



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Laboratorio de Diversidad Genómica

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS
FÚNGICOS QUE AFECTAN A LAS BERRIES
POSTCOSECHA Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS
ANTAGONISTAS PARA SU BIOCONTROL**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. LUZMARIA RAQUEL MORALES CEDEÑO

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Director de Tesis:

D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Morelia, Michoacán, noviembre de 2019.

“Para alcanzar el conocimiento solamente tienes que experimentar.”

Albert Einstein.

Agradecimientos

Es grato para mi reconocer a las personas y a las instituciones que han contribuido de alguna manera en mi formación académica y de manera indirecta en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) agradezco la beca otorgada. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que ha sido mi casa de estudios desde el bachillerato y al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas que ha contribuido positivamente en mi formación académica y profesional.

Agradezco a mi director de tesis el D.C. Gustavo Santoyo, por la paciencia, la confianza y apoyo para la realización de este proyecto.

A mi comité sinodal, por sus valiosos comentarios, aportaciones y buena disposición para la mejora de este trabajo.

Mis compañeros del laboratorio de Diversidad Genómica: Miguel, Daniel, Aurora, Elizabeth, y Adrián. Sus bromas, ocurrencias, apoyo y convivencia también fueron parte importante de este proceso.

También a mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana: Vicente, Christian, Idolina, Ramiro y Hanna (aunque no pertenece de manera oficial a este laboratorio y sólo nos visitaba también llegó a brindarme ánimo y apoyo).

Todos tienen grandes cualidades y juntos forman un gran equipo, es un gusto para mí haber formado parte de él.

Y por supuesto agradezco a mi familia el apoyo incondicional que me han brindado durante mi vida y la comprensión en todos mis malos ratos.

Índice

Resumen	7
Abstract.....	8
1.-Introducción	9
1.1 Hongos como principales agentes causales de enfermedades postcosecha	9
1.2 Uso de fungicidas sintéticos para controlar el decaimiento postcosecha	9
1.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal como alternativa al uso de fungicidas químicos	10
1.4 Modos de acción de los antagonistas microbianos.....	10
1.4.1 Competencia por espacio y nutrientes.....	10
1.4.2 Antibiosis	11
1.4.3 Resistencia inducida	11
1.4.4 Parasitismo directo.....	12
1.4.5 Biofilm y Quorum Sensing	12
1.5 Criterios para seleccionar un microorganismo antagonista ideal	13
1.6 Métodos de aplicación de los antagonistas microbianos	13
2.-Antecedentes	14
2.1 Importancia económica de la producción de berries en México y en el estado de Michoacán	14
2.2 Microorganismos antagonistas utilizados contra patógenos postcosecha:.....	15
2.3 <i>Bacillus</i> sp. E25 y <i>Bacillus</i> sp. CR71 como microorganismos que inhiben el crecimiento del hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i>	15
2.4 Cepas bacterianas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> inhiben el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y reducen signos de enfermedad en plantas de <i>Medicago truncatula</i>	18
2.5 <i>Trichoderma</i> spp. como agente biocontrol de <i>Penicillium digitatum</i> en postcosecha	22
2.6 <i>Rahnella aquatilis</i> B16C destaca entre diversos endófitos como bacteria antagonista.....	24
3.-Justificación	26
4.-Hipótesis	27
5.-Objetivo general.....	28
6.-Objetivos particulares	28
7.- Estrategia experimental.....	29
8.-Materiales y Métodos.....	30
8.1 Medición y observación del decaimiento postcosecha en fresas, zarzamoras y arándanos	30
8.2 Aislamiento de hongos causantes del decaimiento postcosecha.....	30

