



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL
REGIONAL

UNIDAD MICHOACÁN



Bacillus subtilis APLICADA EN CAMPO COMO CONTROLADORA DE
HONGOS PATÓGENOS DE FRESA POSCOSECHA

TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
SUSTENTABLE

IIA. ROCÍO PAOLA ZAMORA PADILLA

DIRECTORAS DE TESIS:

M. EN C. GUADALUPE OYOQUE SALCEDO
DRA. MARÍA VALENTINA ANGOA PÉREZ

JIQUILPAN, MICHOACÁN, 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:

Bacillus subtilis aplicada en campo como controladora de hongos patógenos de fresa poscosecha. del alumno:

Apellido Paterno:	Zamora	Apellido Materno:	Padilla	Nombre (s):	Rocío Paola
-------------------	--------	-------------------	---------	-------------	-------------

Número de registro: B 1 8 0 9 7 8

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 19 % 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 reportado por el programa es de 19% y corresponde a citas de material que aparecen en el marco teórico del documento y pero no en la discusión de la misma por lo que se considera que no hay 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:

Haber concluido de manera satisfactoria el trabajo y la exposición del mismo en el documento de tesis.

Dra. Mara Valentina Angoa Pérez
Director de Tesis
Nombre completo y firma

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

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

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

Dr. José Luis Hernández Mendoza
Nombre completo y firma

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante
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 09 del mes de diciembre del año 2020, el (la) que suscribe Rocío Paola Zamora Padilla, alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B180978, 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 la Dra. María Valentina Angoa Pérez, y cede los derechos del trabajo titulado “*Bacillus subtilis* aplicada en campo como controladora de hongos patógenos de fresa poscosecha”, 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: paolazp_10@hotmail.com; goyoque@hotmail.com y valeangoa@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Paola Zamora P.
Rocío Paola Zamora Padilla.
Nombre y firma del alumno(a)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado al proporcionarme la beca de estudio en estos dos años de maestría. Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo con la beca BEIFI y al CIIDIR Michoacán por proporcionarme las instalaciones para realizar mi experimentación.

Agradezco sinceramente a la M. C. Guadalupe Oyoque Salcedo por su confianza, su gran apoyo a lo largo del desarrollo del proyecto, por todo el aprendizaje, por su motivación y por sus consejos, y por enseñarme a poner empeño en todo lo que hago. Así mismo, agradezco a la Dra. Ma. Valentina Angoa Pérez por el apoyo brindado, por su confianza en mí y en este proyecto y su disponibilidad para resolver todo tipo de dudas. Agradezco a ambas por su amabilidad, su paciencia, su capacidad para guiarme en esto proyecto a lo largo de estos dos años, por inspirarme y ser un ejemplo para mí.

A los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante, al M. C. Ernesto Oregel Zamudio y al Dr. José Luis Hernández Mendoza les agradezco infinitamente sus contribuciones, las acertadas observaciones que me proporcionaron en las revisiones, la confianza y la disponibilidad que han tenido siempre para ayudarme a lograr mi objetivo de culminar la tesis con éxito.

A mis amigas y compañeras, Amairani y Soe por su enorme apoyo a lo largo de estos dos años y por convertirse en mi familia, por su motivación y compañía.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis principalmente a mis papás Rocío Padilla Reyes y José Guillermo Zamora De La Paz, por todo el amor y el apoyo incondicional que me han brindado, por acompañarme en esta etapa al igual que siempre y apoyarme en todas mis decisiones, por motivarme, por enseñarme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga y a nunca rendirme ni limitarme en ningún aspecto. Gracias por creer en mí, por inspirarme, por ser el mejor ejemplo que alguien podría tener y ayudarme a convertirme en quien soy hoy.

Dedico este trabajo también a mis hermanos César y Lili, por su apoyo, por sus palabras de aliento y por estar siempre conmigo, por su apoyo incondicional desde siempre.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Generalidades de la fresa	17
2.2 Planta de fresa.....	18
2.2.1 Fisiología de la planta de fresa.....	19
2.2.2 Etapas del desarrollo de fresa (vegetativa y productiva).....	19
2.3 Cosecha de fresa.....	20
2.4 Importancia del cultivo de fresa en el mundo	21
2.4.1 Importancia del cultivo de fresa en México.....	23
2.5 Enfermedades de la fresa en poscosecha.....	23
2.5.1 <i>Botrytis cinerea</i>	25
2.5.2 <i>Rhizopus stolonifer</i>	28
2.6 Alternativas de control de hongos patógenos en fresa en poscosecha	30
2.6.1 Control convencional de hongos en fresa en poscosecha	30
2.6.1.1 Almacenamiento de fresa en poscosecha	32
2.6.2 Control biológico.....	32
2.6.2.1 <i>Bacillus</i>	34
2.6.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	40
3. JUSTIFICACIÓN	43
4. OBJETIVO GENERAL	44
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6. METODOLOGÍA.....	45
6.1 Aplicación de <i>B. subtilis</i> GOS 01 B-67748 en fruto de fresa	45
6.2 Muestreo	45
6.3 Evaluación del índice de severidad e incidencia	46
6.4 Evaluación del índice de deterioro y decaimiento	47
6.5 Determinación de la densidad bacteriana y la presencia del género <i>Bacillus</i> y de hongos en la superficie de fresas provenientes de plantas tratadas con <i>B. subtilis</i> en campo	48
6.5.1 Análisis de bacterias del género <i>Bacillus</i> presentes en las fresas	48
6.5.2 Análisis e identificación de hongos presentes en las fresas	49
6.6 Análisis estadísticos	51
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52

7.1 Evaluación de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas en poscosecha previamente tratadas con <i>B. subtilis</i> en campo	52
7.1.1 Evaluación después una aplicación de <i>B. subtilis</i> en campo (octubre 2019)	52
7.1.2 Evaluación después de ocho aplicaciones de <i>B. subtilis</i> en campo (enero, 2020).....	54
7.2 Determinación de la presencia y densidad bacteriana del género <i>Bacillus</i> y hongos en la superficie de fresas provenientes de plantas tratadas con <i>B. subtilis</i> en campo	60
7.2.1 Presencia y densidad bacteriana del género <i>Bacillus</i> en la superficie de fresas de plantas tratadas con <i>B. subtilis</i> en campo.....	60
7.2.2 Presencia e identificación de hongos en la superficie de fresas de los tratamientos.....	70
8 CONCLUSIONES.....	81
9 REFERENCIAS.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conservación convencional de fresas en poscosecha (Alzamora <i>et al.</i> , 2004):	31
Tabla 2. Índice de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas producidas con <i>B. subtilis</i> como biocontrolador de hongos.	53
Tabla 3. Índice de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas producidas con <i>B. subtilis</i> como biocontrolador de hongos.	55
Tabla 4. Bacterias con características del género <i>Bacillus</i> aisladas de fresas de plantas tratadas en campo con <i>B. subtilis</i> GOS 01 B- 67748.	61
Tabla 5. Bacterias totales aisladas de fresas de plantas tratadas en campo con <i>B. subtilis</i> GOS 01 B- 67748.	61
Tabla 6. Porcentaje de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con <i>B. subtilis</i> GOS 01 B- 67748 con presencia de colonias típicas de <i>Bacillus</i>	68
Tabla 7. Porcentaje de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con <i>B. subtilis</i> GOS 01 B- 67748 con presencia de hongos.	70
Tabla 8. Porcentaje de frecuencia de los hongos identificados aislados de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con <i>B. subtilis</i> GOS 01 B- 67748, 20 días después de las cosechas posteriores a la octava aplicación (enero de 2020).	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la fresa (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018).	19
Figura 2. Imagen de los estadios de maduración de fresa de acuerdo con la NMX-FF-062-2002.....	21
Figura 3. Consumo internacional–Producción nacional (México) de fresa (SAGARPA, 2016).	22
Figura 4. Estructura de <i>Botrytis cinerea</i> . Recuperada de: https://laurabarabata.wordpress.com/morfologia/	26
Figura 5. Fresas con presencia de <i>Botrytis cinerea</i> sp. Elaboración propia.....	28
Figura 6. Estructura de <i>Rhizopus stolonifer</i> . Recuperada de: https://es.sawakinome.com/articulos/science/difference-between-mucor-and-rhizopus.html ...	30
Figura 7. Fresa con presencia de <i>Rhizopus stolonifer</i> sp. Elaboración propia.	30
Figura 8. Ciclo de vida de bacterias pertenecientes al género <i>Bacillus</i> (Villarreal et al., 2018).	36
Figura 9. Tinción de <i>Bacillus subtilis</i> . Recuperada de: https://cepariounicach.wordpress.com/2014/09/24/bacillus-subtilis/	41
Figura 10. Campo experimental en el que se realizó el muestreo de fresas, ubicado en El Llano Zamora, Michoacán.....	46
Figura 11. Montaje del experimento en laboratorio para evaluación de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento.	48
Figura 12. Fresas con los tratamientos a los 5 días de almacenamiento.	60
Figura 13. Bacterias y hongos de los tratamientos de fresas del muestreo de octubre 2019. En la parte superior, colonias típicas del género <i>Bacillus</i> extendidas en la placa de fresas tratadas con <i>B. subtilis</i> . En la parte inferior, presencia de hongos y bacterias (amarillas) nativas de fresas testigo.....	66
Figura 14. Bacterias y hongos de los tratamientos de fresas del muestreo de enero de 2020. Izquierda) Hongos y bacterias (amarillas) nativas de fresas testigo. Derecha) Colonias típicas del género <i>Bacillus</i> de fresas tratadas con <i>B. subtilis</i>	67
Figura 15. Trozos de fresas con colonias típicas de <i>Bacillus</i> . Izquierda) Presencia de <i>Bacillus</i> en trozos de fresas tratadas con <i>B. subtilis</i> muestreadas en octubre de 2019. Derecha) Presencia de <i>Bacillus</i> en trozos de fresas tratadas con la <i>B. subtilis</i> muestreadas en enero de 2020.....	69
Figura 16. Colonia típica de bacterias del género <i>Bacillus</i> en trozo de fresa tratada con <i>B. subtilis</i>	69
Figura 17. Trozos de fresas con hongos. Izquierda) Presencia de hongos en trozos de fresas testigo muestreadas en octubre 2019. Derecha) Presencia de hongos en trozos de fresas testigo muestreadas en enero 2020.	71
Figura 18. Hongos identificados morfológicamente, aislados de fresas evaluadas. A) <i>Rhizopus</i> sp. B) <i>Botrytis</i> sp. C) <i>Aspergillus</i> sp. D) <i>Cladosporium</i> sp. E) <i>Alternaria</i> sp. F) <i>Penicillium</i> sp. y G) <i>Fusarium</i> sp.	72

RESUMEN

La fresa es propensa a presentar daños en poscosecha principalmente por ataque de hongos que vienen desde el cultivo. Para su control comúnmente se aplican fungicidas químicos desde campo, o métodos de conservación que resultan poco efectivos si la carga microbiana es alta desde el desarrollo del cultivo. En la búsqueda de alternativas más sustentables para el control de hongos, se ha destacado la aplicación de bacterias antagonistas como *B. subtilis*, que ha demostrado ser efectiva *in vitro* e *in vivo* para el control de varios hongos. Sin embargo, el desafío para su efectividad es mayor cuando se enfrenta con biota microbiana y condiciones de campo. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó una cepa de *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) aplicada desde campo como controladora de hongos patógenos en fresa en poscosecha. La bacteria se aplicó cada 15 días a 1×10^{12} UFC/ml en hojas y frutos. Se recolectaron frutos al azar 1, 5 y 15 días después de la 1ª aplicación de bacterias a las plantas y este mismo procedimiento se hizo después de la 8ª aplicación. Se evaluó incidencia, índice de severidad de daño por hongos, así como deterioro y decaimiento en los frutos colectados y almacenados durante 6 días; también se determinó la densidad bacteriana presente en su superficie y en particular la presencia del género *Bacillus*. Además, se determinaron los hongos presentes y su frecuencia. Los tratamientos fueron frutos provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* y frutos de plantas sin bacteria (testigo). Como resultado se obtuvo que los frutos tratados con *B. subtilis* desde campo presentaron significativamente menor incidencia, severidad de daños por hongos, deterioro y decaimiento con respecto a los frutos testigo. Con el tratamiento de *B. subtilis*, la severidad, incidencia, deterioro y decaimiento se redujeron hasta un 31.5 %, 73.3 %, 19.8 % y 25.7 % respectivamente después de una aplicación de la bacteria. Después de ocho aplicaciones de la bacteria, la severidad, incidencia, deterioro y decaimiento se redujeron un 58.7 %, 61.5 %, 40.5 % y 43 % respectivamente. El tratamiento influyó significativamente en la reducción de estas

variables. Se encontró presencia de colonias del género *Bacillus* en fresas tratadas con *B. subtilis*, después de una y ocho aplicaciones en los factores de dilución de 10^3 y 10^2 UFC/ml respectivamente. Con una u ocho aplicaciones de *B. subtilis* en las fresas, se redujo significativamente la presencia de hongos como: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* en las fresas en poscosecha en porcentajes que oscilaron del 40.3 % a 100 %. Aplicar *B. subtilis* desde campo influyó significativamente en la reducción de estos hongos en poscosecha incluso 15 días después de la aplicación. Se obtuvieron once cepas en los frutos testigo, los cuales se identificaron como: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium pinophilum*, *Colletotrichum* sp., *Macrophomina* sp., *Neopestalotiopsis* sp., y *Lasiodiplodia* sp. En frutos tratados con *B. subtilis* también se presentó *Penicillium pinophilum* sin diferencias significativas con respecto a los frutos testigo. Por lo anterior se considera que *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) aplicada desde campo, tiene el potencial de controlar hongos patógenos en fresa en poscosecha.

Palabras clave: *Fragaria ananassa*, cultivo, control, antagonistas, fitopatógenos.

ABSTRACT

Strawberry is susceptible to post-harvest damage, mainly due to fungal attacks that come from the crop. To control them, chemical fungicides are commonly applied from the field, or conservation methods that are not very effective if the microbial load is high since the development of the crop. In the search for more sustainable alternatives for the control of fungi, the application of antagonistic bacteria such as *B. subtilis* has been highlighted, which has proven to be effective *in vitro* and *in vivo* for the control of various fungi. However, the challenge to its effectiveness is high when faced with microbial biota and field conditions. Therefore, in this work a strain of *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) applied from the field as a controller of postharvest strawberry pathogenic fungi was evaluated. The bacterium was applied every 15 days at 1×10^{12} CFU / ml on leaves and fruits. Fruits were randomly collected 1, 5 and 15 days after the 1st application of bacteria to the plants and this same procedure was carried out at the 8th application. Incidence, severity index of fungal damage, as well as deterioration and decay of the fruits collected and stored for 5 days were evaluated; the bacterial density present on their surface and in particular the presence of the *Bacillus* genus was also determined. In addition, the fungi present and their frequency were determined. The treatments were fruits from plants treated with *B. subtilis* and fruits from plants without bacteria (control). As a result, it was obtained that the fruits treated with *B. subtilis* from the field presented significantly lower incidence, severity of damage by fungi, deterioration and decay compared with the control fruits. With the *B. subtilis* treatment, the severity, incidence, deterioration and decay were reduced by 31.5 %, 73.3 %, 19.8 % and 25.7 % respectively after one application of the bacteria. After eight applications of the bacteria, the severity, incidence, deterioration and decay were reduced by 58.7 %, 61.5 %, 40.5 % and 43 % respectively. Treatment significantly influenced the reduction of these variables. *Bacillus* colonies were found in strawberries treated with *B. subtilis*, after one and eight applications at dilution factors of 10^3 and 10^2 CFU / ml respectively.

With one or eight applications of *B. subtilis* in strawberries, the presence of fungi such as: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* in postharvest strawberries was significantly reduced in percentages that ranged from 40.31 % to 100 %. Applying *B. subtilis* from the field significantly influenced the reduction of these fungi in postharvest even 15 days after application. Eleven strains were obtained in the control fruits, which were identified as: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium pinophilum*, *Colletotrichum* sp., *Macrophomina* sp., *Neopestalotiopsis* sp., and *Lasiodiplodia* sp. In fruits treated with *B. subtilis*, *Penicillium pinophilum* also appeared without significant differences with respect to the control fruits. Therefore, it is considered that *B. subtilis* (GOS 01 B-67748) applied from the field, has the potential to control pathogenic fungi in postharvest strawberry.

Keywords: *Fragaria ananassa*, field, control, antagonists, phytopathogens.

1. INTRODUCCIÓN

La fresa representa un cultivo de alta importancia en México, que ocupa el segundo lugar como exportador mundial, siendo Michoacán el principal estado productor. Se espera que la demanda de fresa a nivel mundial aumente en un 34.4 % para el año 2030 (SAGARPA, 2016). Importantes pérdidas hasta del 50 % de fresa poscosecha son causadas por hongos fitopatógenos que aceleran su degradación y acortan su vida útil, estas pérdidas son mayores en poscosecha que en precosecha, ya que las infecciones normalmente se desarrollan en el transporte o almacenamiento (Gaitán *et al.*, 2014; De Cal *et al.*, 2012). Para enfrentar esta problemática se ha implementado el uso excesivo e intensivo de fungicidas químicos en campo, lo cual ha ocasionado daños tanto al medio ambiente como al ser humano, residualidad en alimentos de consumo humano con efectos sobre las generaciones futuras, dependencia de los agroquímicos, contaminación de aguas, daños a la fauna y a los suelos (Villa *et al.*, 2007). Además, debido a la resistencia de los hongos patógenos a los fungicidas químicos y al daño que estos provocan, las leyes europeas los restringen cada vez más y se enfocan hacia el desarrollo de productos de biocontrol que puedan ser incorporados en el manejo integrado de plagas (Calvo *et al.*, 2019).

Dos de los principales hongos reportados por daños a fresa en poscosecha son *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *B. cinerea* puede soportar temperaturas muy bajas de refrigeración de 0 a 4°C (Valencia *et al.*, 2016) y *R. stolonifer*, a pesar de que no es capaz de reproducirse a menos de 5°C, es agresivo y de rápida propagación (Velázquez *et al.*, 2008). Para reducir los ataques de hongos a la fresa se han implementado medidas en poscosecha como la refrigeración y la aplicación de atmósferas controladas (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015; Feliziani *et al.*, 2015). Sin embargo, aún con la aplicación de métodos de control de hongos en poscosecha, las pérdidas siguen representando un problema, por lo que se requiere la búsqueda de alternativas que reduzcan o retrasen la aparición de hongos patógenos en la fresa

en poscosecha, y a la vez sean más amigables con el medio ambiente y no tóxicas para el consumidor (Velázquez *et al.*, 2008).

Entre una de estas alternativas se encuentra la aplicación de microorganismos antagonistas (Plascencia *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2015). Algunas especies del género *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas y presentan capacidades antifúngicas (Yáñez *et al.*, 2012). Entre las bacterias antagonistas más utilizadas se encuentra *Bacillus subtilis*, que puede ser promotora del crecimiento vegetal, antifúngica, entre otras cualidades (Adesemoye *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2016). Algunos de los mecanismos de *B. subtilis* relacionados con el control de hongos patógenos son: la producción de antibióticos extracelulares (fengicina, bacilimicina, iturina), producción de enzimas líticas (proteasa, quitinasa), estimulación de la resistencia sistémica inducida y competencia con el patógeno por nutrientes y espacio (Ramírez *et al.*, 2011). Además, es una bacteria considerada no tóxica, no causa daños al medio ambiente y resiste condiciones adversas por la producción de enzimas termorresistentes (Yáñez *et al.*, 2012).

