pu, J., Ba, F., ... & Wang, Y. (2019). Programmable and printable *Bacillus subtilis* biofilms as engineered living materials. *Nature chemical biology*, 15(1), 34-41.

Huyut, Z., Beydemir, Ş., & Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research international*, 2017.vol. 2017, ArticleID 7616791, 10 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>

Illa, C., Pérez, A. A., Torassa, M., & Pérez, M. A. (2019). Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(1)

Isticato, R., Lanzilli, M., Petrillo, C., Donadio, G., Baccigalupi, L., & Ricca, E. (2020). *Bacillus subtilis* builds structurally and functionally different spores in response to the temperature of growth. *Environmental Microbiology*, 22(1), 170–182. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14835>

Jara-Peña, E., Villegas, Á., Sánchez, P., Trinidad, A., Muratalla, A., & Martínez, Á. (2003). Crecimiento vegetativo de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) 'Autumn bliss' con la aplicación de vermicomposta asociada con lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet.). *Revista peruana de Biología*, 10(1), 44-52.

Jang, J. H., Kim, S. H., Khaine, I., Kwak, M. J., Lee, H. K., Lee, T. Y., ... Woo, S. Y. (2018). Physiological changes and growth promotion induced in poplar seedlings by the

plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* JS. *Photosynthetica*, 56(4), 1188–1203. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0801-0>

Jia, T., Guo, T., Cao, M., &Chai, B. (2018). Effects of heavy metals on phyllosphere and rhizosphere microbial community of *bothriochloaischaemum*. *Applied Sciences*, 8(9), 1419.

Jiménez- Delgadillo, R., Valdés- Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagonica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>

Jones Jr, J. B., Wolf, B., & Mills, H. A. (1991). *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretationguide*. Micro-Macro Publishing, Inc. U. S. A.

Juárez, M. D. R. A., Vázquez, I. E., Mendoza, R. G., Portugal, V. O., Aguilar, G. M. R., Hernández, J. L. G., ... & Palenius, H. G. N. (2018). Development, yield, and quality of melon fruit ("*Cucumis melo*" L.) inoculated with mexican native strains of "*Bacillus subtilis*"(ehrenberg). *Agrociencia*, 52(1), 91-102.

Karlıdag, H. (2013) Plant Growth-promoting Rhizobacteria Mitigate Deleterious Effects of Salt Stress on Strawberry Plants (*Fragaria 3ananassa*). Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Inonu University, Malatya, Turkey Ertan.

Kovács, Á. T., & Dragoš, A. (2019). Evolved biofilm: review on the experimental evolution studies of *Bacillus subtilis* pellicles. *Journal of molecular biology*, 431(23), 4749-4759.

Kovacs, E. D., Rusu, T., Lech, W. S., Kovacs, M. H., Di, T., & Roman, C. (2019). Rhizosphere microbiota profile changes with different genetic types of tomato species. *AGRICULTURA*, 109(1-2), 140-150.

Lagler, J. C. (2017). Bioinsumos: distintas percepciones haciendo foco en la fertilización biológica. *Agronomía & Ambiente*, 37(1)

Laurin, M., Llosá, M. J., González, V., Porcuna, J. L., & CAPA, S. V. (2006). El papel de la agricultura ecológica en la disminución del uso de fertilizantes y productos fitosanitarios químicos. *Recuperado de [www. agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/105%20Laurin%20Com-%20El%20papel.pdf](http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2006/CD%20Congreso%20Zaragoza/Ponencias/105%20Laurin%20Com-%20El%20papel.pdf)*.

Leiva, M., Schmidt, G., & Gajardo, E. (2017). Cartilla hortofrutícola frambuesa. Proyecto: Modelo de adaptación al cambio climático por medio de la zonificación de aptitud productiva de especies hortofrutícolas priorizadas en la Región del Biobío. Folletos IREN-CIREN 2017. Chile

Lima, G. T. C., & Montezuma, M. A. A. (2019). Sustainable management for the production of biofungicides and strengthening of the Venezuelan agricultural bio-inputs sector. *Enfoque UTE*, 10(1), 26-40.

Lisboa, M. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinera.

Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.

Luche, S., Eymard-Vernain, E., Diemer, H., Van Dorsselaer, A., Rabilloud, T., & Lelong, C. (2016). Zinc oxide induces the stringent response and major reorientations in the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *Journal of proteomics*, 135, 170-180.

Mamani de Marchese, A., & Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista agronómica del noroeste argentino*. AGRIS. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AR2018O00159>

Morales, C. G., Hirzel, J., Riquelme, J., Herrera, G., Madariaga, M., Devotto, L., & José San Martín, A. (2009). Aspectos relevantes en la producción de frambuesa (*Rubus Idaeus* L.). *Villa Alegre-Chile: Editorial Imprenta Gutemberg*.