8.3 Aislamiento de nuevos microorganismos antagonistas.....	30
8.4 Extracción de DNA de los microorganismos aislados:	30
8.4.1 PCR para la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) del gen ribosomal 18S para la identificación de hongos.....	31
8.4.2 PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S para la identificación de bacterias....	31
8.5 Identificación de los microorganismos aislados.....	31
8.6 Postulados de Koch para corroborar los índices de infección	32
8.7 Ensayos de antagonismo entre los microorganismos antagonistas aislados de frutillas, <i>Pseudomonas fluorescens</i> UM270, <i>Bacillus toyonensis</i> COPE52, <i>Bacillus</i> sp. E25 y <i>Bacillus</i> sp. CR71 (cepas antagonistas ya caracterizadas) contra los patógenos fúngicos aislados....	32
8.7.1 Ensayos de inhibición por compuestos difusibles.....	33
8.7.2 Ensayos de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOCs):	33
8.7.3 Ensayos de inhibición con <i>Trichoderma</i> sp. 4AF por compuestos orgánicos volátiles y en co-inoculación directa con los patógenos postcosecha	33
8.8 Visualización del daño al micelio ocasionado a los patógenos fúngicos por los microorganismos antagonistas utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB):.....	34
8.9 Análisis estadístico	34
9.-Resultados.....	35
9.1 Medición y observación del decaimiento postcosecha en fresas, zarzamoras y arándanos	35
9.2 Aislamiento e identificación de patógenos fúngicos que afectan a las berries postcosecha (fresa, arándano y zarzamora):.....	38
9.2.1 Análisis filogenético de los hongos aislados.....	39
9.3 Aislamiento e identificación de nuevos microorganismos antagonistas	44
9.3.1 Identificación de los microorganismos antagonistas aislados.....	46
9.4 Índices de infección ocasionados por hongos no reportados como principales patógenos postcosecha de berries	47
9.5 Efecto de los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresas	49
9.5.1 Efecto de los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamoras y arándanos	51
9.6 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresas	52
9.6.1 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamoras y arándanos.....	53
9.6.2 <i>Rahnella aquatilis</i> SER3 como agente biocontrol de hongos postcosecha.....	54

9.7 Ensayos de <i>Trichoderma</i> sp. 4AF en co-inoculación directa con los principales patógenos postcosecha aislados	56
9.7.1 Ensayos de antagonismo por compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i> sp. 4AF contra los principales patógenos postcosecha aislados	58
9.8 Visualización del daño al micelio ocasionado a los patógenos fúngicos por los microorganismos antagonistas utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB)	59
10.- Discusión	60
11.- Conclusión.....	63
12.- Perspectivas.....	64
13.- Referencias	65
14.- Anexos: Publicaciones	70

Resumen

Los patógenos fúngicos son los principales agentes causales de enfermedades postcosecha de frutas y vegetales. Para evitar o disminuir estos patógenos fúngicos, se utilizan fungicidas químicos que pueden dañar el ambiente y la salud del consumidor. Por lo tanto, se han buscado alternativas más seguras y ecológicas para evitar el deterioro postcosecha causado por agentes fúngicos. Una de estas alternativas es el uso de microorganismos que, por medio de distintos mecanismos de acción como: competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, inducción de respuesta de defensa, parasitismo directo, etc., pueden evitar el crecimiento de hongos patógenos de frutas y vegetales. Michoacán es uno de los mayores productores de berries del país, por lo cual los principales objetivos de este trabajo son: identificar patógenos fúngicos que afecten a las berries postcosecha (fresas, zarzamoras y arándanos) y evaluar bacterias antagonistas para su biocontrol. Se aislaron 20 hongos que deterioraron la calidad de berries, la mayoría de ellos pertenecen a los principales patógenos postcosecha de varias frutas y vegetales, también se lograron aislar dos microorganismos antagonistas (*Rahnella aquatilis* SER3 y *Trichoderma* sp. 4AF) que fueron evaluados junto con otras cepas bacterianas ya caracterizadas para demostrar su capacidad de biocontrol contra los hongos aislados. Los resultados mostraron que los microorganismos antagonistas que fueron aislados de berries, así como la bacteria *Pseudomonas fluorescens* cepa UM270 son capaces de inhibir significativamente el crecimiento de los principales patógenos postcosecha de berries (*Botrytis* sp. y *Fusarium* sp.). Así mismo, mostraron excelente antagonismo hacia otros géneros fúngicos que son responsables de enfermedades postcosecha. Por lo tanto, los resultados sugieren que los microorganismos que fueron aislados de berries biocontrolan el crecimiento de hongos patógenos postcosecha.

Palabras clave: Patógenos, enfermedades postcosecha, microorganismos antagonistas.

Abstract

Fungal pathogens are the main causal agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. To prevent or reduce these fungal pathogen damage, chemical fungicides are used, they can damage the environment and the consumer health. Therefore, safer and greener alternatives have been sought to avoid postharvest deterioration caused by fungal agents. One of these alternatives is the use of microorganisms that, through different mechanisms of action such as: competition for space and nutrients, antibiosis, induction of defense response, direct parasitism, etc., can prevent the growth of pathogenic fungi of fruits and vegetables. Michoacan is one of the largest producers of berries in the country, so the main objectives of this work are: identify fungal pathogens that affect post-harvest berries (strawberries, blackberries and blueberries) and evaluate antagonistic bacteria for their biocontrol. Twenty fungi that deteriorated the quality of berries were isolated, most of them belong to the main postharvest pathogens of various fruits and vegetables, two antagonistic microorganisms (*Rahnella aquatilis* SER3 and *Trichoderma* sp. 4AF) were also isolated, which were evaluated together with others bacterial strains already characterized to demonstrate their ability to biocontrol against isolated fungi. The results showed that the antagonistic microorganisms that were isolated from berries, as well as the bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270 are able to significantly inhibit the growth of the main postharvest pathogens of berries (*Botrytis* sp. and *Fusarium* sp.). Likewise, they showed excellent antagonism towards other fungal genera that are responsible for postharvest diseases. Therefore, the results suggest that microorganisms that were isolated from berries biocontrol the growth of postharvest pathogenic fungi.