Existen una gran cantidad de trabajos en los que se ha evaluado el efecto biocontrolador de *B. subtilis* sobre hongos patógenos a nivel *in vitro*. Por ejemplo, el realizado por Kumar *et al.* (2012), donde una cepa identificada como *B. subtilis* inhibió el crecimiento de varios hongos, como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Colletotrichum* sp. Otro estudio realizado por Kurniawan *et al.* (2018), demostró que al confrontar *B. subtilis* contra *Alternaria alternata* y *B. cinerea*, la bacteria inhibió el crecimiento de micelio *in vitro*. También se ha confirmado el control de hongos como *Helminthosporium rostratum* y *Curvularia lunata* por parte de *B. subtilis* *in vitro* (Ruiz *et al.*, 2016). Existen menos reportes de este efecto a nivel invernadero, uno de ellos es el realizado por Ramírez *et al.* (2020), en el que se aplicó *B. subtilis* en plantas de tomate de invernadero y se logró disminuir la incidencia de enfermedades como fusariosis, causada por *Fusarium oxysporum* y el tizón temprano, causado por *Alternaria alternata*. En otra investigación realizada por Wang *et al.* (2018), en la que se aplicó *B. subtilis* en plantas de tomate de invernadero se lograron reducir otras enfermedades, como el moho gris, causado

por *Botrytis cinerea*, y el moho de la hoja, causado por *Cladosporium fulvum*. Esta bacteria también se ha aplicado para el control de la antracnosis en álamo de invernadero, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, y logró reducir la enfermedad de manera significativa. Pese a esto, existen aún menos estudios en campo, por lo que la realización de trabajos como el presente, en el que se evalúe el efecto de la aplicación de *B. subtilis* en plantas de fresa en campo y se determine su efecto en el control de hongos en frutos a nivel poscosecha son pertinentes y resultan de gran interés.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne), es del orden de los rosales, pertenece a la familia Rosaceae y al género *Fragaria*. Es un fruto no climatérico, es decir, su proceso de maduración solo continúa cuando aún se encuentran unidos a la planta, pues no incrementa su respiración ni la producción de etileno en poscosecha (Martínez *et al.*, 2017).

Su sabor es dulce y ácido a la vez, depende de su variedad. Su forma también depende de la variedad y su olor es dulce y característico. Su color debe ser rojizo y uniforme con brillo, aunque también puede ser diferente de acuerdo a la variedad. Su pulpa puede ser blanca o rojiza y la textura debe ser moderadamente o altamente firme (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015).

De acuerdo a las especificaciones de la norma mexicana (NMX-FF-062-2002) las fresas frescas deben:

- A) Ser limpias, sanas, enteras, y bien desarrolladas.
- B) Tener forma, sabor y olor característicos de la variedad.
- C) Tener consistencia firme.
- D) Tener pedúnculo con una longitud máxima de 1.5 cm.
- E) Estar exentas de humedad exterior anormal.
- F) Estar libres de descomposición o pudrición.
- G) Estar libres de defectos de origen mecánico, microbiológico, genético fisiológico u otros.
- H) Presentar en su superficie una coloración roja, que se extiende del ápice hacia la base del pedúnculo, y que el color cubra del 50 % hasta 100 %.

Algunos de los subproductos de la fresa son: fresa congelada, pulpa de fresa, fresa deshidratada, fresa liofilizada, mermeladas, licores, zumos, néctares, conservas,

fresa fresca, de ahí su importancia y alta demanda en todo el mundo (Ortega, 2015).

2.2 Planta de fresa

La planta de la fresa es de tipo herbáceo y perenne, con un tallo en forma de “corona” o forma cónica con escamas foliares, su sistema radicular se compone de raíces y raicillas. Las hojas se insertan en la corona y son pecioladas. Las flores pueden nacer de la yema terminal de la corona o de yemas axilares de las hojas. Las flores de la planta tienen 5 a 6 pétalos, de 20 a 35 estambres aproximadamente y cientos de pistilos, el fruto de tipo aquenio nace de cada óvulo que es fecundado. Los aquenios se desarrollan alrededor de un receptáculo carnoso, y este desarrollo promueve su crecimiento y coloración, creando así el fruto de la fresa como lo conocemos (INFOAGRO, 2007). En general este cultivo tiene un tiempo de producción, comercialmente viable, de dos años (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018).

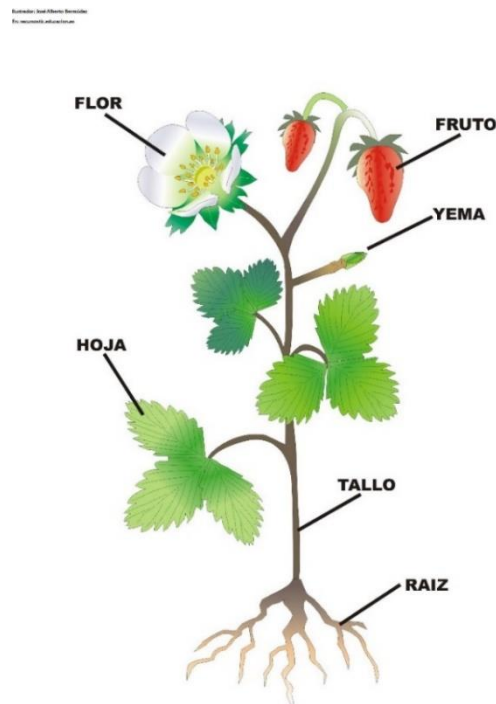


Figura 1. Estructura de la fresa (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018).

2.2.1 Fisiología de la planta de fresa

Su fisiología depende de la estación del año:

- A) Verano: días largos y altas temperaturas, la planta crece y se multiplica por emisión de estolones.
- B) Otoño: días cortos y temperaturas más bajas, se va paralizando el crecimiento y se acumulan reservas en las raíces. Comienza la iniciación floral.
- C) Invierno: días cortos y temperaturas bajas. Se paraliza el crecimiento, hasta que la planta acumula suficiente frío.
- D) Primavera: Días largos y suben las temperaturas, se reanuda la floración y fructificación.

Es importante que la fresa acumule horas frío inferiores a 7 °C para una mayor fructificación. Estas horas frío dependen de dónde se encuentre el cultivo y condiciones de desarrollo (INFOAGRO, 2007).

2.2.2 Etapas del desarrollo de fresa (vegetativa y productiva)

Etapa vegetativa:

- A) Brotes, las yemas principales comienzan a crecer.
- B) Desarrollo de las hojas: de las primeras hojas emergentes.
- C) Desarrollo de las partes vegetativas cosechables: comienzo de la formación de estolón (de 2 cm de longitud), brotes de hijos de la planta para ser trasplantados.
- D) Etapa reproductiva.
- E) Aparición de órgano floral: primeras yemas florales.
- F) Floración: primeras flores abiertas, plena floración y caída de pétalos.

Etapa productiva:

- A) Formación del fruto.

B) Maduración del fruto.

C) Senescencia y comienzo del reposo vegetativo.

El desarrollo vegetativo se puede observar después de 45 días de la resiembra de las plántulas de fresa, y la aparición de flores se observa a los 60 días aproximadamente, para posteriormente dar cosechas después de un mes (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018).

La temperatura óptima del cultivo oscila entre 18 y 25 °C durante el día, y entre 8 y 13 °C en la noche, y la humedad relativa está entre los 60 y 75 %. Requiere un suelo arenoso y franco arenoso y un pH entre 5.7 y 6.5 (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015). Los riegos deben ser ligeros y frecuentes, evitando el exceso de humedad debido a que este conlleva a un ambiente propicio para el desarrollo de hongos como *Botrytis* sp. (INFOAGRO, 2007).

2.3 Cosecha de fresa

La cosecha se realiza cada dos días o diariamente, depende de la productividad del cultivo durante la etapa de producción máxima, no se deben dejar frutos con la suficiente madurez sin cosechar, ya que estos podrían ser infectados por patógenos más fácilmente, y en la próxima colecta podrían contaminar a los demás por su exceso de madurez. Al realizar la cosecha no se debe quitar el pedúnculo ya que esto aceleraría su descomposición, se deben colocar en un recipiente con cuidado sin incluir frutos con daño aparente (INFOAGRO, 2007).

Algunas de las consideraciones a tomar en cuenta al momento de la cosecha de fresa fueron explicadas en el Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán (2018), y se destaca el muestreo únicamente de frutos con la maduración adecuada y en el mismo grado de maduración, sin daño aparente por hongos, golpes o frío, con color rojo en el 70 % de su superficie, y la separación de los frutos con daños por insectos o enfermedades.

En la etapa de poscosecha se deben implementar una serie de actividades adecuadas para la selección, clasificación, empaque, almacenamiento y transporte, este proceso comienza en el momento de la cosecha del fruto hasta que llega al comercializador o consumidor final. Esta etapa puede comprender de 10 a 15 días (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018).

Con base en el color de la fresa se puede determinar su estadio de maduración:

- A) Color rosado en $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del fruto sobre fondo blanquecino: destino a consumo fresco de mercados distantes.
- B) Color rosado cubriendo un total de la superficie del fruto: Para consumo fresco en mercados relativamente cercanos.
- C) Rojo-rojo oscuro: Consumo fresco inmediato o procesamiento industrial (Delgado *et al.*, 2017).

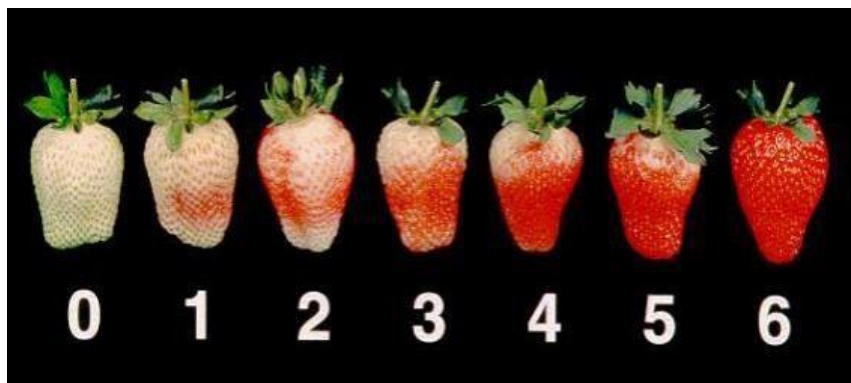


Figura 2. Imagen de los estadios de maduración de fresa de acuerdo con la NMX-FF-062-2002.

2.4 Importancia del cultivo de fresa en el mundo

La producción mundial de fresa incrementó a partir de 2017. En 2015 hubo una producción total de 8,086,324 ton; en 2016, 7,901,882 ton; en 2017, 8,069,134 ton; y en 2018, 8,337,099 ton.

Los países que lideran la producción de esta frutilla son China con 2,955,453 ton en 2018, Estados Unidos de América con 1,296,272 ton y México con 653,639 ton. En cuanto al rendimiento anual, México ocupa el tercer lugar con 47.9 ton/ha, el segundo España con 49 ton/ha y el primer lugar lo ocupa EUA con 65.1 ton/ha (FAOSTAT, 2018).

El principal exportador de fresa es España, seguido por México en segundo lugar y Estados Unidos en tercer lugar y se estima un aumento de la demanda mundial de fresa del 34.44 % para el 2030 (SAGARPA, 2016).

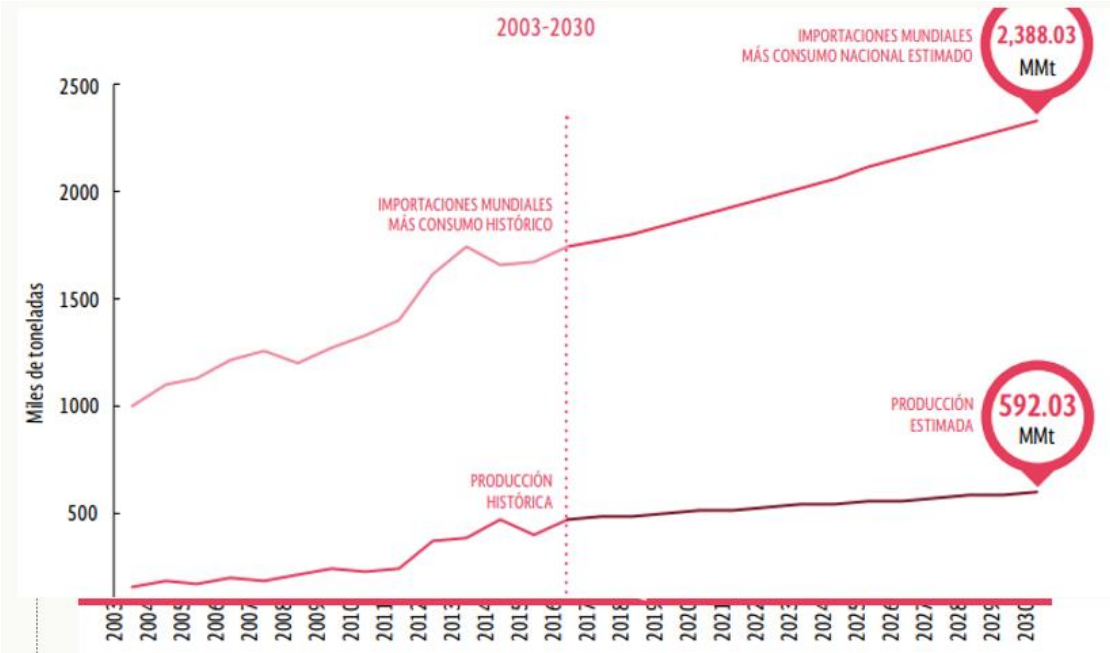


Figura 3. Consumo internacional–Producción nacional (México) de fresa (SAGARPA, 2016).

2.4.1 Importancia del cultivo de fresa en México

La producción de fresa ha ido en crecimiento a través de los años en México, con una producción de 392,625 ton en 2015, 468,248 ton en 2016, 658,436 ton en 2017 y 653,639 ton en 2018 (FAOSTAT, 2018).

El estado de la república que lidera la producción de fresa es Michoacán, que presentó una producción total de 454,958 ton en el año 2018, seguido por Baja California con 116,451 ton, y Guanajuato con 67,179 ton. Michoacán también cuenta con la mayor superficie cultivada de este producto (9,933 ha), seguido por Baja California (1,920 ha) y Guanajuato (1,197 ha) (FAOSTAT, 2018).

El valor de producción de fresa (millones de pesos mdp) en Michoacán fue de \$ 9,292 mdp, en Baja California de \$3,172 mdp y en Guanajuato \$681 mdp. En México los municipios que se mantienen en primer lugar son Zamora (147,348 ton), Ensenada (116,451 ton), Tangancícuaro (78,208 ton) y Jacona (53,637 ton). Zamora también ocupa el primer lugar en cuanto al valor monetario de la producción (\$ 3,318 mdp) (FAOSTAT, 2018). De acuerdo con estos datos el cultivo de fresa es de gran importancia en Michoacán, además, es el segundo lugar en actividades económicas en el estado. Este producto se cultiva en 32 municipios, y ha aumentado un 35.5 % en las exportaciones en la última década, principalmente hacia Canadá, EUA, Holanda, Chile, Japón, Italia, entre otros (SADER, 2018).

2.5 Enfermedades de la fresa en poscosecha

La fresa es una especie altamente susceptible a patógenos, algunos edáficos como: los oomicetes *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora fragariae*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Verticillium* sp. También es atacada por patógenos aéreos causantes de enfermedades, como la antracnosis, causada por varias especies del género *Colletotrichum* (Vestberg et al., 2004; Cano, 2013). Otros de los patógenos

presentes en fresa son: *Botrytis cinerea*, causante del moho gris (Chaves *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007), *Mycosphaerella fragariae*, causante de la viruela, *Sphaeroteca macularis* sp. causante del oídio y *Alternaria* spp causante de alternariosis o mancha marrón. Algunos de los principales hongos fitopatógenos son *Rhizopus stolonifer* y varios hongos que ocasionan la podredumbre negra (*Mucor* spp., *Aspergillus* spp. y *Pythium* spp.); también es atacada por *Penicillium digitatum* y *Rhizoctonia solani*, todos comunes en la etapa poscosecha (Cano, 2013).

B. cinerea es otro hongo de los principales causantes de daños, durante el cultivo y en poscosecha, las pérdidas llegan a ser de 30 a 50 %. El hongo incluso puede llegar a ser mucho más agresivo en poscosecha afectando hasta al 95 % de frutos a los dos días de la cosecha (Cano, 2013).

Algunas enfermedades del cultivo fueron reportadas por INFOAGRO (2007) acompañadas de formas de control químico:

- Mancha de la hoja (*Mycosphaerella fragariae*): Presencia de manchas pequeñas redondas de color rojizo o púrpura, causa destrucción de la hoja. Se controla eliminando las hojas dañadas y aplicando Mancozeb o Agrilife de manera preventiva.
- Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*): Muchas veces los frutos se infectan por contacto con el suelo o exceso de humedad, los frutos maduros con la enfermedad se secan y momifican. Se controla aplicando fungicidas a base de Zineb o Benomil en cuanto se observen botones florales.
- Oídio (*Sphaeroteca macularis*): El borde de las hojas se enrolla hacia arriba y se deforman los frutos. Se controla con Azufre micronizado.
- Podredumbre negra de la raíz (*Phytophthora* sp, *Rizoctonia* sp): Manchas o lesiones ovaladas de color marrón en la raíz. Se controla aplicando Thiran y/o Agrilife.

En este sentido, se han realizado estudios dedicados a la identificación de hongos patógenos encontrados más frecuentemente en frutos de fresa aparentemente sanos; en uno de ellos se reportaron nueve hongos patógenos aislados de fruta procedentes

de la región de Zamora, Michoacán y dos en fruta importada de California, EUA, los cuales pertenecen a los géneros: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phytophthora*, y *Rhizopus*; adicionalmente, se encontraron más de ocho hongos saprofiticos. Las especies de hongos que se encontraron con mayor frecuencia fueron *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* (Cordero *et al.*, 2003).

B. cinerea y *R. stolonifer* ocasionan daños graves y altas pérdidas económicas debido a la facilidad y velocidad con que colonizan la superficie del fruto. La presencia de *R. stolonifer* se puede determinar por ablandamiento y la aparición de micelio aéreo blanco y gris, este hongo tiene la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de humedades relativas y no crece a menos de 5 °C. Algunas de las características típicas que indican la presencia de *B. cinerea* en fruto es el micelio gris y polvoso, puede ser compacto y de color negro. Este patógeno es capaz de crecer a bajas temperaturas, es decir, la refrigeración no será suficiente para controlarlo de manera eficiente (Plascencia *et al.*, 2012; Valencia *et al.*, 2016).

2.5.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea produce conidias levemente coloreadas, unicelulares, de forma ovoide o esférica sobre pequeños esterigmas en el extremo de los conidióforos, los cuales son ramificados y se desarrollan libremente. La enfermedad es conocida como la pudrición gris en diversos cultivos, y la infección inicia por la germinación de conidias, de la formación del tubo germinativo y un apresorio a partir del cual se producen las hifas. Las hifas pueden atacar tejidos sanos por penetración. Se ha reportado que, en agar dextrosa, las conidias pudieron germinar entre 5 y 30 °C, y la germinación óptima es a 20 °C. El desarrollo de *B. cinerea* es independiente de la humedad relativa (HR), con la sola presencia de agua libre se favorece el crecimiento de este microorganismo. Sin embargo, en cultivos se ha reportado infección en humedades relativas mayores a 90 %, probablemente por la condensación que puede ocurrir sobre la planta dando lugar a un ambiente propicio para el crecimiento del hongo (Latorre, 2002a).

Las infecciones por *B. cinerea* pueden estar de manera latente en frutos o plantas, y cuando las condiciones son óptimas se manifiesta la infección de forma más agresiva, es entonces que pueden presentarse en poscosecha (Latorre, 2002b). Latorre (2002b), evaluó la infección de *B. cinerea* en flores y bayas de uva a diferentes temperaturas. La temperatura óptima de *B. cinerea* para provocar infección fue de 20 °C, pero se observó infección desde los 0 °C hasta los 30 °C tanto en flor como en baya. A temperaturas superiores a 30 °C, se podría detener o disminuir la velocidad del desarrollo de *Botrytis cinerea*. A bajas temperaturas, se ha demostrado la capacidad de desarrollo de este hongo en mora de Castilla en poscosecha. Para esto, se aislaron distintos hongos y se reinocularon en moras, *B. cinerea* fue el más agresivo en frutos almacenados durante 14 días en temperaturas de refrigeración (4 °C) y en condiciones de humedad relativa (HR) del 90 %. La temperatura óptima osciló entre 17 y 21 °C para el desarrollo de *B. cinerea*, pero pudo desarrollarse a temperaturas de refrigeración (Valencia *et al.*, 2016).