Morales, C. G., Riquelme, J., & Hirzel, J. (2017). Manual de manejo agronómico del frambueso. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Chile) Boletín INIA N°372. Región del Maule: Región del Biobío. <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR40976.pdf>

Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Carrillo, R., Luis, J., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.

Mumtaz, M. Z., Ahmad, M., Jamil, M., & Hussain, T. (2017). Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological research*, 202, 51-60.

Muratalla-Lúa, A., Jaen-Contreras, D., & Arévalo-Galarza, L. (2013). La producción de frambuesa y zarzamora en México. *Agroproductividad*, 6(5), 3-13.

Nava-Pérez, E.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3b): 17-29.

Neilsen, D., Neilsen, G., & Forge, T. (2017, June). Building resilience: future directions in mineral nutrition of woody perennial crops. In *VIII International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops 1217* (pp. 1-12).

Ochoa, E. R., Sánchez, R. E. P., Val, T. C. Á., Leyva, J. F. G., & Saucedo, P. A. G. (2019). Propiedades fisicoquímicas de frutos silvestres de *Rubus* con potencial nutracéutico y alimenticio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (23), 291-301.

Olsen, S. R. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate* (No. 939). US Department of Agriculture.

Orozco Corral, A. L., Valverde Flores, M. I., Martínez Téllez, R., Chávez Bustillos, C., & Benavides Hernández, R. (2016). Propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo con biofertilización cultivado con manzano. *Terra Latinoamericana*, 34(4), 441-456.

PAMPLONA, R. 2003. El poder medicinal de los alimentos. 1° ed. Editorial Safeliz. Buenos Aires, Argentina. 383p.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5., E47. doi:10.1017/jns.2016.41

Parra-Quezada, R. A., Ramírez-Legarreta, M. R., Jacobo-Cuellar, J. L., & Arreola-Avila, J. G. (2008). Fenología de la frambuesa roja 'Autumn Bliss' en Guerrero, Chihuahua, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(1), 91-96.

Patle, P. N., Kadu, P. R., Gabhane, A. R., Pharande, A. L., Bhagat, A. P., Bhojar, S. M., ... & Rahangdale, M. K. (2020). Consequences provoked due to excess application of agrochemical on soil health deterioration—A review for Sustainable Agriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 63-66.

Petersen, B., & Snapp, S. (2015). *What is sustainable intensification? Views from experts*. *Land use policy*, 46, 1-10.

Piechowicz, B., Mróz, K., Szyrka, E., Zwolak, A., & Grodzicki, P. (2018). Transfer of plant protection products from raspberry crops of Laszka and Seedling varieties to beehives. *Environmental monitoring and assessment*, 190(3), 135.

Poveda Coronel, C. A., Riano Jimenez, D., Aguilar Benavides, L., & Cure, J. R. (2018). Efficiency of Pollination by Orphan Colonies of *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) in Strawberry (*Fragaria x ananassa*) in Greenhouse. *Acta Biológica Colombiana*, 23(1), 73-79.

Puspita, F., Poromorto, S. H., & Roslim, D. I. (2020). Induced resistance by *Bacillus subtilis* on oil palm seedling infected by *Ganoderma boninense*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(1).

Quintero Rodríguez, E., Calero Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., & Enríquez Gómez, L. (2018). Efecto de diferentes bioestimulantes en el rendimiento del frijol común. *Centro Agrícola*, 45(3), 73-80.

Ramírez, L. C. C., Lozano, L. C., Méndez, M. A. G., Rojas, S. J. R., & Torres, J. N. R. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 45-65.

Raul Tapia-Tussell, Patricia Lappe, Miguel Ulloa, Andrés Quijano-Ramayo, Mirbella Cáceres-Farfán, Alfonso Larqué-Saavedra and Daisy Perez-Brito. 2006. A Rapid and Simple Method for DNA Extraction From Yeasts and Fungi Isolated From *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*. 33. 66-70.

Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). Species of the Bacillus strain: macroscopic and microscopic morphology. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(2), 106–109. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>

Rebollar, Alviter, Angel, Leyva, Mir, Santos Gerardo, Mora, Aguilera, Gustavo, Valdovinos, Ponce, Guadalupe, Romero, Cova, Sebastián. Identificación y Biología del Agente Causal de la Roya de la Frambuesa Roja (*Rubus idaeus* L.) en México *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea] 2001.

Rodoni, L. M., Massolo, J. F., Badin, E., Moroni, F., Vicente, A. R., & Lespinard, A. R. (2017). Efecto del tratamiento térmico sobre el color y contenido de antocianinas en jugos de zarzamora y frambuesa. In *I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha y IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha (Concordia, Entre Ríos, 25 al 27 de octubre de 2017)*.