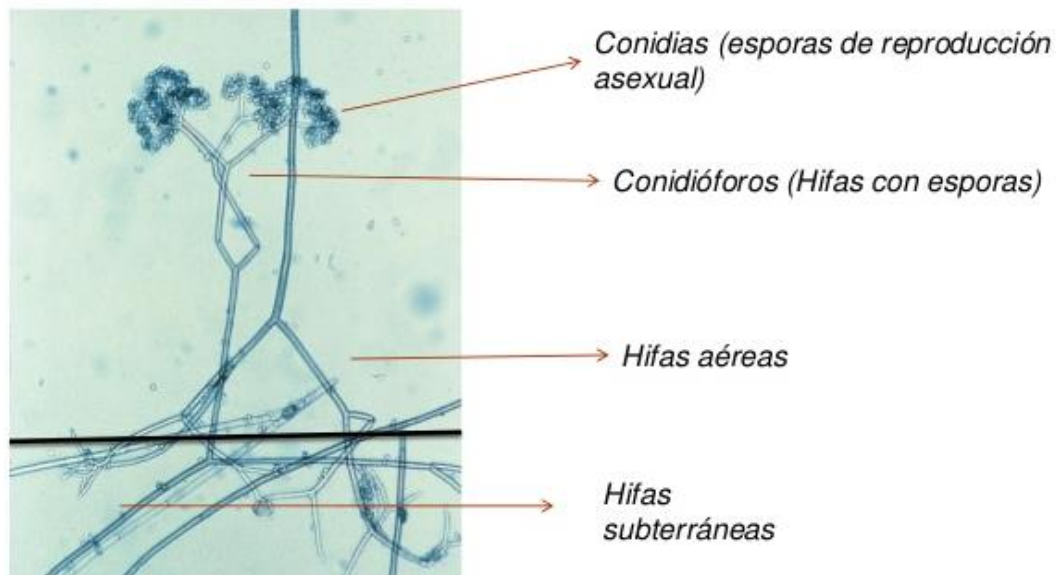


Figura 4. Estructura de *Botrytis cinerea*. Recuperada de: <https://laurabarabata.wordpress.com/morfologia/>

B. cinerea se considera un hongo necrótrofo ya que infecta tejidos senescentes, y entra a la fruta mediante las heridas. Este hongo despliega proteínas efectoras que suprimen la respuesta inmunológica de la planta además de secretar ácido oxálico, lo cual le favorece para la producción de enzimas fúngicas, a su vez, este ácido produce la quelación del calcio provocando un debilitamiento de la pared celular del tejido afectado, por la modificación en la estructura de la pectina que la conforma. Las enzimas degradadoras de la pared celular también pueden propiciar que *B. cinerea* rompa los tejidos externos e infecte el interior de la planta o la fruta, estas son capaces de degradar polisacáridos como la pectina. El hongo puede infectar desde la flor o directamente a tejidos en el fruto, ya que éste puede permanecer en la planta sin provocar síntomas de infección, la mayoría de las veces presenta infección cuando el fruto en poscosecha comienza a deteriorarse o presenta alguna herida o daño llevando a la muerte del tejido. Se ha reportado que el 64 % de las infecciones en frutas se dan por el contacto con tejido orgánico infectado como las hojas o la flor, que es donde generalmente inicia la infección (Valencia *et al.*, 2016; Petrasch *et al.*, 2019).

Se ha reportado que la rapidez y severidad, así como la incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea* en fresas en poscosecha puede variar entre distintas parcelas, pero en ningún caso se ha demostrado que la fresa sea 100 % resistentes a este hongo a pesar de distintas modificaciones realizadas en este fruto y combinaciones de métodos de control; además, la resistencia de *B. cinerea* es un problema al cual se enfrenta la agricultura actualmente. La mayoría de productos comerciales para el control biológico de *B. cinerea* son formulados a base de *B. subtilis* ya que ha demostrado ser eficiente en el control de este hongo, sin embargo, su aplicación en campo es limitada debido a la falta de información en cuanto al comportamiento de la bacteria en campo y su persistencia en frutos en poscosecha. Microorganismos de los géneros *Gliocladium roseum*, *Trichoderma* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, también se han investigado en el control de la incidencia de *B. cinerea*, con una reducción de alrededor de un 48 % en fruta. Otros tratamientos utilizados para inhibir el crecimiento del hongo, son los térmicos como la refrigeración, las atmósferas controladas (bajas en oxígenos y altas en dióxido de carbono), y humedades relativas

entre 85 y 90 % para evitar pérdida de humedad en la fruta. Adicionalmente, se han realizado experimentos de películas elaboradas con quitosano y otros compuestos para mantener las características organolépticas de la fruta y evitar ataque de hongos como *Botrytis* sp. Sin embargo, estos procedimientos aún se encuentran en experimentación y no se han aplicado de manera comercial (Petrasch *et al.*, 2019).

La resistencia de las fresas a *B. cinerea* depende de varios factores, como la variedad del fruto, su firmeza, características del patógeno, la amplitud del rango de hospedantes a los que puede infectar y sus diversos mecanismos de infección. La firmeza de la fruta está directamente relacionada con su susceptibilidad al ataque de *B. cinerea*, es por esto que es importante evaluar su deterioro y decaimiento, y si el antagonista es capaz de retrasarlos. Por lo tanto, microorganismos como *B. subtilis*, productores de enzimas como la quitinasas y de proteínas inhibidoras de la poligalacturonasa pueden inhibir la infección y la severidad de hongos como *B. cinerea*, ya que permiten que la firmeza de las frutas se mantenga por mayor tiempo (Petrasch *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).



Figura 5. Fresas con presencia de *Botrytis cinerea* sp. Elaboración propia.

2.5.2 *Rhizopus stolonifer*

Rhizopus stolonifer es un hongo filamentoso con esporangióforos de hasta 2 mm. Presenta esporangios negros y de forma esférica de aproximadamente 275 µm de diámetro, además de abundantes zigosporas de pared gruesa. Es un hongo de crecimiento rápido, capaz de cubrir superficies de placas Petri hasta en tres días en las condiciones adecuadas, su temperatura óptima es de 25 °C, aunque puede crecer de 10 a 33 °C. Presenta micelio denso aéreo, algodonoso, blanco al inicio y después gris oscuro, además de esporangios negros y brillantes de forma globosa, elipsoidales y angulares con superficies lisas o estrías. Es uno de los hongos más frecuentemente encontrados en una gran variedad de ambientes, se puede encontrar en suelos, polvo, estiércol, nidos, plumas de aves, frutos, semillas, entre muchos otros (Pontón *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*, 2008).

Es uno de los principales hongos fitopatógenos, y puede desarrollarse en un amplio rango de temperaturas y humedades relativas, al ser de rápido crecimiento puede infectar gran cantidad de productos alimenticios, ocasionando la enfermedad conocida como pudrición blanda causante de grandes pérdidas de productos agrícolas. La colonización se da por la excreción de enzimas por parte del hongo, las cuales degradan la pectina de la lámina media de la célula vegetal del hospedante. Este hongo provoca enfermedades en muchas frutas y hortalizas, vive en la naturaleza y es saprófito en suelos y residuos orgánicos, capaz de colonizar tejidos vegetales. Se han aplicado fungicidas químicos para controlar a *Rhizopus* sp., pero este ha desarrollado resistencia ante ellos, además, como sabemos estos productos químicos contaminan el medio ambiente y dañan la salud. Sus esporas se pueden diseminar en el aire, por lo tanto, es más fácil su esparcimiento e infección al encontrar condiciones que le favorezcan como nutrientes, temperatura y humedad óptima. Los más susceptibles a daños por *R. stolonifer* son frutos maduros o dañados ya que facilitan la infección y desarrollo de la enfermedad. En tan solo cuatro días este patógeno es capaz de colonizar un fruto y dañarlo completamente, y debido a su rápido crecimiento, esparcimiento y rango amplio de temperaturas y humedades puede infectar frutos que se encuentren cerca (Velázquez *et al.*, 2008).

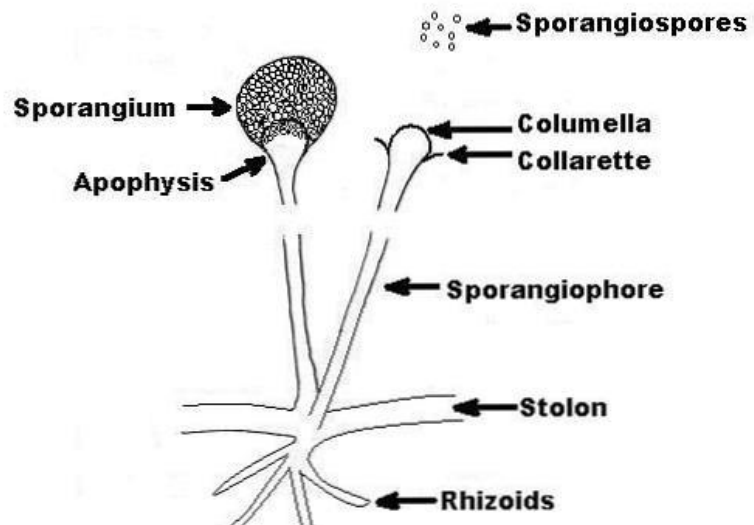


Figura 6. Estructura de *Rhizopus stolonifer*. Recuperada de: <https://es.sawakinome.com/articles/science/difference-between-mucor-and-rhizopus.html>



Figura 7. Fresa con presencia de *Rhizopus stolonifer* sp. Elaboración propia.

2.6 Alternativas de control de hongos patógenos en fresa en poscosecha

2.6.1 Control convencional de hongos en fresa en poscosecha

La fresa es un alimento altamente perecedero, por lo tanto, si se expone a temperaturas altas puede acortarse su vida útil. La fresa expuesta a 30 °C durante una

hora se deteriora al mismo nivel que una semana a 0 °C, es por eso que se recomienda mantener la cadena de frío desde la cosecha hasta la llegada al consumidor. Se puede realizar un enfriamiento por inmersión en agua a 10 °C aproximadamente por 2 min, y una desinfección con productos como tiabendazol a 1500 ppm en agua. Para eliminar la humedad se puede realizar un secado con corriente de aire a temperatura moderada y humedad relativa de 65-70 %, para posteriormente mantener la fruta en almacenamiento en cámaras frías. También se sugiere pre enfriar por horas justo después de cosechar, con aire forzado de 4-6 °C y HR de 90 % (INFOAGRO, 2007; Cámara de Comercio de Bogotá, 2015).

Tabla 1. Conservación convencional de fresas en poscosecha (Alzamora *et al.*, 2004):

OBJETIVO	FACTOR	MECANISMO
Inactivación de microorganismos	-Calor -Presión -Radiación ionizante -Shock eléctrico -Compuestos químicos -Enzimas	-Pasteurización -Presión ultra elevada -Rayos gama -Pulsos de alto voltaje -Tratamientos con óxido de etileno -Tratamiento con H ₂ O ₂ -Adición de lisozima
Restricción del acceso de microorganismos al alimento	-Envasado -Asepsia	-Envasado en lata y plástico, semirrígidos y flexibles. - Procesado aséptico
Retardo de la oxidación	-Antioxidantes	-Adición de antioxidantes orgánicos, inorgánicos y enzimáticos

2.6.1.1 Almacenamiento de fresa en poscosecha

Varios factores controlados en el almacenamiento de la fresa pueden ayudar a mantener su vida útil durante un plazo de tiempo más largo. Algunos de estos factores son la temperatura, la humedad relativa, flujo de aire y etileno. Si no se controlan estas variables, la vida útil es de aproximadamente 4 a 6 días, lo cual limita su comercialización. La aplicación de atmósferas controladas puede ayudar a conservar la fruta, manejando un alto contenido de CO₂ y bajo contenido de oxígeno para evitar la respiración y maduración de las frutas, se recomienda mantener una temperatura de refrigeración entre 0 y 1 °C (Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán, 2018). Es importante resaltar que, a pesar de este control convencional, se siguen reportando altas pérdidas en la etapa poscosecha por ataques de hongos, pues no siempre se mantiene la cadena de frío, además de que hongos como *B. cinerea* son capaces de crecer a temperaturas bajas (Valencia *et al.*, 2016).

Entre otras estrategias que se han investigado en las últimas décadas para ser implementadas con el fin de enfrentar la problemática de pérdidas en poscosecha debido a hongos patógenos en frutas perecedoras, destacan varios métodos de control como son: películas comestibles, aceites esenciales, extractos de plantas y microorganismos antagonistas (Palou *et al.*, 2016).

2.6.2 Control biológico

Los microorganismos biocontroladores o antagonistas han sido ampliamente estudiados en los últimos años contra patógenos en distintos cultivos. Se espera poder disminuir el uso excesivo de plaguicidas sintéticos buscando alternativas más amigables con el medio ambiente. Es importante identificar los mecanismos de acción de estos microorganismos antagonistas, entre los que se encuentran la competencia por espacio y nutrientes, micro parasitismo, producción de enzimas líticas, antibióticos, y metabolitos secundarios, así como la inducción de la resistencia en la planta (Cano, 2013).

El control biológico consiste en implementar técnicas que incluyan organismos vivos para reducir la abundancia de un patógeno por debajo de los niveles en los que pueda existir un daño o pérdida significativa. Para implementar el control biológico se han producido bioplaguicidas los cuales se clasifican en: bioquímicos (contienen metabolitos secundarios de plantas y microorganismos), semi-químicos (contienen feromonas, microorganismos (virus, hongos, protozoos)). Se han utilizado microorganismos antagonistas para el control de enfermedades por hongos fitopatógenos, como *Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., entre muchos otros (Gaitán *et al.*, 2014; Cordero *et al.*, 2003; Kurniawan *et al.*, 2018). El género *Bacillus* es el más utilizado en bioplaguicidas comerciales, se encuentra en el 85 % de los productos bacterianos debido a su gran capacidad de control y resistencia en campo. El género más utilizado en estos productos es *B. thuringiensis* (78 % de los productos) para el control de insectos. Otras especies como *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*, se utilizan especialmente para control de hongos fitopatógenos. Algunos de los principales fungicidas comerciales que contienen *B. subtilis* son: Serenade, Fungifree y Taegro (Villarreal *et al.*, 2018).

La producción de plaguicidas químicos ha disminuido un 2 % anualmente, y la producción de bioplaguicidas ha incrementado 20 % anualmente, eso representa un posible escenario de manejo integrado incluyendo productos biológicos de manera convencional en cultivos de todo tipo en un futuro cercano. Es importante contar con estrategias alternativas a los productos químicos debido al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, y a los peligros que implica el uso indiscriminado de los mismos. Para que un bioplaguicida se considere para la aplicación en el cultivo es importante que cumpla con una serie de requisitos tales como:

- A. Demostrar ser efectivo contra la plaga/enfermedad.
- B. Ser compatible con otros métodos de control utilizados.
- C. Tener un impacto ambiental bajo o de preferencia nulo.
- D. Tener un efecto duradero en el medio.
- E. Ser económicamente viable.

F. Aplicación factible.

G. Ser socialmente aceptado (por parte de los productores, comercializadores y consumidores) (Villarreal *et al.*, 2018).

El uso de microorganismos antagonistas para el control de hongos fitopatógenos ha ido en aumento; se ha determinado que, aunque algunas veces los mecanismos utilizados no son claros, su antagonismo puede atribuirse al parasitismo, efectos tóxicos directos sobre el patógeno, producción de antibióticos y competencia por nutrientes y espacio con el patógeno (Ramírez *et al.*, 2011).

Algunas rizobacterias disminuyen los efectos de los microorganismos patógenos en las plantas. *B. subtilis* produce auxinas que, además de promover el crecimiento vegetal, son capaces de inhibir hongos como *F. oxysporum* mediante la inducción de resistencia sistémica. Rizobacterias del género *Bacillus* (entre ellas *B. subtilis*) son productoras de enzimas hidrolíticas como las lipasas, proteasas y quitinasas, que degradan y desestabilizan la estructura de la pared celular de los hongos y evitan su extensión (Moreno *et al.*, 2018).

Las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, han demostrado ser eficientes para el control de hongos, específicamente, las cuales son consideradas seguras para el medio ambiente (Torres *et al.*, 2016).

2.6.2.1 *Bacillus*

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son productoras de endosporas termorresistentes; pertenecen al reino Bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y familia Bacillaceae. Existen más de 336 especies de este género, y se agrupan en diferentes grupos por su similitud genética; entre ellos está el grupo asociado a la patogenicidad, en el cual se encuentra *Bacillus cereus* y el grupo de bacterias que se encuentran en el medio ambiente como *Bacillus subtilis*. Las bacterias del género *Bacillus* son Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas, de forma

bacilar, movilidad flagelar, pH para crecimiento óptimo neutro, tamaño de 0.5-10 μm , y la mayoría de las especies crecen favorablemente de 30 a 45 °C, y son asociadas a promoción de crecimiento vegetal y control biológico (Villarreal *et al.*, 2018).

Las especies *B. subtilis* y *B. cereus* se encuentran principalmente en el suelo, debido a que son consideradas saprófitas, pero también están ampliamente distribuidas en todo el mundo por su resistencia a distintos ambientes gracias a las endosporas que producen (Tejera *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2018).

Sus endosporas se forman en la segunda fase del ciclo de vida de la bacteria, su primera fase es el crecimiento vegetativo (Figura 8). Estas esporas tienen forma oval o cilíndrica, las cuales, como se mencionó les confieren su capacidad de resistencia a condiciones de estrés y prevalencia en distintos ambientes (Villarreal *et al.*, 2018).

Fases del ciclo de vida de bacterias del género *Bacillus*:

- 1) En la primera fase del ciclo de vida la bacteria presenta un crecimiento por fisión binaria de forma exponencial si se encuentra en un medio con condiciones apropiadas para desarrollarse.
- 2) En la segunda fase se encuentra la producción de esporas como mecanismo de supervivencia a estrés como escasez de nutrientes, salinidad, temperatura, pH. La espora se forma mediante división celular asimétrica, formando dos compartimientos: célula madre y la inmersión de una preespora, después la preespora es absorbida dentro de la célula madre. Posteriormente la preespora se recubre con capas protectoras compuestas de proteínas seguida de la maduración de la espora para que al final, cuando la célula madre muera se libere la endospora, la cual puede resistir en distintos ambientes hasta formar una célula vegetativa (Tejera *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2018).

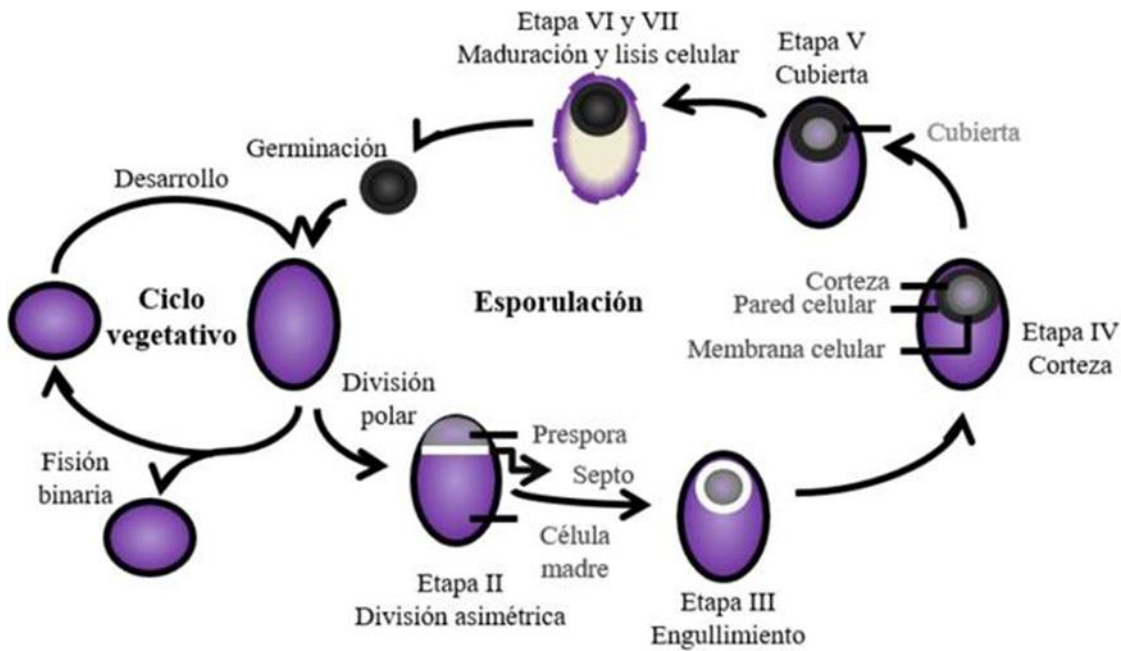


Figura 8. Ciclo de vida de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* (Villarreal et al., 2018).

También se ha reportado la capacidad de algunas especies de *Bacillus* que pueden vivir en tejidos internos de las plantas, por ejemplo, en la de uva, lo cual facilita su colonización y, por lo tanto, el control de patógenos (Kumar et al., 2011). Debido a todos estos factores, es importante considerar este género de bacterias para formular productos biotecnológicos. Especies de *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, han sido estudiadas como controladoras de patógenos, algunos mecanismos de control relacionados con estas son: producción de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos, inducción a la resistencia sistémica de la planta y se ha estudiado la producción de toxinas Cry producidas por especies como *B. thuringiensis* (Villarreal et al., 2018).

Este género de bacterias tiene la capacidad de producir compuestos antimicrobianos, como la iturina y fengicina, metabolitos que han mostrado eficacia contra los hongos (Wu et al., 2019). En investigaciones recientes con *Bacillus* sp. LYL4, que fue aislada y purificada, se determinó que tenía la capacidad de controlar *in vitro* a *B. dothidea* y

R. stolonifer. El análisis *in vivo* se realizó en la fruta de pera, a la cual se le inoculó la bacteria en una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Después de 12 h se inoculó el patógeno, a una concentración de 1×10^5 esporas/ml. En frutos no tratados se presentó el 100 % de incidencia de *R. stolonifer* y 0 % en frutos tratados con la bacteria después de 5 días de ser inoculados. La bacteria se identificó taxonómicamente de acuerdo con su morfología, y después fue confirmada molecularmente como *Bacillus*. Las colonias típicas fueron de consistencia cremosa, color blanco, transparentes al principio y secas después de dos días. Fue Gram positiva, aerobia, esporuladora, catalasa positiva (Kumar *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2019).

Mecanismos de control de bacterias del género *Bacillus*;

Lipopéptidos

El género *Bacillus* es capaz de producir antibióticos que están relacionados con su capacidad de control de fitopatógenos, entre ellos están los lipopéptidos cíclicos no ribosomales. Estos consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino, y se clasifican en tres familias: fengicinas, iturinas y surfactinas, depende de la longitud del ácido graso y su secuencia de aminoácidos. Estos lipopéptidos provocan la formación de poros y desbalance osmótico en la membrana citoplasmática de las células fúngicas, lo que causa la muerte celular de microorganismos patógeno (Villarreal *et al.*, 2018).

Enzimas

Bacterias del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir enzimas líticas como quitinasas y glucanasas, las cuales han demostrado influir en la inhibición de hongos patógenos, ya que degradan los polisacáridos de los que está compuesta su pared celular. La pared celular de los hongos contiene glicoproteínas y polisacáridos, estos últimos pueden constituir hasta el 80 %. Entre estos polisacáridos se encuentra el glucano en mayor cantidad, seguido por la quitina, compuestos por residuos de beta-1,4-N-acetilglucosamina y beta-1,3-glucosa respectivamente, estos son los

responsables de proporcionar rigidez a la pared celular junto con los enlaces glucosídicos, que pueden ser hidrolizados por las enzimas líticas producidas por la bacteria para lograr la degradación de la pared celular del patógeno (Villarreal *et al.*, 2018).

Sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios producidos por bacterias del género *Bacillus* entre otras, estos metabolitos quelan o secuestran el hierro, metal que se encuentra en la naturaleza generalmente en forma férrica (Fe^{3+}), por lo tanto, no puede ser aprovechado por muchos seres vivos. Los sideróforos son estructuras proteicas receptoras y de alta afinidad por el fierro, que han sido desarrollados por microorganismos debido a la disponibilidad limitada de hierro. Estos son capaces de capturar el Fe^{3+} , y son clasificados en: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos, fenolatos y combinaciones de estos (Villarreal *et al.*, 2018).

Las cepas de algunas especies de *Bacillus* capaces de sintetizar sideróforos, además muestran capacidad de control biológico, debido a que restringen la disponibilidad de hierro mediante su quelación, por lo tanto, el patógeno no puede aprovechar este nutriente y esto impide su desarrollo. Está documentado que estos complejos Fe^{3+} -sideróforo no afectan negativamente a la planta, ya que requieren menor cantidad de hierro que los microorganismos antagonistas, incluso algunas plantas son capaces de aprovechar estos complejos (Villarreal *et al.*, 2018).

Respuesta sistémica inducida

Con el tiempo las plantas han ido desarrollando mecanismos de defensa contra diversos patógenos, micro y macroscópicos. Estos mecanismos se activan en el momento que existe interacción planta-patógeno, y se denominan resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) (Villarreal *et al.*, 2018). La SAR depende de la señalización de ácido salicílico, que activa los genes

relacionados con la patogénesis, codificándolos en proteínas con capacidad antimicrobiana. En cambio, en la ISR, la señalización se da por el ácido jasmónico y el etileno. Sin embargo, las dos funcionan de manera similar. *Bacillus* produce moléculas elicitoras como los lipopéptidos, compuestos volátiles y fitohormonas que inducen la respuesta sistémica en la planta, protegiéndola ante amenazas de ataque por patógenos. Los compuestos volátiles activan genes relacionados con la patogénesis, además, *Bacillus* puede cambiar estructuralmente la pared celular con la acumulación de lignina, y es capaz de producir metabolitos secundarios como los flavonoides, fitoalexinas y auxinas, hormonas que inducen a la resistencia de la planta. Los microorganismos pueden inducir a la resistencia mediante diferentes rutas metabólicas (Moreno *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2020; Villarreal *et al.*, 2018).

Existen pocos estudios realizados con especies de *Bacillus* en nivel de campo, uno de ellos es el de Sylla *et al.* (2015), que evaluaron *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aureobasidium pullulans* y *Beauveria bassiana* en tratamientos individuales y combinados como antagonistas contra *B. cinerea* en fresa. En los frutos de plantas tratadas con *Bacillus amyloliquefaciens*, aún después de siete días se redujo la incidencia de infección por *B. cinerea* en un 28 %. Este estudio destaca la importancia de la prevención de infecciones por *B. cinerea* durante la floración, pues las flores de la planta de fresa son propensas a ser infectadas por este hongo, y representan un peligro de permanencia hasta poscosecha. Se observaron mejores resultados en el control de hongos en poscosecha cuando los agentes de control se aplicaron inmediatamente antes de la cosecha; uno de los retos de la aplicación de microorganismos antagonistas en campo son los múltiples factores que pueden afectarlos ya que no pueden ser controlados, así como tampoco sus interacciones. Debido a esto, es necesario realizar mayor investigación al respecto (Sylla *et al.*, 2015).

De igual manera, la abundancia de la bacteria en frutos en condiciones de campo no ha sido suficientemente documentada. En un estudio se evaluó *Bacillus subtilis* en un cultivo de plantas de fresa bajo túnel y otro sin protección; se compararon los números de lecturas de secuencia de *B. subtilis* en ambos cultivos a las cuatro horas y a los ocho días de haber aplicado la bacteria, y se encontró que la abundancia de la bacteria

aumentó satisfactoriamente en el cultivo protegido después de cuatro horas de aplicación, sin embargo, disminuyó ocho días después en las evaluaciones realizadas en hoja. La bacteria se encontraba en mayor abundancia en las plantas tratadas que en las control. Se sugirió que es necesario realizar más estudios donde se demuestre la viabilidad de microorganismos en frutos y plantas tratadas en campo (Wei *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es necesario investigar y evaluar el potencial de las bacterias para mejorar cultivos, bacterias Gram positivas, motiles, aerobias y productoras de esporas como las del género *Bacillus*, que tienen gran importancia y se requiere su estudio en campo para control biológico (Tejera *et al.*, 2011).

2.6.2.2 *Bacillus subtilis*

Esta bacteria tiene las características del género *Bacillus*, es Gram positiva y su temperatura óptima es de aproximadamente 30°C (Sylla *et al.*, 2015). Los mecanismos que se han asociado a su capacidad biocontroladora son:

- Producción de antibióticos extracelulares (bacilomicina, iturina, micosubtilina).
- Producción de enzimas líticas (quitinasa, proteasa, glucanasa).
- Competencia por espacio y nutrientes (Ruiz *et al.* 2016; Plascencia *et al.*, 2012).

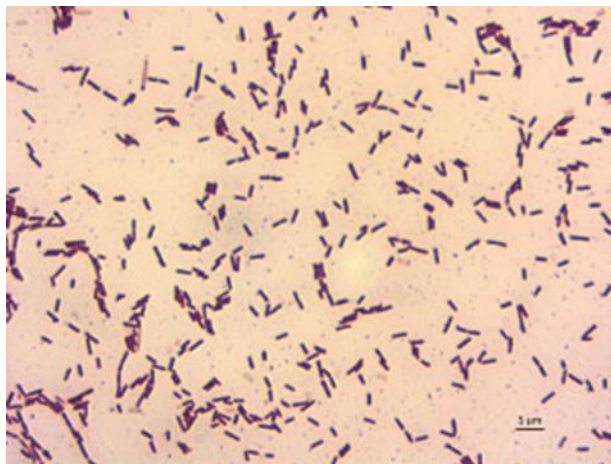


Figura 9. Tinción de *Bacillus subtilis*. Recuperada de:
<https://cepariounicach.wordpress.com/2014/09/24/bacillus-subtilis/>

Se ha reportado que *B. subtilis* es capaz de producir biopelículas con contenido proteico como mecanismo de colonización en la rizósfera de las plantas y como mecanismo de sobrevivencia (Rudrappa *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2010).

Especies como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* no son consideradas patógenos para el ser humano; *B. subtilis* ha obtenido el estado QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. En cambio, cepas de especies como *B. cereus* y *B. anthracis*, aunque han demostrado eficiencia en el control de fitopatógenos, han llegado a identificarse como patógenas para el humano, lo que hace indispensable realizar estudios de patogenicidad a las especies utilizadas, así como realizar estrategias que permitan integrar el control biológico con control químico (Villarreal *et al.*, 2018)

B. subtilis ha sido de las bacterias más estudiadas en cuanto a su capacidad de control de microorganismos fitopatógenos. Diferentes estudios han demostrado que *B. subtilis* posee actividad antagónica contra *R. stolonifer*, la cual induce la resistencia y aumenta la actividad enzimática. En el estudio realizado por Wang *et al.* (2013), *B. subtilis* redujo el diámetro de lesión por *R. stolonifer* en un 37.2 % y la incidencia en un 26.7 % comparado con el control al segundo día de la inoculación por herida en frutos de durazno. Los experimentos *in vitro* demostraron que la bacteria inhibió significativamente el crecimiento de micelio de *R. stolonifer*, mostrando halos de inhibición.

Se ha probado el antagonismo de *B. subtilis* y *Pseudomonas arsenicoxydans* contra *Alternaria* y *B. cinerea* en arándano, el estudio se realizó en laboratorio inoculando la bacteria directamente en el fruto para posteriormente inocular los patógenos, después se observó la incidencia y severidad; *B. subtilis*, redujo la incidencia del moho gris (*B. cinerea*) en un 33 %, y la severidad en un 64 %. *Pseudomonas arsenicoxydans* no redujo la aparición del moho gris.

En cuanto *B. subtilis*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas brenneri* y *Bacillus badius* redujeron la incidencia de *B. cinerea* en arándano en un promedio de 50 %, y se redujo la severidad hasta un 59 % (Kurniawan *et al.*, 2018).

Se han realizado experimentos a nivel invernadero con la cepa de *Bacillus subtilis* QST 710 en tomates. La bacteria se aplicó en hojas y directamente al fruto. Se identificaron colonias de *B. subtilis* en las placas, se realizó el muestreo de la superficie de la fruta una semana después de la primera aplicación de bacteria para determinar la presencia y niveles de bacteria y hongos presentes y se envió una muestra representativa a un laboratorio externo para confirmación mediante un análisis de secuencia de ADN. *Penicillium* y *Rhizopus* fueron inhibidos en tomates con una temperatura de 21 °C, los tomates con la bacteria presentaron una severidad de 8 a 8.9 %, mientras que en el control fue de 28.4 a 30.8 %. La incidencia se redujo en un 14-19 % (Punja *et al.*, 2016).

También se ha evaluado la bacteria *B. subtilis* contra *R. solani* *in vitro* e *in vivo* en papas inoculadas con la bacteria y el patógeno, posteriormente colocadas en macetas. Se encontró que las plantas de papa tratadas con la mayor concentración de *B. subtilis* (10⁹ esporas/mL) mostraron los mejores resultados, ya que, redujo la incidencia un 81 % en comparación con el control. Este efecto fue importante debido a la capacidad de la bacteria de causar deformaciones en *R. solani* tales como: deformación de hifas, filtración del protoplasto y ruptura de micelio, así como penetración y desintegración de la pared celular del hongo por la producción de proteasas de la bacteria. Se observó que las condiciones para un control más efectivo de la bacteria contra el hongo, se dan al aplicarla de manera preventiva (Khedher *et al.*, 2015).

Por lo antes mencionado, esta investigación pretendió determinar si la aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 en plantas de fresa en condiciones de campo, era capaz de promover reducción de la incidencia y severidad de hongos en frutos de fresa en poscosecha, y cuánto tiempo después de la aplicación en campo, la bacteria, *B. subtilis* cepa GOS-01 B67748 contribuye a disminuir las poblaciones de fitopatógenos en frutos de fresa en poscosecha.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a las grandes pérdidas por ataques de hongos patógenos a un producto de alto valor económico como la fresa, se requiere realizar una búsqueda de alternativas que permitan reducir la aparición de estos en poscosecha. Entre las alternativas se encuentra la aplicación de microorganismos antagonistas, de los cuales destaca *B. subtilis*, una bacteria controladora de hongos apta para la aplicación en campo debido a la producción de esporas termorresistentes que le permiten soportar condiciones adversas.

Existe poca información sobre la influencia de la aplicación de *B. subtilis* en campo en el control de hongos en fresas en poscosecha, ya que actualmente, estos fitopatógenos solo se controlan con la aplicación de fungicidas químicos, pero después de la cosecha no se aplica ningún tipo de producto convencionalmente, solo se manejan con temperaturas y atmósferas controladas. Por lo tanto, un resultado positivo de la aplicación en campo para el control de daños por hongo en fresas representaría una gran ventaja para el aprovechamiento de estos microorganismos. Esta investigación parte de la importancia de evaluar el grado de control de *B. subtilis* sobre hongos fitopatógenos, aplicada en campo aún después de la cosecha y el tiempo que la bacteria puede proteger a la fresa y permanecer en la superficie de esta después de la aplicación. Esta información será de utilidad para los productores, los comercializadores, consumidores, y para futuras investigaciones de esta y otras bacterias antagonistas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* aplicada en campo como controladora de hongos patógenos de fresa en poscosecha.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la severidad e incidencia de hongos presentes en fresas en poscosecha provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo.
- Evaluar el Índice de deterioro y decaimiento en fresas en poscosecha provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo.
- Determinar la presencia y densidad de bacterias del género *Bacillus* y hongos en la superficie de las fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 en fruto de fresa

Los 2 tratamientos evaluados consistieron en plantas de fresa tratadas convencionalmente con fungicidas químicos comúnmente utilizados en la zona, con aplicaciones alternadas cada 8 o 15 días según fuera necesario por las condiciones climáticas o el tiempo de presencia de hongos, se utilizaron los siguientes fungicidas: tiabendazol (Tecto® 60), azoxystrobin+metalaxil (Uniform®), metalaxil (Ridomil Gold® 480 SL) y tiofanato metílico (Cercobin® M). Además del tratamiento convencional se aplicó *B. subtilis* GOS 01 B-67748, el segundo tratamiento consistió en el tratamiento convencional sin la aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 (testigo).

Las fresas se obtuvieron de un cultivo de fresa variedad Fortuna, ubicado en El Llano, Zamora Michoacán. Se utilizaron 3 surcos de 110 m lineales con 867 plantas para aplicar cada tratamiento. Se aplicó 1 L de suspensión bacteriana a 1×10^{12} UFC/ml en 25 L de agua, por aspersion con mochila de motor al follaje y frutos. Las aplicaciones se realizaron cada 15 días por 4 meses.

6.2 Muestreo

Las fresas se muestrearon de los 3 surcos en los que se aplicó cada tratamiento, con una separación de 3 surcos entre las plantas con *B. subtilis* GOS 01 B-67748 y el testigo para evitar contaminación de la bacteria a los surcos cercanos. Los frutos de fresa se muestrearon 1 día, 5 días y 15 días después de la primera aplicación de la bacteria (11 de octubre de 2019), y después de la octava aplicación (17 de enero de 2020). Se tomaron 100 fresas por tratamiento sin daño aparente, en un estadio de maduración de 5 de acuerdo a la NMX-FF-062-2002. Los muestreos se realizaron al azar en zigzag con guantes estériles para evitar la contaminación cruzada. Se

evaluaron los dos tratamientos: 1) Frutos de fresas tratadas convencionalmente y con *B. subtilis* y 2) Frutos de fresas tratadas convencionalmente sin *B. subtilis* (testigo).



Figura 10. Campo experimental en el que se realizó el muestreo de fresas, ubicado en El Llano Zamora, Michoacán.

6.3 Evaluación del índice de severidad e incidencia

Las fresas se llevaron a laboratorio inmediatamente después de la cosecha para comenzar las evaluaciones. Se colocaron 8 fresas de cada tratamiento en cajas de plástico (20 x 20 x 6 cm) estériles con toallas de papel en el fondo para absorber humedad o exudados y evitar la contaminación entre frutos. Las cajas con fresas se conservaron a temperatura ambiente (22 ± 4 °C). Las cajas se cubrieron con tela de organza y se le sobrepuso una tapa de plástico para evitar la entrada de insectos. Se

consideraron 7 cajas con 8 frutos por tratamiento. El índice de severidad e incidencia se evaluó cada 24 h por 6 d.

Para evaluar el grado de severidad de hongos se utilizó una escala de cinco niveles: 1 (0 %) = sin micelio ni exudados; 2 (1-25 %) = micelio, pocos exudados; 3 (26-50 %) = micelio definido, esporangios sin esporangiosporas, exudados escasos; 4 (50-75 %) = fruto cubierto por micelio, esporangiosporas, exudados abundantes, inicio de pudrición; 5 (76-100 %) = micelio abundante, exudados abundantes, esporangiosporas, pudrición avanzada (Chávez, 2011). Posteriormente se utilizó la siguiente ecuación propuesta por Pérez *et al.* (1995), para calcular el índice de severidad:

$$\text{Índice de severidad} = Xi (0) + Xi (1) + Xi (2) + Xi (3) + Xi (4) + Xi (5) / N$$

En donde:

Xi: Es el número de frutos observados por cada grado de daño.

Números del 1 al 5: Grado de daño según la escala de severidad

N: Número de frutos por unidad experimental

La incidencia se expresó tomando en cuenta el porcentaje de presencia de hongos en fresas evaluadas por caja (Kurniawan *et al.*, 2018).

$$\text{Incidencia} = \text{fresas con hongo} * 100 / \text{número de frutos evaluados por caja}$$

6.4 Evaluación del índice de deterioro y decaimiento

También se analizó el deterioro y decaimiento en las fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* y sin la bacteria. Se evaluó cada 24 h por 6 d en las fresas colocadas en cajas y conservadas a temperatura ambiente (22 ± 4 °C) como se indicó anteriormente.