Rodríguez-Preval, N., Fernández-Molina, C., Rodríguez, I., Berdasquera, D., & Rivera-Tapia, J. (2007). PCR-múltiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma mahominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 24(2), 152-156.

Rubio, J. C. G., de Lena, G. G. G., & Ara, M. C. (2014). *El cultivo del frambueso*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). España.

Ruíz Anchondo, T., Adriano Martínez, J., Carrillo Castillo, T., Parra Quezada, R. Á., Barrios, O., Leopoldina, D., & Hernández Rodríguez, A. (2018). Establecimiento in vitro de dos cultivares liberados de frutillas: fresa y frambuesa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(4), 799-812.

Saba Alvitres, K. N. (2019). Costo de producción de la Fresa y su incidencia en la rentabilidad por hectárea de los Agricultores Individuales de Chepén-2018.

Saha, D., Purkayastha, G. D., Ghosh, A., Isha, M., & Saha, A. (2012). Isolation and characterization of two new *Bacillus subtilis* strains from the rhizosphere of eggplant as potential biocontrol agents. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 109-118.

Saleh, I., & Al-Thani, R. (2019). Fungal food spoilage of supermarkets' displayed fruits. *Veterinary World*, 12(11), 1877–1883. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1877-1883>

Salgado-Garciglia, R., Pérez-López, H., García-Munguía, A. M., & Loeza-Lara, P. D. Extractos vegetales: Una fuente importante de compuestos naturales bioplaguicidas *Alter*, *Enfoques* *Críticos*
<https://static1.squarespace.com/static/552c00efe4b0cdec4ea42d9f/t/5f04c31ac416270843470435/1594147611214/2-ALTER20-extractos.pdf>

Samaniego-Gámez BY, Reyes-Ramírez A, Moreno-Valenzuela O A, Tun-Suárez JM (2017) Resistencia sistémica inducida hacia virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal* 32: 10-22.

Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences* 6(4), 2133-2144.

Savluchinske FS, Barbosa A, Cabrita M, Nunes L, Esteves A, Roseiro JC and Curto MJ. 2004. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31:199-203. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0133-x>

Seidel, S.; Werisch, S.; Schütze, N.; Laber, H. 2017. Impact of irrigation on plant growth and development of White cabbage. *Agricultural water management*. 187:99 - 111. Doi: <http://doi.org/10.1016/j. Agwat.2017.03.011>.

SEMARNAT. (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Federación*.

Shen, Y., Li, J., Xiang, J., Wang, J., Yin, K., & Liu, Q. (2019). Isolation and identification of a novel protein elicitor from a *Bacillus subtilis* strain BU412. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0822-5>.

Siahmoshteh, F., Siciliano, I., Banani, H., Hamidi-Esfahani, Z., Razzaghi-Abyaneh, M., Gullino, M. L., & Spadaro, D. (2017). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. *International journal of food microbiology*, 254, 47-53.

SIAP. (2016). *Berries 2016 Panorama Agroalimentario* Ciudad de México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200633/Panorama_Agroalimentario_Berries_2016.pdf

SIAP. (2018). *Una mexicana que frutas vendía...* Ciudad de México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://www.gob.mx/siap/articulos/una-mexicana-que-frutas-vendia?idiom=es>

Silva J. A & Uchida, R. (2000). Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms. *Plant nutrient management in Hawaii's soils*, 31-55.

Sosa-Pech, M., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J. M., Pinzón-López, L. L., & Reyes-Ramírez, A. (2019). Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(16), 137-143.

Srivastava, D., Maurya, R., Khan, N., Nayyer, M., Mishra, A., Fatima, F., & Siddiqui, M. H. (2019). General Introduction of Bio-Inputs Versus Chemical Inputs in Agriculture and Ill Effects. *Biofertilizers and Biopesticides in Sustainable Agriculture*, Oakville, Canada. 1 1-23.

Sulthana, A., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2019). Genome Sequencing and Annotation of *Bacillus subtilis* UBBS-14 to Ensure Probiotic Safety. *Journal of Genomics*, 7, 14–17. <https://doi.org/10.7150/jgen.31170>

Sun, Z., Liu, K., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, K., Yu, D., ...& Li, C. (2017). IAA producing *Bacillus altitudinis* alleviates iron stress in *Triticum aestivum* L. seedling by both

bioleaching of iron and up-regulation of genes encoding ferritins. *Plant and soil*, 419(1-2), 1-11.

Takahashi A & Ohnishi T (2004) The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station. *Biol Sci Space* 18, 255–260

Toogood, A. (2000). *Enciclopedia de la propagación de plantas*. Royal Horticultural Society. Ed. Blume. Barcelona.