Para evaluar el deterioro en fresas se utilizó una escala de 5 niveles: 1 = firme y sin alteraciones; 2 = manchas y ablandamiento; 3 = aparición de micelio; 4 = micelio, ablandamiento, secreción de fluidos y mal olor; 5 = ablandamiento total (Oregel *et al.*, 2017).

El decaimiento se representó por el porcentaje de superficie con daños de diferente naturaleza (daño de estructura, presencia de micelio, madurez excesiva), se tomó en cuenta la siguiente escala: 1 = sin daño, 2 = daño ligero ($\leq 25\%$), 3 = daño moderado ($\geq 26\%$ y $\leq 50\%$), 4 = daño severo ($\geq 51\%$ y $\leq 75\%$), 5 = daño completo (76-100 %) (Zamarrón *et al.*, 2014).



Figura 11. Montaje del experimento en laboratorio para evaluación de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento.

6.5 Determinación de la densidad bacteriana y la presencia del género *Bacillus* y de hongos en la superficie de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo

6.5.1 Análisis de bacterias del género *Bacillus* presentes en las fresas

Se determinó la densidad bacteriana presente en la superficie de la fruta en poscosecha inmediatamente después de la cosecha, 1, 5 y 15 días después de haber aplicado *B. subtilis* GOS 01 B-67748 en campo en una concentración de 1×10^{12} UFC/ml. Para esto se tomaron 25 g de fresa de cada tratamiento y se colocaron en 225 ml de

agua peptonada en un recipiente de plástico estéril de 500 ml, se tapó para llevarlo a agitación horizontal de 150 vueltas/min durante 30 min.

Se realizaron diluciones seriadas colocando 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada contenida en tubos de ensayo de 20 ml. Se tomó 1 ml de la solución y se colocó en placas Petri estériles, después se realizó el vertido en placa de acuerdo a lo indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 del medio PDA estéril (\approx 9 ml). Se consideraron las diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-7} . Las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

Se observaron colonias características de *B. subtilis*: blancas, circulares, con bordes irregulares, cremosas, transparentes al principio, secas y opacas a los dos días de acuerdo a lo indicado por Vos *et al.* (2011), y también se cuantificaron las colonias de bacterias totales.

También se determinó la presencia de bacterias del género *Bacillus* de la superficie de trozos de aproximadamente 0.5 cm² de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* y sin tratamiento de los diferentes muestreos. Esto se realizó de acuerdo con el método propuesto por Agrios (2005) con ligeras modificaciones. Bajo condiciones estériles, se cortaron y colocaron trozos de fresas en medio PDA contenido en cajas Petri. Se colocaron 5 trozos por placa, cada trozo provenía de una fresa diferente y se incubaron las placas a temperatura ambiente (18-26°C) hasta la aparición de colonias bacterianas. Se utilizaron 15 fresas por tratamiento. Se determinó el porcentaje de presencia de bacteria del género *Bacillus* en los trozos. Para la identificación morfológica de *Bacillus*, se realizó un frotis de bacteria sobre porta objetos y se visualizó en el microscopio compuesto (Realpe *et al.*, 2002).

6.5.2 Análisis e identificación de hongos presentes en las fresas

Se determinó el porcentaje de hongos de la superficie de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* y testigo de los diferentes muestreos. En los trozos mencionados previamente se presentaron algunos hongos que fueron identificados.

Para esto, se purificaron los hongos, se tomó un fragmento de micelio y se colocó en caja Petri con PDA, éstas se incubaron a 25 °C hasta el desarrollo de hifas. Una vez presentes las hifas, se cortaron y se transfirieron a medio PDA para la purificación del hongo.

Después de que se tomó muestra de hongos para purificar, se tomó micelio y esporas que crecieron de los 15 tozos de fresa por tratamiento en los tres muestreos de enero (24 h, 5 días y 15 días después de aplicar *B. subtilis*) con cinta adhesiva y se colocó sobre porta objetos que contenía una gota de glicerol. Se visualizaron en el microscopio compuesto y se identificaron los hongos mediante las claves morfológicas propuestas por Barnett y Hunter (1998) y Watanabe (2010).

Adicionalmente, se determinó la frecuencia de cada uno de ellos en ambos tratamientos con el cálculo del porcentaje de presencia en cada placa con trozos de los frutos analizados.

Frecuencia = Número de trozos en los que se observó el hongo por cada placa / 100 *
número de repeticiones por placa

La identificación se realizó con el fin de especificar cuáles son los hongos que *B. subtilis* pudo controlar, y la frecuencia se evaluó para determinar en qué porcentaje inhibió a cada uno de los ellos.

Además, se realizó la identificación molecular de los hongos purificados. La extracción de ADN se hizo 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 inicial de 5 min a 94 °C y 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 35 s a 60 °C y 35 s a 72 °C, 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 positivos se enviaron a secuenciar en 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.

6.6 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza con un $P \leq 0.05$ y la comparación de las medias con la prueba de Tukey utilizando el SAS® 9.4 para Windows 10.

Para determinar la influencia de los tratamientos, el tiempo de muestreo (1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*), y la interacción entre estos en la severidad, incidencia, deterioro y decaimiento, así como en la densidad bacteriana, porcentaje y frecuencia de hongos se realizó un análisis de varianza de dos vías con el programa RStudio®.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas en poscosecha previamente tratadas con *B. subtilis* en campo

7.1.1 Evaluación después una aplicación de *B. subtilis* en campo (octubre 2019)

Las fresas muestreadas 24 h después de la primera aplicación en campo (octubre de 2019) de *B. subtilis* GOS 01 B-67748, presentaron significativamente menor severidad, incidencia y deterioro en comparación con las fresas testigo (Tabla 2). Las diferencias se mantuvieron para los días 5 y 15 de evaluación en las fresas en poscosecha, presentando significativamente menor severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en comparación a las fresas testigos (Tabla 2). Las diferencias significativas se observaron desde el día cuatro de almacenamiento de las fresas, y las mayores diferencias se presentaron al quinto día de almacenamiento, día en el que se registraron los datos presentes en las tablas 2 y 3.

A los 15 días de la primera aplicación de *B. subtilis* en las fresas en campo, la severidad por el ataque de hongos se redujo hasta un 31.5 % y la incidencia un 73.3 %. Además, se redujo el deterioro un 19.8 % y el decaimiento un 25.7 % (Tabla 2). El análisis de varianza de dos vías confirmó que el tipo de tratamiento en las fresas afectó significativamente la severidad, la incidencia y el deterioro ($P < 0.001$) (Tabla 2), es decir, el tratamiento con *B. subtilis* redujo significativamente estos tres factores. Sin embargo, el tratamiento de *B. subtilis* en fresa, no afectó significativamente al decaimiento debido al bajo porcentaje de reducción de este factor con la bacteria en el primer muestreo, donde tampoco la comparación de medias de Tukey arrojó diferencias significativas, esto puede deberse a condiciones ambientales como las temperaturas y la humedad, ya que en el decaimiento se evaluó el daño general,

incluyendo maduración y ablandamiento, no solamente daño por hongos. (Tabla 2). No obstante, el tratamiento de *B. subtilis* en fresas tendió a presentar menor decaimiento que las fresas testigo.

El tiempo transcurrido después de la aplicación de *B. subtilis* en fresa, también influyó significativamente en la severidad, incidencia y el deterioro ($P < 0.001$), pero no en el decaimiento (Tabla 2) debido a que los valores de estos factores varían a lo largo del tiempo en los tres muestreos. La severidad, incidencia, deterioro y decaimiento no se vieron afectados significativamente por la interacción tratamiento-tiempo (Tabla 2), es decir, la reducción de estos factores con el tratamiento con la bacteria no se vio afectada con respecto a los días transcurridos desde la aplicación en campo. Esto refleja a una mayor estabilidad en la reducción de la incidencia, severidad y deterioro con el tratamiento de la *B. subtilis* en comparación con el testigo en cada uno de los muestreos (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas producidas con *B. subtilis* como biocontrolador de hongos.

Mes	Tratamiento	Tiempo de cosecha (d)	Severidad	Incidencia (%)	Deterioro	Decaimiento
Octubre	<i>B. subtilis</i>	1	1.42 ± 0.5 B	30.35 ± 9.4 B	2.26 ± 0.35 B	2.71 ± 0.58 A
		5	1.03 ± 0.06 B	7.14 ± 9.8 B	1.78 ± 0.27 B	1.78 ± 0.32 B
		15	1.00 ± 0.00 B	7.14 ± 9.8 B	1.78 ± 0.13 B	1.91 ± 0.20 B
	Testigo	1	2.05 ± 0.47 A	41.07 ± 9.4 A	2.85 ± 0.50 A	3.01 ± 0.56 A
		5	1.30 ± 0.20 A	25.0 ± 10.0 A	2.23 ± 0.23 A	2.26 ± 0.30 A
		15	1.46 ± 0.50 A	26.78 ± 7.0 A	2.22 ± 0.49 A	2.57 ± 0.50 A
		Significancia (Tratamiento)	***	***	***	ns
		Significancia (Tiempo de cosecha)	***	***	***	ns
		Significancia (Interacción T x T)	ns	ns	ns	ns

Medias (\pm desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ., *, **, y *** indican significancia de $P \leq 0.1$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, y $P \leq 0.001$ respectivamente. ns = no significancia (Análisis de varianza de dos vías). Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

Es importante mencionar que en el muestreo que se realizó 24 h después de la aplicación de *B. subtilis*, la severidad, la incidencia, el deterioro y el decaimiento fueron mayores en fresas de ambos tratamientos en comparación con el segundo y el tercer muestreo de octubre de 2019, esto pudo deberse a la aplicación de fungicidas convencionales en el cultivo ya que, durante el segundo y tercer muestreo, se realizaron más aplicaciones de fungicidas para proteger la fresa cuando comenzaba la producción. No obstante, los efectos de disminución de estos parámetros en el tratamiento con *B. subtilis* fueron mayores que los observados en el control, por lo que se infiere que la aplicación de la bacteria si tuvo un efecto positivo para controlar el daño de los frutos en los periodos evaluados.

7.1.2 Evaluación después de ocho aplicaciones de *B. subtilis* en campo (enero, 2020)

Las fresas muestreadas 24 h, 5 y 15 d después de la octava aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B-67748 en campo (enero 2020), presentaron significativamente menor severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en comparación con las fresas testigo (Tabla 3). Las diferencias más altas, de acuerdo con los análisis estadísticos, se manifestaron a partir del quinto día de almacenamiento en las fresas.

A los 15 días de la octava aplicación de *B. subtilis* en las fresas en campo, la severidad por el ataque de hongos se redujo hasta un 58.7 % y la incidencia un 61.5 %. Además, se redujo el deterioro un 40.5 % y el decaimiento un 43 % (Tabla 3). Después de ocho aplicaciones de *B. subtilis* (enero 2020), el análisis de varianza de dos vías confirmó que el tipo de tratamiento influyó de manera significativa en la severidad, incidencia, deterioro y decaimiento ($P < 0.001$), dichas variables siempre fueron mayores en fresas testigo (Tabla 3).

El tiempo de muestreo después de la octava aplicación de *B. subtilis* en fresas influyó significativamente únicamente en la incidencia ($P < 0.01$) ya que se ésta varió en los

diferentes tiempos de muestreo, y presentó un mayor valor en las fresas testigo. Esto posiblemente se debió a que, como se puede observar, 15 días después de la aplicación de la bacteria se presentó un aumento de la incidencia en fresas testigo (46.7 %), probablemente por el incremento en la proliferación de microorganismos en la parcela con el paso del tiempo, entre ellos, hongos fitopatógenos, y con la mayor manipulación de las plantas por el personal que realizó los cortes. El tiempo no afectó significativamente a la severidad, deterioro y decaimiento (Tabla 3). La interacción tratamiento-tiempo influyó significativamente únicamente en la incidencia ($P < 0.05$).

Tabla 3. Índice de severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en fresas producidas con *B. subtilis* como biocontrolador de hongos.

Mes	Tratamiento	Tiempo de cosecha (d)	Severidad	Incidencia (%)	Deterioro	Decaimiento
Enero	<i>B. subtilis</i>	1	1.28 ± 0.43 B	16.28 ± 9.44 B	2.01 ± 0.30 B	2.23 ± 0.30 B
		5	1.14 ± 0.16 B	16.28 ± 9.44 B	2.00 ± 0.18 B	2.14 ± 0.20 B
		15	1.00 ± 0.00 B	18.00 ± 9.79 B	1.57 ± 0.20 B	1.71 ± 0.23 B
	Testigo	1	2.14 ± 0.50 A	28.71 ± 6.09 A	2.57 ± 0.50 A	2.71 ± 0.31 A
		5	2.00 ± 0.50 A	28.71 ± 6.09 A	2.78 ± 0.43 A	2.85 ± 0.50 A
		15	2.42 ± 0.50 A	46.71 ± 9.44 A	2.64 ± 0.50 A	3.00 ± 0.11 A
		Significancia (Tratamiento)	***	***	***	***
		Significancia (Tiempo de cosecha)	ns	**	ns	ns
		Significancia (Interacción T x T)	ns	*	ns	.

Medias (± desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ., *, **, y *** indican significancia de $P \leq 0.1$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, y $P \leq 0.001$ respectivamente. ns = no significancia (Análisis de varianza de dos vías). Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

La severidad en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis*, se redujo hasta un 31.5 % en octubre 2019 y 58.7 % enero 2020, estos resultados son semejantes a lo reportado por Punja *et al.* (2016), quienes aplicaron *B. subtilis* QST 7B en una concentración de 1×10^9 UFC/g en plantas de tomate a nivel invernadero cada cuatro semanas y se redujo la severidad por el ataque de hongos como *Penicillium* sp. y *R. stolonifer*, hasta 61.9 % en frutos en poscosecha, durante 1 a 2 semanas de almacenamiento a 21°C. De igual manera, estudios realizados por Calvo *et al.* (2019), reportaron una reducción en el porcentaje de severidad de *B. cinerea* de 54 % en uvas recién cosechadas que previamente se trataron en el viñedo con *B. subtilis* a una concentración de 5.13×10^{10} UFC/g, los autores realizaron seis aplicaciones durante las diferentes etapas del cultivo (cuatro meses): inicio y final del florecimiento, antes del cierre de la flor, en el envero y antes de la cosecha, aproximadamente una o dos veces mensualmente de acuerdo con la etapa de crecimiento de la planta.

En el presente estudio, la incidencia de hongos en las fresas se redujo con el tratamiento de *B. subtilis* hasta un 73.3 % en octubre 2019 y 61.5 % en enero 2020, esto coincide con lo reportado por Punja *et al.* (2016), quienes aplicaron a *B. subtilis* en una concentración de 1×10^9 UFC/g en tomates de invernadero y se redujo la incidencia de hongos como *R. stolonifer* un 72.2 %. En este mismo sentido, Zhang *et al.* (2019), reportaron una reducción de 78.8 % en la incidencia de *B. cinerea* con la inoculación de *B. subtilis* (1×10^7 UFC/ml) y el hongo patógeno (1×10^6 UFC/ml) en duraznos en poscosecha. De igual manera, Sylla *et al.* (2015), reportaron una reducción de la incidencia de *B. cinerea* de un 28 % en fresas después de siete días de almacenamiento, las fresas provenían de planta tratada desde campo con *Bacillus amyloliquefaciens* (2.5×10^{12} endosporas/ml) una vez por semana desde el florecimiento hasta la cosecha, se realizaron ocho aplicaciones en total. Por su parte, Wang *et al.* (2013), inocularon *B. subtilis* SM21 (1×10^8 CFU/ml) en duraznos realizando una herida en el fruto en poscosecha y posteriormente inocularon *R. stolonifer* (1×10^5 esporas/ml), la bacteria redujo la incidencia un 26.7 % por el ataque del hongo, el experimento se realizó a nivel laboratorio y las diferencias se comenzaron a observar desde el segundo día de inoculación del patógeno.

Otros agentes de control biológico, como la levadura *Metschnikowia fructicola* han sido aplicados en planta de fresa en precosecha, como método preventivo de enfermedades en pre o poscosecha; Karabulut *et al.* (2004) aplicaron la levadura semanalmente a una concentración de 2×10^{10} UFC/ml, lo que redujo significativamente la pudrición por hongos, principalmente por *B. cinerea* y *R. stolonifer*, en promedio el porcentaje de reducción fue de 82.1 % después de la tercera aplicación en campo y 64.5 % después de la quinta, en comparación con el control. La levadura también redujo la incidencia de enfermedades por ataque de hongos en un 12.6 % en comparación con plantas tratadas con Fenhexamida, en las que la incidencia fue de 45.9 %.

El deterioro disminuyó un 20.7 % en octubre (2019) y 40.5 % en enero (2020) en fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo; el decaimiento se redujo 25.7 % en octubre y 43 % en enero, estos resultados coinciden con lo obtenido por Feliziani *et al.* (2015), quienes realizaron un tratamiento precosecha en campo con quitosano al 0.5 % en plantas de fresa, que al tercer día de almacenamiento redujo significativamente el decaimiento de 29 a 36 %. La disminución del deterioro de frutos con *B. subtilis* se ha reportado estudios *in vivo*, como el realizado por Wang *et al.* (2018), donde se evaluó el deterioro en tomates en etapa poscosecha, ya que está relacionado con el ataque por hongos y desarrollo de infecciones; los tomates se sumergieron en una suspensión de 1×10^7 UFC/ml de *B. subtilis* y después de los 15 días de almacenamiento a 25 °C, se comenzaron a observar diferencias significativas entre ambos tratamientos, la bacteria logró reducir el deterioro de 33.2 % a 48.4 % e incrementó la firmeza del fruto un 21.4 %.

La complejidad de las interacciones microbianas en la planta y los factores ambientales, son factores que pueden afectar los resultados en estudios realizados con microorganismos antagonistas bajo condiciones poco controladas como las de campo (Sylla *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). En estudios realizados por Sylla *et al.* (2015), se evaluó *B. amyloliquefaciens* en campo durante dos años, 2011 y 2012, como controladora de hongos fitopatógenos en poscosecha, se esperaba una mayor incidencia de *Botrytis cinerea* en 2012 debido a las lluvias y al incremento de humedad,

lo que favorece el desarrollo de *B. cinerea*. Sin embargo, después de siete aplicaciones de la bacteria, la incidencia en el 2011 llegó a ser la más alta, de 27.5 % a 55.6 %, y en 2012 fue menor, de 8.9 % a 25.8 %. Esto se debe a que son diversos los aspectos que influyen en la incidencia del hongo, no solo afectan factores ambientales sino las propiedades y estructura de la planta, la biota nativa, por mencionar algunos, por lo que es importante investigar los mecanismos por medio de los cuales interactúan el hongo y la bacteria para impactar la eficiencia de control de los microorganismos antagonistas bajo condiciones de campo (Sylla *et al.*, 2015).

En esta investigación no se incluyó como objetivo determinar los mecanismos de control ejercidos por *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 sobre los hongos en poscosecha, pero algunas investigaciones indican que el control de hongos en la fresa por *B. subtilis* puede deberse a la competencia por espacio y nutrientes. Al predominar en la superficie, y debido a su capacidad de producción de esporas resistentes, la bacteria no permite que el patógeno crezca o reduce su crecimiento, esta capacidad de colonización y competencia se demostró en tomates al aislar *B. subtilis* directamente de frutos tratados y observar antagonismo contra hongos en placas Petri (Punja *et al.*, 2016).