Trujano-Fragoso, D. E., Trinidad-Santos, A., López-Romero, R. Ma., Velasco-Cruz, C., Becerril-Román, A. E. & Cortés-Penados, C. de J. (2017). Pomological Characteristics, antioxidant capacity and ellagic acid in raspberry (*Rubus idaeus* L.) Postgrado en Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Michoacán. México.

Tunsagool, P., Leelasuphakul, W., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Roytrakul, S., & Jutidamrongphan, W. (2019). Targeted transcriptional and proteomic studies explicate specific roles of *Bacillus subtilis* iturin A, fengycin, and surfactin on elicitation of defensive systems in mandarin fruit during stress. *PLoS ONE*, 14(5), 1–21.

U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service USDA, (2018). Food data central. **Food Category:** Fruit & Vegetable Juice, Nectars & Fruit Drinks. Raspberry

Velásquez, M. A., & Sudsuki, F. (2017). Manual del cultivo de la frambuesa. (Pub. CIREN N° 71/1988).

Vessey, K. J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586

Veobides-Amador, H., Guridi-Izquierdo, F., & Vázquez-Padrón, V. (2018). Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos tropicales*, 39(4), 102-109.

Wainwright, M. (1992) *An introduction to fungal Biotechnology*. John Wiley & Sons. England

Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1), 29-38.

Wang, Z., Li, Y., Zhuang, L., Yu, Y., Liu, J., Zhang, L., ... Wang, Q. (2019). A Rhizosphere-Derived Consortium of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* Suppresses Common Scab of Potato and Increases Yield. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.003>

Wolf, B. (1974). Improvements in the azomethine-H method for the determination of boron. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 5(1), 39-44.

Wu, C., Ouyang, M., Guo, Q., Jia, J., Liu, R., Jiang, Y., ... Shen, S. (2019). Changes in the intestinal microecology induced by bacillus subtilis inhibit the occurrence of ulcerative colitis and associated cancers: a study on the mechanisms. *Am J Cancer Res*, 9(5), 872–886. Retrieved from www.ajcr.us/

Wu, Z., Huang, Y., Li, Y., Dong, J., Liu, X., & Li, C. (2019). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via Induction of the Defense Mechanism and Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Microbiology*, 10(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02676>

Wu, G., Drufva, E., & Wu, K. (2019). Fast genome editing in *Bacillus subtilis*. *Engineering in Life Sciences*, 19(6), 471–477. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800164>

Wu X., Xie, Y., Qiao, J., Chai, S., & Chen, L. (2019). Rhizobacteria Strain from a Hypersaline Environment Promotes Plant Growth of *Kengyilia thoroldiana*. *Microbiology (Russian Federation)*, 88(2), 220–231. <https://doi.org/10.1134/S0026261719020127>

Xu, W. fang, Ren, H. shuang, Ou, T., Lei, T., Wei, J. hong, Huang, C. shu, ... Xie, J. (2019). Genomic and Functional Characterization of the Endophytic *Bacillus subtilis* 7PJ-16 Strain, a Potential Biocontrol Agent of Mulberry Fruit Sclerotiniase. *Microbial Ecology*, 77(3), 651–663. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1247-4>

Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049.

Yu, T., Kong, J., Zhang, L., Gu, X., Wang, M., & Guo, T. (2019). New crosstalk between probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49688-8>

Zárate, N. B., Trejo, Y. D. V., & Gutiérrez, M. G. A. (2017). Densidades de plantación y manejo integral del cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) En los valles centrales de Oaxaca. *Universidad&Ciencia*, 6, 156-172.

Zermeño González, A., Marroquín Morales, J. Á., MelendresAlvarez, A. I., Ramírez Rodríguez, H., Cadena Zapata, M., & Campos Magaña, S. G. (2019). Propiedades espectrales de la cubierta de macro túneles y su relación con el crecimiento y rendimiento del chile poblano (*Capsicum annuum* L.). *Terra Latinoamericana*, 37(3), 253-260.

Zhang, M., Yao, Y., Tian, Y., Ceng, K., Zhao, M., Zhao, M., & Yin, B. (2018). Increasing yield and N use efficiency with organic fertilizer in Chinese intensive rice cropping systems. *Field Crops Research*, 227, 102-109.

Zhao, P., Li, P., Wu, S., Zhou, M., Zhi, R., & Gao, H. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0841-2>

Zhoinska, E., Lejczak, B., & Kafarsi, P. (1992). Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol*, 58, 2993-2999.

Zhou, K., Zou, R., Zhang, C., Stephanopoulos, G., & Too, H. P. (2013). Optimization of amorphaadiene synthesis in *Bacillus subtilis* via transcriptional, translational, and media modulation. *Biotechnology and bioengineering*, 110(9), 2556-2561.