Otro de los mecanismos indirectos para control de hongos en la superficie de frutos en poscosecha es el incremento de enzimas producidas durante la colonización de bacterias antagónicas a hongos, tales como la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT), que pueden estar relacionadas con la reducción de la peroxidación lipídica, o un retraso en la senescencia de la fruta, es decir, su degradación, etapa en la que los microorganismos fitopatógenos pueden aprovechar para atacar y colonizar (Zhang *et al.*, 2019; Ramírez *et al.*, 2013). Esto puede relacionarse con la disminución del deterioro y decaimiento en las fresas tratadas con *B. subtilis* en campo. Zhang *et al.* (2019), reportaron un incremento significativo en estas enzimas de defensa en frutos de durazno en poscosecha al inocularles *B. subtilis* combinada con hongos patógenos, en este caso, *Alternaria tenuis* y *B. cinerea*. La actividad enzimática fue mayor con el tratamiento mencionado previamente en comparación con los frutos inoculados únicamente con los patógenos. Karabulut *et al.*

(2004), reportaron que el control de *Metschnikowia fructicola* aplicada en plantas de fresa contra *B. cinerea* pudo deberse a competencia por espacio y nutrientes, ya que esta levadura fue capaz de colonizar las fresas de manera efectiva en altas concentraciones (1×10^5 UFC/fruta) después de haber sido tratada con una concentración inicial de 2×10^{10} UFC/ml.

En un estudio realizado por Ju *et al.* (2014), se reportó que, con la aplicación de *B. subtilis* a una concentración de 1×10^7 UFC/ml en manzanos, la bacteria se mantuvo hasta 30 días en el árbol y se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes que son capaces de inhibir a los hongos por la inducción a la resistencia sistémica, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue mayor 10 días después de inocular la bacteria, mismo tiempo en que la concentración de bacteria fue mayor (1×10^5 UFC/g). La máxima actividad de peroxidasa (POD) se observó 5 días después de la inoculación de la bacteria y se redujo después de 15 días de la inoculación (Ju *et al.*, 2014). Esto puede relacionarse con la disminución de la severidad, incidencia, deterioro y decaimiento en el tratamiento con *B. subtilis* GOS 01 B-67748 conforme pasó el tiempo entre los 5 y los 15 días, con excepción de la incidencia en el último muestreo (Tabla 3). La ventaja de aplicar un agente de control biológico en lugar de un fungicida químico es que este último puede dejar de ser eficaz contra hongos por la resistencia que genera en ellos, en cambio, los microorganismos antagonistas siguen actuando contra infecciones futuras aún en poscosecha debido a la colonización de la superficie de las frutas y competencia por nutrientes y espacio (Karabulut *et al.*, 2004). En la investigación realizada por Karabulut *et al.* (2004), la Fenhexamida controló la pudrición por hongos en campo, pero no pudo controlar infecciones por *R stolonifer* en poscosecha.



Figura 12. Fresas con los tratamientos a los 5 días de almacenamiento.

Izquierda) Fresas tratadas con *B. subtilis* en campo. Derecha) Fresas testigo.

7.2 Determinación de la presencia y densidad bacteriana del género *Bacillus* y hongos en la superficie de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo

7.2.1 Presencia y densidad bacteriana del género *Bacillus* en la superficie de fresas de plantas tratadas con *B. subtilis* en campo

Al evaluar la densidad de bacterias del género *Bacillus* en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis*, se presentaron colonias características de *Bacillus*: blancas, circulares, con bordes irregulares, cremosas, transparentes al principio, secas y opacas después (Vos *et al.*, 2011), a los tres días de incubación. En los muestreos hechos 24 h y 5 días después de la aplicación de la bacteria en campo en el mes de octubre (2019), se presentaron colonias típicas en un factor de dilución de 10^3 , en el muestreo 15 días después de la aplicación de la bacteria en campo se presentó la bacteria en el factor de dilución 10^2 (Tabla 4). En enero 2020, en los tres muestreos se identificaron colonias características de *Bacillus* hasta el factor de dilución 10^2 (Tabla 4). En el testigo no se presentaron colonias típicas del género *Bacillus* (Tabla 4). Al contabilizar todos los tipos de colonias bacterianas presentes en los muestreos realizados, en el mes de octubre (2019) únicamente se presentaron bacterias del género *Bacillus* en las

fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* y en los factores de dilución antes mencionados (Tabla 5), en cambio, en enero (2020) en los tres muestreos de fresas tratadas con *B. subtilis* y testigo se presentaron colonias bacterianas de diferentes tipos en el factor de dilución 10^2 (Tabla 5). La prueba Tukey y el análisis de varianza de dos vías confirmaron que el tratamiento influyó significativamente ($P < 0.001$) en las UFC presentes, al considerar tanto colonias típicas de *Bacillus* (Tabla 4), como colonias de bacterias totales (Tabla 5), debido a que, en todos los muestreos, la densidad bacteriana fue mayor en el tratamiento con *B. subtilis* que en el testigo. El tiempo posterior a la aplicación de la bacteria y la interacción tratamiento – tiempo también influyeron en la cantidad de UFC debido a que estas aumentaron al quinto día de la aplicación y después disminuyeron.

Tabla 4. Bacterias con características del género *Bacillus* aisladas de fresas de plantas tratadas en campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748.

	OCTUBRE 2019			ENERO 2020		
Tratamiento	1 d (UFC/mL)	5 d (UFC/mL)	15 d (UFC/mL)	1 d (UFC/mL)	5 d (UFC/mL)	15 d (UFC/mL)
<i>B. subtilis</i>	$9 \times 10^3 \pm 0.5$ A	$17 \times 10^3 \pm 1.7$ A	$1 \times 10^2 \pm 0$ A	$1.8 \times 10^2 \pm 0.1$ A	$4.8 \times 10^2 \pm 0.4$ A	$4.5 \times 10^2 \pm 0.4$ A
Testigo	0 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0 B
Tratamiento		***			***	
Tiempo de cosecha		***			***	
Interacción T x T		***			***	

Tabla 5. Bacterias totales aisladas de fresas de plantas tratadas en campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748.

	OCTUBRE			ENERO		
Tratamiento	1 d (UFC/mL)	5 d (UFC/mL)	15 d (UFC/mL)	1 d (UFC/mL)	5 d (UFC/mL)	15 d (UFC/mL)
<i>B. subtilis</i>	9X10 ³ ± 0.5 A	17X10 ³ ± 1.7 A	1X10 ² ± 0 A	1.8 X10 ² ± 0.1 A	4.8 X10 ² ± 0.4 A	4.5 X10 ² ± 0.4 A
Testigo	0 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0 B	1.1 X10 ² ± 0.05 B	1 X10 ² ± 0 B	2.5 X10 ² ± 0.05 B
Tratamiento		***			***	
Tiempo de cosecha		***			***	
Interacción T x T		***			***	

Medias (± desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; p≤0.05). ., *, **, y *** indican significancia de P ≤ 0.1, P ≤ 0.05, P ≤ 0.01, y P ≤ 0.001 respectivamente. ns = no significancia (Análisis de varianza de dos vías). Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

De acuerdo con el estudio realizado por Punja *et al.* (2016), la densidad bacteriana máxima de *B. subtilis* se encontró en una concentración de 75 a 110 x 10⁴ UFC/cm² en la superficie de tomates individuales, la bacteria se aplicó previamente a una concentración de 1 x 10⁹ UFC/g en tomates de invernadero. A la semana de haber aplicado la bacteria en plantas, la concentración de la bacteria aumentó en la superficie del fruto, en cambio a las dos semanas de la aplicación, las UFC de bacteria disminuyeron y se registró la concentración más baja a las cuatro semanas. Estos registros se realizaron en fruta en poscosecha, y atribuyeron la disminución de concentración de bacterias a varios factores, como la temperatura y pérdida de humedad de las frutas, lo cual pudo reducir la viabilidad de las células bacterianas. Sin embargo, aún a los 16 días de almacenamiento, la concentración de bacteria fue suficiente para seguir manteniendo control sobre hongos en los frutos. Además, la temperatura baja y humedad relativa alta manejadas en el almacenamiento comercial pueden ayudar a que la bacteria se mantenga durante mayor tiempo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, en donde se observó que las UFC/ml aumentaron en el muestreo 5 días después de la aplicación de la bacteria en campo y después disminuyeron ligeramente en el muestreo 15 días después de la aplicación (Tabla 4), aunque se siguió observando control de hongos en las fresas.

Sylla *et al.* (2015), reportaron un incremento significativo en las bacterias totales en frutos de plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* en comparación con el control el primer año de su experimentación (2011). Sin embargo, en el año de 2012 realizaron otro experimento y esta vez no obtuvieron diferencias significativas. Esto lo atribuyeron a que en 2012 se presentaron lluvias frecuentes lo cual pudo “lavar” las plantas y frutos, arrastrando los microorganismos presentes en ellos, también la arquitectura de las plantas puede obstaculizar la aplicación de bacterias a las flores de plantas más pequeñas. En 2011 se encontró un aumento significativo de bacterias formadoras de endosporas en frutos con tratamiento de *B. amyloliquefaciens* en comparación con el control, y nuevamente en 2012 no se encontraron diferencias significativas. Para comprender estas inconsistencias del control biológico en campo, es importante saber que no basta con aplicar el microorganismo antagonista de manera simultánea. Se sugiere tomar en cuenta la biota nativa y factores ambientales, y es preferible proveer protección a la planta mediante la aplicación del antagonista desde la etapa de floración, pues es en esta etapa donde tanto la bacteria como el patógeno se pueden establecer más fácilmente (Sylla *et al.*, 2015). En esta investigación también hubo diferencias entre las concentraciones observadas sobre la superficie de las fresas en las dos temporadas evaluadas. En el mes de enero (2020), se encontró una menor concentración de la bacteria (1×10^2 UFC/ml), esto puede deberse a las temperaturas ambientales o a la competencia con otros microorganismos, ya que en ese tiempo la manipulación de la planta fue más intensiva pues se había realizado un mayor número de cortes del fruto y con mayor frecuencia en comparación con el mes de octubre (2019), en el que prácticamente iniciaba la producción de fresa. La temperatura óptima de *B. subtilis* es aproximadamente 30 a 37 °C, y las temperaturas registradas en los muestreos de enero (2020) fueron más bajas (5 a 28 °C aproximadamente) que las de los muestreos de octubre (2019) (15 a 32 °C aproximadamente) (AccuWeather, 2020). Además, se pudo observar una severidad e incidencia de hongos más alta en el mes de enero, lo cual pudo influir en la densidad de las bacterias.

En el testigo del mes de enero (2020), se pueden observar mayores cantidades de bacterias totales que en octubre (2019), esto se relaciona con lo reportado en el estudio

de Sylla *et al.* (2015), donde en 2012 la cantidad de bacteria total incrementó en la superficie de las frutas provenientes de campo en comparación con el año anterior. En el presente estudio pudo influir la manipulación de plantas en los cortes que fueron más frecuentes en enero que en octubre; debido a la mayor productividad de fresas también se pudo propiciar un mayor esparcimiento de microorganismos, pues los cortes de fresas se realizaron en ambos tratamientos.

En un estudio en el que se realizaron cinco aplicaciones de *Bacillus ginsengihumi* en un viñedo en diferentes etapas, desde inicios de junio hasta agosto en el comienzo y final del florecimiento, antes del cierre de la flor y antes de la cosecha, la densidad de la bacteria con características de la cepa aplicada previamente, después de la primera aplicación y al principio del florecimiento fue alta, de 1×10^6 a 1×10^7 UFC/g, pero fue disminuyendo con el tiempo aún con las próximas aplicaciones. Después del cierre de flor, la concentración se encontraba aproximadamente en 1×10^4 a 1×10^5 UFC/g. En uvas en maduración se encontró una concentración de 1×10^2 a 1×10^4 UFC/g, lo que coincide con los resultados de este estudio, con concentraciones en fresas de 1×10^3 a 1×10^2 UFC/ml. Aunque la concentración de la aplicación inicial en este caso fue mayor que en el estudio mencionado anteriormente (1×10^{12} UFC/ml), los factores del campo pudieron influir en el establecimiento de la bacteria. En el estudio realizado en viñedos se reportó que la concentración de *Bacillus ginsengihumi* se mantuvo estable (1×10^3 UFC/g) en el desarrollo y maduración de las uvas hasta el final de la temporada. También se registró una severidad de *B. cinerea* de 34.7 % en plantas de uva tratadas con *B. ginsengihumi* y 56.7 % en plantas testigo, la alta severidad se atribuyó a que, aunque no hubo lluvias, el viñedo se encontraba en un área cercana a un arroyo lo cual incrementó la humedad relativa que pudo propiciar el crecimiento de hongo (Calvo *et al.*, 2019).

Es importante la presencia de una cantidad suficiente de células viables en el cultivo para un buen control de hongos. En el estudio Calvo *et al.* (2019), compararon la aplicación de la suspensión de células de *B. ginsengihum* con otro preparado al cual se le agregó el sobrenadante con metabolitos de esta bacteria, y se determinó que este último no mejoró la eficacia de la bacteria para reducir la severidad de *B. cinerea*,

de hecho, el preparado con sobrenadante presentó menor concentración de bacterias en flores y uvas, esto relaciona la efectividad de control de la bacteria con los metabolitos que esta produce en el campo, no a los encontrados al momento de su reproducción. Bacterias como *Enterobacter* fueron evaluadas en el viñedo, la cual se encontró en altas concentraciones en campo, pero su eficacia en el control de *B. cinerea* fue baja, por lo tanto, si bien es importante que la concentración del antagonista sea alta, existen otros factores que intervienen en el control de patógenos como la temperatura óptima de cada uno de los microorganismos, la especificidad de la cepa aplicada para el control del patógeno, la actividad de agua y la humedad relativa (Calvo *et al.*, 2019). Aunque la concentración de las bacterias de *B. subtilis* utilizadas en este estudio bajó después de su aplicación, esta pudo seguir protegiendo a las fresas, posiblemente debido a la especificidad de la bacteria hacia algunos hongos y las condiciones ambientales en campo que no afectaron la función de esta como antagonista.

La adherencia de las bacterias antagonistas en frutos se demostró en un estudio en el cual se inocularon uvas por inmersión en una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/ml) de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*) durante 2 min y se enjuagaron con una solución salina para observar la adherencia de la bacteria en la superficie de la fruta a los 5 días; la bacteria se presentó a una concentración de 1×10^4 a 1×10^5 UFC/g, y la mayor se encontró el día 3 (1×10^6 UFC/g). Las diferencias más altas de la enfermedad por hongos entre uvas tratadas con *L. plantarum* y uvas control se observó al cuarto día (Lappa *et al.*, 2018), el cual fue similar al tiempo de almacenamiento donde se encontraron las mayores diferencias entre fresas con tratamiento de *B. subtilis* y fresas testigo del presente estudio. En el mismo estudio se determinó que la colonización de uvas con *L. plantarum* contribuyó a la eliminación o reducción de la infección por hongos, ya que dificulta que colonicen y penetren la superficie para el desarrollo de la infección, también la competencia por nutrientes y la inhibición de metabolitos del hongo pueden dificultar su reproducción, las toxinas de los hongos disminuyeron debido a compuestos ácidos producidos por *L. plantarum* y probablemente por la unión de estas toxinas a la pared celular de las bacterias (Lappa

et al., 2018). También se ha reportado que la aplicación de bacterias antagonistas puede llevar a una reducción en la expresión de ARNm, lo cual provoca cambios en el metabolismo del hongo e influye en el biocontrol y la reducción de producción de micotoxinas (Lappa et al., 2018).

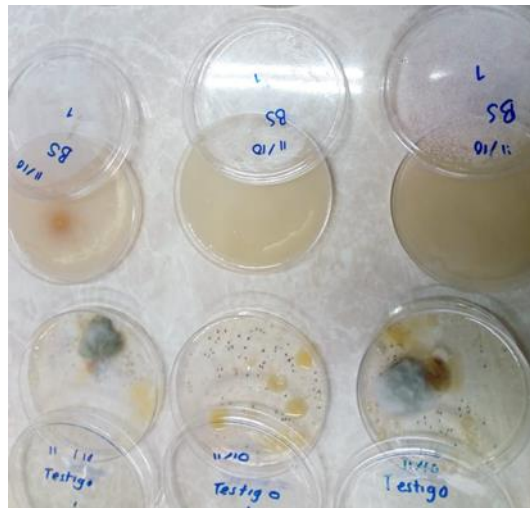


Figura 13. Bacterias y hongos de los tratamientos de fresas del muestreo de octubre 2019. En la parte superior, colonias típicas del género *Bacillus* extendidas en la placa de fresas tratadas con *B. subtilis*. En la parte inferior, presencia de hongos y bacterias (amarillas) nativas de fresas testigo.

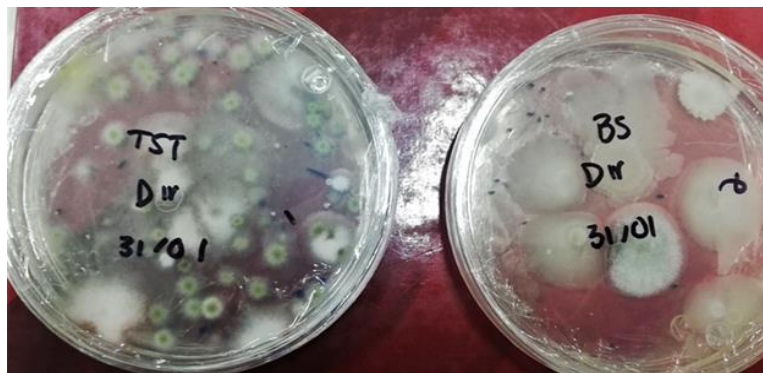


Figura 14. Bacterias y hongos de los tratamientos de fresas del muestreo de enero de 2020. Izquierda) Hongos y bacterias (amarillas) nativas de fresas testigo. Derecha) Colonias típicas del género *Bacillus* de fresas tratadas con *B. subtilis*.

En los trozos de fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* de ambos periodos de muestreo, se presentaron bacterias con características de género *Bacillus*. Las características de las colonias de *Bacillus* pueden variar entre especies, desde texturas húmedas y cremosas a fibrosas o granulares, formas circulares, de rizoide o irregulares, colores que van desde los más comunes que son el crema y blanco, hasta pigmentos menos frecuentes como negros, cafés, anaranjados y rosas (Vos *et al.*, 2011). Según Vos *et al.* (2011), *Bacillus subtilis* se puede distinguir de otras especies debido a que produce colonias blancas, con bordes irregulares, cremosas y húmedas al principio, y secas y ásperas conforme pasan los días, características que coinciden con las colonias que se encontraron en fresas en poscosecha de este estudio. El porcentaje de la presencia de estas colonias fue significativamente mayor en fresas tratadas en comparación a los trozos de fresas testigo (tabla 6). La presencia de colonias del género *Bacillus* en los trozos de fresa fue de hasta un 93.3 % en el mes de octubre (24 h después de la aplicación de *B. subtilis* en las plantas de fresa) y de 100 % (5 días después de la aplicación de *B. subtilis* en las plantas de fresa) en el mes de enero de 2020 (Tabla 6).

En octubre del 2019, los trozos de fresa testigo, en el muestreo 5 días después de la aplicación de *B. subtilis*, presentaron colonias del género *Bacillus*, aunque menor porcentaje que en los trozos de fresas con bacterias (6.6 %), esto se pudo deber a una mala manipulación durante el manejo de los trozos ya que solo se presentaron en ese muestreo en fresas testigo (Tabla 6).

Tanto en los muestreos de octubre (2019) como en enero (2020), el análisis de dos vías indicó que el tratamiento, tiempo después de la aplicación de la bacteria e interacción de ambas variables, influyeron significativamente ($P < 0.001$) en el porcentaje de presencia de bacterias con características de *Bacillus* (Tabla 6). Las fresas sin tratamiento no presentaron bacterias con características de *Bacillus*, por lo

tanto, se infiere que el tratamiento influyó en su presencia. El tiempo de muestreo influyó debido a que se presentaron variaciones en el porcentaje de bacterias en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* en los diferentes tiempos de muestreo. Por lo tanto, la interacción entre ambas variables influyó significativamente en la presencia de bacterias en las fresas.

Tabla 6. Porcentaje de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 con presencia de colonias típicas de *Bacillus*.

Tratamiento	OCTUBRE			ENERO		
	1 d	5 d	15 d	1 d	5 d	15 d
<i>B. subtilis</i>	93.3 ± 0.3 A	86.6 ± 0.4 A	6.6 ± 0.3 A	40.0 ± 0.0 A	100 ± 0.0 A	86.6 ± 0.0 A
Testigo	0 ± 0.0 B	6.6 ± 0.3 B	0 ± 0.00 A	0 ± 0.0 B	0 ± 0.0 B	0 ± 0.0 B
Tratamiento		***			***	
Tiempo de cosecha		***			***	
Interacción T x T		***			***	

Medias (± desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ., *, **, y *** indican significancia de $P \leq 0.1$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, y $P \leq 0.001$ respectivamente. ns = no significancia (Análisis de varianza de dos vías). Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

De acuerdo con la morfología de las bacterias encontradas en los trozos de fresas que fueron tratadas desde campo con *B. subtilis* (colonias blancas, con bordes irregulares, cremosas y húmedas al principio, secas y ásperas conforme pasan los días), es muy probable que pertenezcan a la especie de *B. subtilis*, con un estudio molecular se podría identificar la especie, desafortunadamente, esta identificación no se logró realizar debido a la pandemia. Sin embargo, en un estudio donde se evaluó la distribución, persistencia y adaptación de *B. amyloliquefaciens* CPA-8 en duraznos tratados desde campo, se reportó que las bacterias encontradas en el fruto se identificaron morfológica y molecularmente, y se confirmó que eran *B. amyloliquefaciens* CPA-8. De un total de 1,800 muestras similares morfológicamente a la cepa aplicada, solo 10 dieron un resultado negativo en la identificación molecular, por lo tanto, la identificación morfológica de las bacterias encontradas en poscosecha es confiable mientras se conozcan las características de las colonias formadas por la bacteria antagonista aplicada previamente. En el mismo estudio, se aislaron bacterias 15 días después de la aplicación de los frutos de árboles que rodeaban al árbol tratado

con la bacteria y aunque la densidad fue muy reducida, se reportó que el 100 % de las bacterias aisladas se identificaron como *B. amyliquefaciens*, esto demuestra un buen esparcimiento de *Bacillus* sp. en campo (Vilanova *et al.*, 2018). En este trabajo, la fresas testigo no presentaron bacterias del género *Bacillus*, aun con la constante manipulación, debido a que se procuró evitar asperjar la bacteria hacia la zona de las plantas testigo usando una campana en la salida del aspersor, y la aplicación se realizó dirigida solo a las plantas de los surcos que deberían llevar la bacteria.

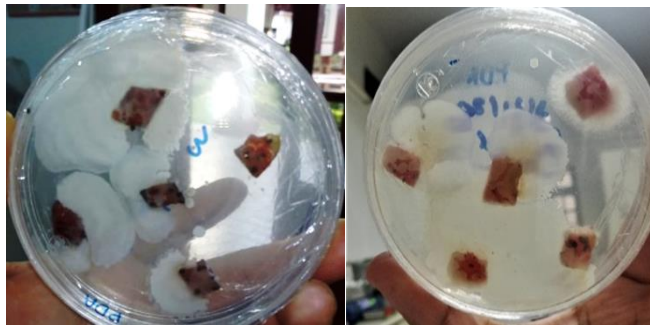


Figura 15. Trozos de fresas con colonias típicas de *Bacillus*. Izquierda) Presencia de *Bacillus* en trozos de fresas tratadas con *B. subtilis* muestreadas en octubre de 2019. Derecha) Presencia de *Bacillus* en trozos de fresas tratadas con la *B. subtilis* muestreadas en enero de 2020.



Figura 16. Colonia típica de bacterias del género *Bacillus* en trozo de fresa tratada con *B. subtilis*.

7.2.2 Presencia e identificación de hongos en la superficie de fresas de los tratamientos

En los dos primeros muestreos de fresa de octubre (2019), se presentó significativamente menor porcentaje de hongos en los trozos de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en comparación con los testigos (tabla 7). En los tres muestreos de fresa de enero (2020), se presentó significativamente menor porcentaje de hongos en trozos de fresas provenientes de plantas tratadas con *B. subtilis* en comparación con los testigos (tabla 7). Estos resultados se relacionan con la presencia de colonias típicas de *Bacillus* en trozos de fresa evaluados (tabla 6), en el tercer muestreo de octubre hubo una baja presencia de bacteria y alta aparición de hongos en los trozos de fresas tratadas con *B. subtilis* (tabla 7). En los trozos de fresas testigo no se presentaron bacterias con características del género *Bacillus* (tabla 6) pero se presentó un porcentaje alto de hongos (tabla 7).

El análisis de dos vías indicó que el tratamiento, tiempo después de la aplicación de *B. subtilis* a las fresas y la interacción entre ambas variables influyeron significativamente ($P < 0.001$) en el porcentaje de hongos presentes en las fresas de octubre 2019 (tabla 7). Sin embargo, en las fresas de enero (2020), únicamente el tratamiento influyó significativamente ($P < 0.001$) en la presencia de hongos, ya que fue menor en las fresas tratadas con *B. subtilis*. Lo anterior, indica que la bacteria influyó en el control de hongos aun cuando se aplicó solo una vez, y también al aplicarla ocho veces en el cultivo.

Tabla 7. Porcentaje de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 con presencia de hongos.

Tratamiento	OCTUBRE			ENERO		
	1 d	5 d	15 d	1 d	5 d	15 d
<i>B. subtilis</i>	6.6 ± 0.3 B	0 ± 0.0 B	80 ± 0.4 A	26.6 ± 0.0 B	60 ± 0.0 B	46.6 ± 0.0 B
Testigo	80 ± 0.4 A	100 ± 0.0 A	100 ± 0.0 A	100 ± 0.0 A	100 ± 0.1 A	100 ± 0.2 A
Tratamiento		***			***	
Tiempo de cosecha		***			ns	
Interacción		***			ns	

Medias (\pm desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ., *, **, y *** indican significancia de $P \leq 0.1$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, y $P \leq 0.001$ respectivamente. ns = no significancia. Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

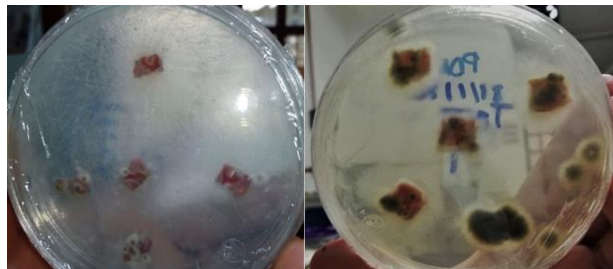


Figura 17. Trozos de fresas con hongos. Izquierda) Presencia de hongos en trozos de fresas testigo muestreadas en octubre 2019. Derecha) Presencia de hongos en trozos de fresas testigo muestreadas en enero 2020.

Se lograron identificar morfológicamente ocho hongos aislados de trozos de fresas de ambos tratamientos. Estos hongos fueron: *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., y *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp. y *Cladosporium* sp (Figura 18), lo cual coincide con lo reportado por Cordero *et al.* (2003), quienes aislaron y purificaron hongos de fresas de un cultivo ubicado en Zamora, Michoacán y reportaron diez hongos: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp., los cuales comenzaron a manifestarse en cámara húmeda a los cuatro días de almacenamiento. Se expuso que los hongos con mayor incidencia fueron *Rhizopus* sp. y *Botrytis* sp., información que concuerda con los hongos con mayor presencia obtenidos en este trabajo (tabla 8).

Aspergillus sp., *Cladosporium* sp. y *Colletotrichum* sp, solamente se encontraron en fresas testigo. *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., *Alternaria* sp., y *Fusarium* sp. se presentaron en ambos tratamientos, pero significativamente con menor frecuencia en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis*. *Penicillium* sp. se presentó en fresas de ambos tratamientos con elevada frecuencia y no hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos, aunque el porcentaje fue menor en fresas tratadas con la bacteria.

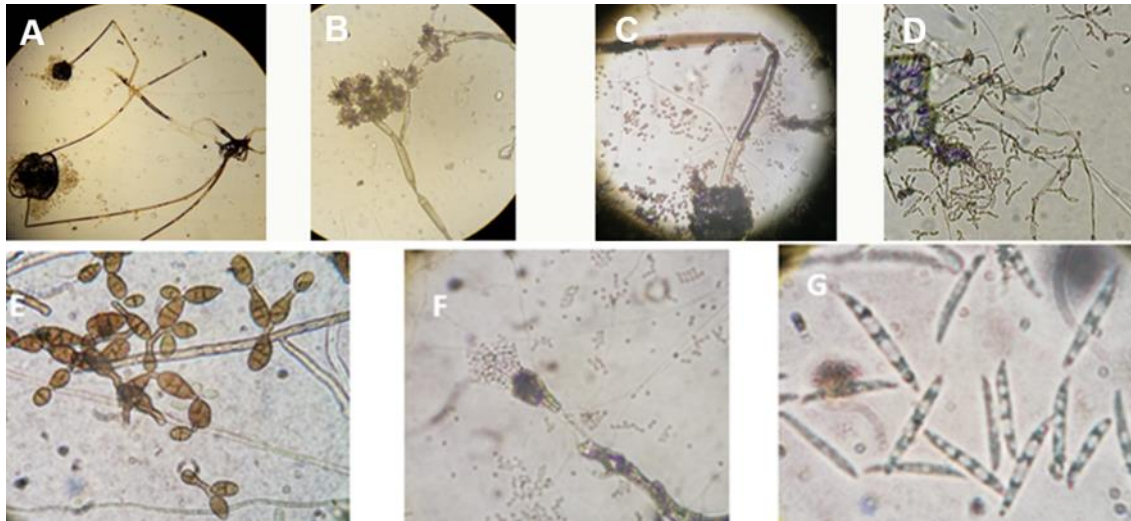


Figura 18. Hongos identificados morfológicamente, aislados de fresas evaluadas. A) *Rhizopus* sp. B) *Botrytis* sp. C) *Aspergillus* sp. D) *Cladosporium* sp. E) *Alternaria* sp. F) *Penicillium* sp. y G) *Fusarium* sp.

El análisis de dos vías indicó que el tratamiento influyó significativamente ($P \leq 0.001$) en la presencia de *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp. en las fresas; dichos hongos se presentaron en menor frecuencia en las fresas tratadas desde campo con *B. subtilis*. El tiempo de muestreo influyó significativamente ($P \leq 0.001$) en la presencia de hongos en fresa como *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. y *Penicillium* sp. y significativamente menos ($P \leq 0.01$) para *Rhizopus* sp., *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp., esto puede indicar que desde la primera aplicación de *B. subtilis* se pudieron controlar estos últimos tres hongos en las fresas. La interacción de tratamiento-tiempo de muestreo, influyó significativamente en la presencia del *Aspergillus* sp. ($P \leq 0.001$) en las fresas e influyó significativamente menos en la presencia de *Rhizopus* sp. ($P \leq 0.05$) y *Alternaria* sp. ($P \leq 0.01$), esto puede deberse a que los tres hongos comúnmente crecen sobre el fruto con facilidad y producen abundantes esporas al desarrollarse, estas pueden ser fácilmente diseminadas durante la manipulación por los cortes de la fresa y, con el tiempo, se incrementa la carga de hongos debido al aumento de la presencia de frutos en campo (Zhou *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, para el caso de *Fusarium* sp. dicha interacción no afecta ya que es un hongo que no se desarrolla con facilidad sobre el fruto, aunque

esté presente y, por lo tanto, sus esporas no se diseminan durante el tiempo con la manipulación por los cortes (Ramírez *et al.*, 2020).

Tabla 8. Porcentaje de frecuencia de los hongos identificados aislados de trozos de fresas provenientes de plantas tratadas en campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748, 20 días después de las cosechas posteriores a la octava aplicación (enero de 2020).

Mes	Tratamiento	Tiempo de cosecha (d)	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.
Enero	<i>B. subtilis</i>	1	0 ± 0 B	13 ± 8 B	0 ± 0 B	86 ± 10 A	0 ± 0 A	28 ± 10 B	0 ± 0 B	0 ± 0.0 A
		5	0 ± 0 B	18 ± 3 B	0 ± 0 B	98 ± 3 A	0 ± 0 A	34 ± 10 B	13 ± 8 B	0 ± 0.0 A
		15	6 ± 0 B	6 ± 0 B	0 ± 0 B	67 ± 0 A	0 ± 0 A	34 ± 0 B	0 ± 0 B	0 ± 0.0 A
	Testigo	1	34 ± 10 A	67 ± 8 A	34 ± 10 A	90 ± 10 A	0 ± 0 A	68 ± 10 A	28 ± 10 A	0 ± 0.0 A
		5	60 ± 10 A	67 ± 10 A	0 ± 0 A	100 ± 0 A	6 ± 10 A	100 ± 0 A	22 ± 9 A	0 ± 0.0 A
		15	43 ± 0 A	47 ± 0 A	6 ± 0 A	85 ± 0 A	0 ± 0 A	88 ± 0 A	0 ± 0 A	6 ± 0.00 A
Tratamiento			***	***	***	*	ns	***	***	ns
Tiempo de cosecha			*	*	***	***	ns	*	***	ns
Interacción T x T			*	ns	***	ns	ns	.	**	ns

Medias (± desviación estándar), letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). ., *, **, y *** indican significancia de $P \leq 0.1$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, y $P \leq 0.001$ respectivamente. ns = no significancia (Análisis de varianza de dos vías). Tiempo de cosecha: 1, 5 y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*.

Con la identificación molecular de los hongos se pudo confirmar la presencia de *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium pinophilum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium* sp. Además, se identificaron otros hongos que se presentaron en fresas testigo muestreadas después de la octava aplicación de *B. subtilis* (enero de 2019), estos fueron: *Macrophomina* sp., *Neopestalotiopsis* sp., y *Lasiodiplodia* sp. La presencia de estos tres últimos hongos fitopatógenos en fresa ha sido reportada. *Macrophomina phaseolina* es un hongo con una amplia gama de hospederos, se encontró en un cultivo de fresa en España, causando la enfermedad llamada “podredumbre carbonosa” (Pastrana *et al.*, 2016), también se reportaron grandes pérdidas en la producción de fresa debido a este hongo en California (Koike

et al., 2013). *Neopestalotiopsis* sp. se encontró en cultivos de fresa en Argentina y en E.U.A (Florida), causando zonas necróticas y coloración rojiza, el hongo se aisló e identificó morfológica y molecularmente, este fue identificado como *Neopestalotiopsis rosae* (Obregón *et al.*, 2018; Baggio *et al.*, 2020). En Turquía, *Lasiodiplodia* sp. se encontró en plantas de fresa, se observó marchitamiento y muerte de las plantas con decoloración necrótica en las coronas, el hongo se aisló e identificó morfológica y molecularmente como *Lasiodiplodia theobromae* (Yildiz *et al.*, 2014). Oliveira *et al.* (2019) reportaron por primera vez la presencia de este hongo en E.U.A. en fresas de cultivos en Florida que presentaron síntomas como coloración negra, presencia de micelio y producción de conidios aceptados hialinos, y también identificaron molecularmente dicho hongo como *Lasiodiplodia theobromae*.

El control por especies del género *Bacillus* sobre los ocho hongos identificados morfológicamente ha sido demostrado en diversos estudios. En este trabajo la frecuencia de *Rhizopus* sp. se redujo significativamente en un 100 %, a las 24 h y 5 días después de la aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 y un 86.2 % a los 15 días en el muestreo del mes de enero (Tabla 8). En una investigación realizada por Kulimushi *et al.* (2018), la incidencia de la enfermedad causada por *Rhizopus stolonifer* en mazorcas de un cultivo de maíz se redujo con la aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens* en campo en un 84 %. Este control lo atribuyeron a la liberación de iturinas y fengicinas por parte de la bacteria y a la inducción de defensa de la planta debido a la percepción de surfactina. En el mismo estudio se evaluó la incidencia y severidad de los hongos en hojas y mazorcas que crecieron en un lugar con temperatura media de 20°C, y en otro donde la temperatura osciló de 30 a 32 °C, en los dos sitios se redujo la incidencia y severidad en ambas partes de la planta, pero el control de hongos fue mayor a temperatura de 30 a 32 °C; se supuso que probablemente fue debido a que esa temperatura favorece al desarrollo de la bacteria y dichas diferencias pueden estar relacionadas con la variación de las características fisicoquímicas del suelo, humedad y la temperatura que puede favorecer al patógeno o al microorganismo antagonista. En un experimento realizado *in vitro* se observó una reducción del radio de germinación de esporas de *R. stolonifer* de un 80 % con la

confrontación de *B. subtilis* en comparación con el control al que únicamente se inoculó *R. stolonifer*, en este estudio se determinó que *B. subtilis* provocó deformaciones en la estructura del hongo, como degradación de las hifas y necrosis en el micelio, también se reportó que algunos péptidos producidos por *Bacillus* sp. pueden interferir en la respiración celular del hongo actuando en la cadena de transporte de electrones, e incluso pueden interrumpir la transcripción y replicación de ADN (Zhou *et al.*, 2011).

La frecuencia de *Botrytis* sp., en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748, presentaron una reducción significativa a las 24 h, 5 días y 15 días de la aplicación de la bacteria, 80 %, 72.5 % y 87.1 % respectivamente (Tabla 8). *Botrytis cinerea* se considera el principal patógeno en fresas en etapa de poscosecha y uno de los más importantes en la agricultura debido a su corto ciclo de vida y rápida reproducción (Petrasch *et al.*, 2019; Calvo *et al.*, 2019). El control de *Botrytis cinerea* con bacterias del género *Bacillus* ha sido demostrado en diversos estudios, por ejemplo, el de Calvo *et al.* (2019), en el cual se evaluaron varias especies de *Bacillus* en distintos viñedos, *Bacillus ginsengihumi*, *B. amyloliquefaciens* (Amylo-X) y *B. subtilis* (Serenade Max) en una concentración de 5×10^7 UFC/ml, 5.13×10^{10} UFC/g y 5.13×10^{10} UFC/g respectivamente, y lograron reducir la incidencia de *B. cinerea* en uvas al momento de ser cosechadas en un 49 %, 58 % y 54 % respectivamente. Las cepas de *Bacillus* evaluadas demostraron ser efectivas en el control de *B. cinerea* en campo debido al mecanismo de antibiosis y probablemente a la competencia por nutrientes. Sin embargo, la eficacia depende de características específicas de cada cepa, por lo que es necesario realizar experimentación en el sitio de interés (Calvo *et al.*, 2019).

La frecuencia de *Aspergillus* sp. en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 se redujo un 100 % 24 h y 15 días después de la aplicación de *B. subtilis*, a los 5 días de la aplicación no se presentó en ninguno de los tratamientos (Tabla 8). Especies de *Aspergillus*, como *A. flavus* son de gran importancia en poscosecha ya que se presenta generalmente en la etapa de almacenamiento en donde los alimentos comienzan a adquirir mayores grados de humedad (Zhang *et al.*, 2008). Bacterias como *Lactobacillus plantarum* han demostrado ser controladoras de *Aspergillus*

carbonarius, experimentos demostraron que la bacteria puede reducir el crecimiento del hongo *in vitro* hasta un 88 %, y redujo la producción de toxinas en un 100 %. En experimentos *in vivo*, la infección se redujo un 60 % en uvas previamente tratadas con *L. plantarum* por inmersión en una solución (1×10^8 UFC/ml) en las que posteriormente se realizó una herida y se sumergieron en una solución de *A. carbonarius* (1×10^6 esporas/ml), y la infección se redujo 36.6 % en uvas tratadas sin herida, el mecanismo de acción de las bacterias para el biocontrol del hongo fue la colonización de las frutas y cambios en el pH de estas (Lappa *et al.*, 2018).

Penicillium sp. se presentó en las fresas de ambos tratamientos (Tabla 8), es un hongo oportunista capaz de infectar fresas dañadas ya que difícilmente penetran los tejidos de las plantas o frutas, pero pueden dañar fácilmente fresas previamente infectadas con otros hongos como *B. cinerea* que provocan senescencia (Judet *et al.*, 2010). En el estudio realizado por Kulimushi *et al.* (2018) en cultivos de maíz, *B. amyloliquefaciens* redujo significativamente la severidad por *Penicillium variable* en mazorcas un 61 % y el control fue menor en comparación con el que presentó sobre *R. stolonifer* (84 %) el cual también fue significativo respecto a mazorcas control.

Es importante mencionar que la identificación morfológica de los hongos se realizó una vez que se lograron producir las esporas, que en promedio fue a los 20 días después del procesamiento de los trozos de fresas sobre PDA y su almacenamiento a temperatura ambiente, con el tiempo de almacenamiento pueden crecer los hongos oportunistas como son consideradas las especies de *Penicillium*, una vez que la el antagonista desciende el oportunista puede proliferar, y la infección por esta especie es aún más severa que la de otros debido a su capacidad de producir micotoxinas (Wang *et al.*, 2016).

En un estudio *in vitro* realizado por Wang *et al.*, (2016) enfocado al control de *Penicillium expansum*, *B. subtilis* no logró extenderse a lo largo de la placa, pero si se observaron halos de inhibición, además se evaluaron las bacterias antagonistas *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhodobacter sphaeroides* en experimentos en cultivos en los cuales se dejó crecer *P. expansum* antes de agregar el antagonista, estas dos

bacterias mostraron control del hongo, en cambio, *B. subtilis* indujo un ligero incremento en el crecimiento de micelio, probablemente debido a la respuesta de defensa del hongo ante la bacteria, su resistencia y la capacidad de su especie para desarrollar la infección. En el mismo estudio, al dejar crecer primero al antagonista para posteriormente inocular el hongo, *B. subtilis* demostró el mejor efecto de control sobre *P. expansum* comparado con *A. tumefaciens* y *R. sphaeroides*. *Penicillium* sp. produce una toxina llamada Patulina, por lo tanto, su control puede ser más complicado y depende de la resistencia de la cepa antagonista a esta micotoxina (Wang *et al.*, 2016).

El pH bajo favorece la capacidad de infección de *P. expansum*, y se ha demostrado que *B. subtilis* puede aumentar el pH en frutas como las manzanas inhibiendo la enfermedad causada por este hongo además de competir por espacio y nutrientes (Wang *et al.*, 2016). También se han evaluado las combinaciones de métodos de control para inhibir de manera más efectiva a *Penicillium* sp. En un estudio realizado por Spadaro *et al.* (2004) se evaluó la efectividad de la levadura *Metschnikowia pulcherrima* individual y combinada con métodos químicos y térmicos para determinar su eficiencia en el control de *P. expansum* en manzanas. A temperatura ambiente, el tratamiento más efectivo contra el moho azul causado por *Penicillium expansum* en manzanas, fue la combinación de bicarbonato de sodio y el antagonista, que redujo la enfermedad un 57.7 %, ya que, como se reportó en el estudio realizado por Wang *et al.* (2016), se requiere evitar los pH bajos en frutas ya que son favorables para las especies de *Penicillium*. Por si sola, *M. pulcherrima* redujo la enfermedad en menor porcentaje (27.6 %). En dicho estudio, los tratamientos con agua caliente a 50 °C y la posterior aplicación de la bacteria, redujeron la severidad del patógeno un 29.2 % a temperatura ambiente, y 38.2 % a temperatura de refrigeración. Se determinó que el antagonista en este caso fue altamente eficiente contra *B. cinerea*, pero mostró menor control sobre *P. expansum* que, debido a la producción de micotoxinas es más severo, además, la infección por *P. expansum* depende de factores como el nivel de madurez de la fruta (Spadaro *et al.* 2004).

Otros factores por los cuales *Penicillium* puede representar un problema en poscosecha, es que algunas cepas soportan temperaturas bajas, hasta de -4.4 °C y crecen a una actividad de agua (aw) hasta de 0.856, menor que el valor de aw al que crecen hongos como *B. cinerea*, lo cual le da oportunidad de infectar fresas maduras con mayores contenidos de azúcares, aunque estas temperaturas y aw varían según la cepa y el medio en que se desarrolle (Spadaro *et al.*, 2004; Judet *et al.*, 2010).

Cladosporium sp. se presentó en una mínima cantidad (6 %) en las fresas testigo del segundo muestreo de enero (Tabla 8), mientras que en las fresas del tratamiento con la bacteria no se presentó en ninguno. El control de *Cladosporium* sp. con *B. subtilis* se ha demostrado en estudios previos, como el de Wang *et al.* (2018), donde se realizaron experimentos con la inoculación de *B. subtilis* y *Cladosporium fulvum* en semillas de tomate y se evaluó la planta 15 días después de ser plantada en macetas, la bacteria redujo el “moho de la hoja” causado por *Cladosporium fulvum* un 72 %. En filtrados con la bacteria y el hongo, *B. subtilis* redujo el micelio un 94.4 % en comparación con el control únicamente inoculado con *C. fulvum* (Wang *et al.*, 2018).

La frecuencia de *Fusarium* sp. se redujo significativamente en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 a las 24 h, 5 días y 15 días de la aplicación un 58.5 %, 65.7 % y 61.1 % respectivamente (Tabla 8). Se ha demostrado el control de *Fusarium oxysporum* por microorganismos antagonistas como *Bacillus paralicheniformis* y *Trichoderma asperelloides*, estos redujeron el porcentaje de la enfermedad en plantas de tomate un 75 % y 66.7 % respectivamente. Se reportó que la aplicación individual de los antagonistas controló mejor a *F. oxysporum* en comparación con la aplicación combinada, que solo lo redujo un 16.7 %, esto se debe probablemente a la competencia entre ambos microorganismos de biocontrol por espacio y nutrientes (Ramírez *et al.*, 2020). Se han reportado mecanismos de control relacionados con el antagonismo de especies de *Bacillus* sp. contra *Fusarium* sp., como los antibióticos producidos por la bacteria, entre ellos la fengicina y la producción de enzimas hidrolíticas como la glucanasa y proteasa, que pueden provocar deformaciones en el micelio (Zhao *et al.*, 2014; Cazorla *et al.*, 2007).

Al igual que con otros hongos, *Bacillus* sp. tiene un mejor control sobre especies como *Fusarium oxysporum* si es aplicada como tratamiento preventivo, en comparación con una inoculación simultánea con el hongo o como tratamiento curativo. Experimentos en semillas de manzana demostraron que *B. subtilis* redujo la severidad de *F. oxysporum* un 92.3 % al inocular la bacteria tres días antes que el hongo, mientras que la reducción con la aplicación simultánea de ambos microorganismos fue de 80 %, y con la aplicación previa del hongo, tres días antes de la inoculación de la bacteria, el porcentaje de reducción de la severidad fue mucho menor (54.8 %) (Ju *et al.*, 2014).

En la frecuencia de *Alternaria* sp. en fresas tratadas desde campo con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 también se observó una reducción del 100 % y el 40 % después de 24 h y 5 días de aplicar la bacteria (Tabla 8). En el muestreo a los 15 días de la aplicación no se presentó este hongo en ninguno de los dos tratamientos probablemente debido a que fue el muestreo más reciente y el hongo requiere más tiempo para desarrollarse. Ramírez *et al.* (2020), también reportaron el control de *Alternaria alternata* por *B. paralicheniformis*, que redujo la enfermedad causada por *A. alternata* (tizón temprano) en hojas de plantas de tomate de invernadero un 53.8 %. Además, se determinó que el incremento de enzimas como las peroxidases y la alta producción de fitohormonas están relacionadas a los agentes de biocontrol del género *Bacillus* y benefician a la planta en la respuesta de defensa contra patógenos, lo que provoca una reducción en la presencia de estos microorganismos patógenos en productos en poscosecha (Ramírez *et al.*, 2020).

Por último, *Colletotrichum* sp. solamente se presentó en fresas testigo después de 15 días de la aplicación de *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 en un 5.6 % (Tabla 8). En el tratamiento con la bacteria no se presentó en ninguno de los muestreos. *Bacillus atrophaeus* ha sido evaluada como controladora de *Colletotrichum gloeosporioides*, en un filtrado se inhibió la germinación de esporas un 94.6 %, y en el 100 % de las esporas que lograron germinar se observaron anomalías. En invernadero, la antracnosis del álamo causada por *Colletotrichum gloeosporioides* se redujo significativamente en hojas (27.1 %) en las que se aplicó una suspensión de *Bacillus atrophaeus* (1×10^9 UFC/ml) junto con *C. gloeosporioides* (1×10^5 esporas/ml) en comparación con hojas

a las que solo se les aplicó el patógeno (1×10^5 esporas/ml). Los compuestos antimicrobianos producidos por el género *Bacillus* como la iturina A, pueden provocar deformaciones en la pared celular del hongo, en este caso *C. gloeosporioides* y, por lo tanto, en toda su estructura (Huang *et al.*, 2015; Furuya *et al.*, 2011).

8 CONCLUSIONES

- *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 aplicada en fresas desde campo redujo significativamente la incidencia y severidad de hongos fitopatógenos en fresas en etapa de poscosecha. Una u ocho aplicaciones de *B. subtilis* en fresas desde campo influyen significativamente en la reducción de la severidad e incidencia de hongos en las fresas en poscosecha.
- *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 aplicada en fresas desde campo redujo el deterioro y decaimiento en fresas en etapa de poscosecha. Una u ocho aplicaciones de *B. subtilis* en las fresas desde campo, influyeron significativamente en la reducción del deterioro de la fresa en poscosecha. Después de ocho aplicaciones de *B. subtilis* desde campo en la fresa, se redujo significativamente el decaimiento de la fresa en poscosecha.
- Se confirmó la presencia de bacterias del género *Bacillus* sobre la superficie de las fresas tratadas con *B. subtilis* GOS 01 B- 67748.
- Con una u ocho aplicaciones de *B. subtilis* GOS 01 B- 67748 en las fresas desde campo se redujo significativamente la presencia de hongos como: *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus* sp. en las fresas en poscosecha. Aplicar *B. subtilis* desde campo influyó significativamente en su reducción en poscosecha.

9 REFERENCIAS

- Adesemoye, A. O., Obini, M., & Ugoji, E. O. (2008). Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 423-426.
- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. 635. Harcourt/Academic Press, USA.
- Alzamora, S., Guerrero, S., Nieto, A., & Vidales, S. (2004). Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. FAO. Mejía. Italia.
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J., & Peres, N. A. (2020). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, (ja).
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi (No. Ed. 4). *American Phytopathological Society* (APS Press), p. 218.
- Cai, Z., Yang, R., Xiao, H., Qin, X., & Si, L. (2015). Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 52-58.
- 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, 105.
- Cano, M. A. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263-276.
- Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1950-1959.
- Chaves, N., & Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía costarricense*, 28(2), 73-85.

- Chávez I.F. (2011). *Biocontrol de Rhizopus stolonifer en frutos de zarzamora (Rubus fruticosus) empleando microbiota nativa, asociada a la planta*. [Tesis de maestría, IPN]. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8008/1/Tesis%20Completa.pdf>
- Cordero, M. D. L. F., Morales, M. D. J. Y., Angel, D. N., & Gálvez, G. V. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 285-291.
- De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., & Melgarejo, P. (2012). Use of biofungicides for controlling plant diseases to improve food availability. *Agriculture*, 2(2), 109-124.
- Delgado, M. J., Herrera-Guillén, D. F., Medina-Barragán, L. M., & Corredor-Gómez, J. P. (2017). Implementación de un sistema de procesamiento de imágenes integrado con Raspberry PI 2B para reconocimiento y recolección de fresas maduras. *Revista Politécnica*, 13(25), 75-85.
- Feliziani, E., Landi, L., & Romanazzi, G. (2015). Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate polymers*, 132, 111-117.
- Furuya, S., Mochizuki, M., Aoki, Y., Kobayashi, H., Takayanagi, T., Shimizu, M., & Suzuki, S. (2011). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6), 705-720.
- Gaitán, J. B. M., Ferrucho, R. L., & Herrera, J. G. Á. (2014). Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria sp.*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 44-56.
- Huang, H., Wu, Z., Tian, C., Liang, Y., You, C., & Chen, L. (2015). Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of microbiology*, 65(3), 1361-1371.
- Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Jiang, H., Liu, P., Yang, T. & Liu, X. (2014). Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium sp.* in apple seedlings. *Annals of microbiology*, 64(1), 377-383.
- Judet-Correia, D., Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2010). Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium*

- expansum* on grape berries. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 106-113.
- Karabulut, O. A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., & Droby, S. (2004). Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 14(5), 513-521.
- Khedher, S. B., Kilani-feki, O., Dammak, M., Jabnoun-khiareddine, H., Daami-remadi, M., & Tounsi, S. (2015). Comptes Rendus Biologies Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus - Biologies*, 338(12), 784–792.
- Koike, S. T., Gordon, T. R., Daugovish, O., Ajwa, H., Bolda, M., & Subbarao, K. (2013). Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *International Journal of Fruit Science*, 13(1-2), 76-83.
- Kulimushi, P. Z., Basime, G. C., Nachigera, G. M., Thonart, P., & Ongena, M. (2018). Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 1-14.
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems* (pp. 37-59). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8), 493–499.
- Kurniawan, O., Wilson, K., Mohamed, R., & Avis, T. J. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological control*, 126, 136-141.
- Lappa, I. K., Mparampouti, S., Lanza, B., & Panagou, E. Z. (2018). Control of *Aspergillus carbonarius* in grape berries by *Lactobacillus plantarum*: A phenotypic and gene transcription study. *International journal of food microbiology*, 275, 56-65.
- Latorre, B. (2002a). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Ciencia e investigación agraria*, 29(2), 67-71.

- Latorre, B. (2002b). Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e investigación agraria*, 29(3), 145-151.
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., & López-Gúzman, G. G. (2017). Poscosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(SPE19), 4075-4087.
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., 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.
- NMX-FF-062-2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fruta fresca. Fresa (*Fragaria x ananassa*, Dutch). Especificaciones. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994.
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., & Kirschbaum, D. S. (2018). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. *Plant disease*, 102(9), 1856-1856.
- Oliveira, M. S., Wang, N. Y., Marin, M. V., & Peres, N. A. (2019). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*/N. ribis species Complex Causing Fruit Rot on Strawberry in the United States. *Plant Disease Notes*.
- Oregel-Zamudio, E., Angoa-Pérez, M. V., Oyoque-Salcedo, G., Aguilar-González, C. N., & Mena-Violante, H. G. (2017). Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Scientia horticulturae*, 214, 273-279.
- Ortega Anta, R.M. (2015). Hortalizas, verduras, frutas y derivados. *Instituto de formación continua IL3, Universidad de Barcelona*, pp. 1-28.
- Palou, L., Ali, A., Fallik, E., & Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant-and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 41-52.

- Pastrana, A. M., Basallote-Ureba, M. J., Aguado, A., Akdi, K., & Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 109-120.
- Pérez, M.N.; Flores, P.J.; García, V.L. y V.C. Lozano. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 13:1-9pp.
- Petrasch, S., Knapp, S. J., Van Kan, J. A., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*, 20(6), 877-892.
- Plascencia-Tenorio, R. I., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L. F., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G., & Angoa-Pérez, M. V. (2012). Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai*, 8(3), 103-110.
- Pontón, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos. Bilbao: *Revista Iberoamericana de Micología*, pp.38.
- Punja, Z. K., Rodríguez, G., & Tirajoh, A. (2016). Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop Protection*, 84, 98-104.
- Ramírez, A. R., Sánchez, E. R., Chimal, C. Y., & Chan, M. D. (2011). Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15(2), 117-121.
- Ramírez, J. D., Aristizabal, I. D., & Restrepo, J. I. (2013). Conservación de mora de castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae*, 20(3), 172-183.
- Ramírez-Cariño, H. F., Guadarrama-Mendoza, P. C., Sánchez-López, V., Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Reyes, T., Dunlap, C. A., & Valadez-Blanco, R. (2020). Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(9), 1247-1261.

- 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.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R. (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2230-2234.
- Rudrappa, T., Czymbek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3), 1547-1556.
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. J. (2016). Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2), 133-148.
- Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2004). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2), 141-151.
- Sylla, J., Alsanius, B. W., Krüger, E., & Wohanka, W. (2015). Control of *Botrytis cinerea* in strawberries by biological control agents applied as single or combined treatments. *European journal of plant pathology*, 143(3), 461-471.
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larqué-Saavedra, A., & Perez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular biotechnology*, 33(1), 67-70.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological research*, 182, 31-39.

- Valencia, S., Guevara, J., Villaplana, R. (2016). Hongos causantes de podredumbres en la poscosecha de mora (*Rubus glaucus*): aislamiento, identificación, y evaluación del género más agresivo. *Vitae*, 23, S769.
- Velázquez-del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Guerra-Sánchez, M. G., & Amora-Lazcano, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), 49-55.
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L. & Lemoine, M. C. (2004). Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, 27(3), 243-258.
- Vilanova, L., Teixidó, N., Usall, J., Balsells-Llauradó, M., Gotor-Vila, A., & Torres, R. (2018). Environmental fate and behaviour of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 after preharvest application to stone fruit. *Pest management science*, 74(2), 375-383.
- Villa, P., Alfonso, I., Rivero, M. J., & González, G. (2007). Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(1).
- Villarreal, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media, 21-128.
- Wang, X., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2013). Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *International journal of food microbiology*, 164(2-3), 141-147.
- Wang, Y., Yuan, Y., Liu, B., Zhang, Z., & Yue, T. (2016). Biocontrol activity and patulin-removal effects of *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* and *Agrobacterium tumefaciens* against *Penicillium expansum*. *Journal of applied microbiology*, 121(5), 1384-1393.

- Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J. & Wang, A. (2018). A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* cooke and promote the growth of seedlings. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1371.
- Watanabe, T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Florida, E.U.A, *CRC press*, p.399.
- Wei, F., Hu, X., & Xu, X. (2016). Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. *Scientific Reports*, 6 (February), 1–9.
- Wu, L., Shang, H., Gu, H., & Zheng, J. (2019). Bacterial iturins mediate biocontrol activity of *Bacillus* sp. against postharvest pear fruit-rotting fungi. *Journal of Phytopathology*, 167(9), 501-509.
- Yáñez, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological control*, 60(3), 280–289.
- Yildiz, A., Benlioglu, K., & Benlioglu, H. S. (2014). First report of strawberry dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Plant Disease*, 98(11), 1579-1579.
- Zamarrón, K. F. R., Cabrera, L. E. P., & Carrillo, R. E. R. (2014). Quitosanos de *Cherax quadricarinatus* utilizados como recubrimientos comestibles sobre frutos de fresas mínimamente procesadas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 2(1), 36-43.
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Cao, J., & Meng, R. (2007). Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40(2), 287-292.
- Zhang, T., Shi, Z. Q., Hu, L. B., Cheng, L. G., & Wang, F. (2008). Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 783-788.
- Zhang, S., Zheng, Q., Xu, B., & Liu, J. (2019). Identification of the fungal pathogens of postharvest disease on peach fruits and the control mechanisms of *Bacillus subtilis* JK-14. *Toxins*, 11(6), 322.

Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J., & Fan, S. (2014). *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of basic microbiology*, 54(5), 448-456.

Zhou, X., Lu, Z., Lv, F., Zhao, H., Wang, Y., & Bie, X. (2011). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain fmbj on the postharvest pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Journal of food science*, 76(5), M254-M259.

REFERENCIAS WEB

AccuWeather (2020). Tiempo mensual en Zamora de Hidalgo, Michoacán, México. Disponible en: <https://www.accuweather.com/es/mx/zamora-de-hidalgo/234022/january-weather/234022?year=2020>

Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). Manual Fresa. Disponible en: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14312/Fresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

FAOSTAT (2018). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

INFOAGRO (2007). Disponible en: https://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/fresas.htm

Manual de Producción de Fresa en Coalcomán Michoacán (2018). Disponible en: <https://www.itscoalcoman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL%20PARA%20CULTIVO%20DE%20FRESA%20EN%20COALCOMAN.pdf>

SADER (2018). Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/michoacan/articulos/michoacan-se-mantiene-en-primer-lugar-a-nivel-nacional-en-produccion-de-fresa?idiom=es>

SAGARPA (2016). Planeación agrícola nacional. Disponible en:
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>