1.-Introducción

1.1 Hongos como principales agentes causales de enfermedades postcosecha:

Las enfermedades postcosecha causan pérdidas considerables de frutas y vegetales durante el manejo, transporte y almacenamiento (Sharma *et al.*, 2009). El deterioro causado por hongos es el principal responsable de las pérdidas significativas durante el almacenamiento. Las infecciones de frutas por patógenos fúngicos tanto en el campo como después de la cosecha resultan en un deterioro o decaimiento postcosecha (Dukare *et al.*, 2018). Los altos niveles de pérdidas debidas a los patógenos fúngicos están relacionados a altos niveles de humedad, nutrimento, valores bajos de pH, y la disminución de la resistencia intrínseca después de la cosecha (Droby *et al.*, 1992).

Además del deterioro de la calidad y las pérdidas económicas, las frutas infectadas con patógenos fúngicos plantean un riesgo para la salud, ya que diversos géneros fúngicos como: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, y *Penicillium* producen micotoxinas. Además, *Penicillium expansum*, es un agente etiológico de la enfermedad de moho azul en una variedad de frutas cosechadas, responsable de la producción de numerosos metabolitos potencialmente carcinogénicos, incluyendo citrinina, patulina y caetoglobosinas (Andersen *et al.*, 2004). Otras micotoxinas como las aflatoxinas, ocratoxinas, altertoxinas y fumonisinas, son producidas también en frutas y vegetales contaminados con géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Alternaria* y *Fusarium* (Sanzani *et al.*, 2016).

1.2 Uso de fungicidas sintéticos para controlar el decaimiento postcosecha:

Los fungicidas sintéticos son los primeros en utilizarse para controlar el decaimiento postcosecha, sin embargo, no son la opción más adecuada ya que contaminan la atmósfera, dañan el ambiente, dejan residuos dañinos y pueden conducir al desarrollo de cepas resistentes (Vinale *et al.*, 2008), con el potencial de dañar la salud del consumidor. De acuerdo con reportes de la organización mundial de la salud, hay cerca de 20,000 muertes no intencionales y 2 millones de envenenamientos cada año, en su mayoría causados por el mal manejo de fungicidas sintéticos en países de tercer mundo. El uso de fungicidas sintéticos en el almacenamiento de productos alimenticios ha tenido varios efectos en la salud de las personas, como carcinogenicidad, teratogenicidad, desbalances hormonales, entre otros (Gilbert, 2012. Stocco, *et al.* 2019).

1.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal como alternativa al uso de fungicidas químicos:

Una alternativa viable, efectiva y económica a los fungicidas sintéticos es el uso de antagonistas microbianos también llamados agentes biocontrol. Estos son microorganismos que disminuyen los efectos dañinos de agentes patógenos. Glick, 2012 hace mención sobre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés (PGPB), y, como su nombre lo dice, éstas estimulan el crecimiento de las plantas, ya sea a través de mecanismos directos: facilitando la adquisición de recursos, modulando los niveles de hormonas vegetales, o bien, a través de mecanismos indirectos, disminuyendo los efectos de agentes patógenos actuando como bacterias biocontrol. Debido a esta actividad de biocontrol es que estos microorganismos son una opción para controlar o disminuir el efecto de patógenos que afectan a frutas y vegetales postcosecha, sin tener efectos secundarios dañinos como los fungicidas.

1.4 Modos de acción de los antagonistas microbianos:

Existen varios modos de acción de los antagonistas microbianos. Algunos de estos incluyen: la competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, resistencia inducida, y parasitismo directo (Sharma *et al.*, 2009; Nunes, 2012; Di Francesco *et al.*, 2016). Algunos otros autores también incluyen como mecanismos de acción: la producción de biofilm y Quorum Sensing (Carmona-Hernández *et al.*, 2019). A continuación, los detallamos.

1.4.1 Competencia por espacio y nutrientes:

Para que un microorganismo antagonista pueda competir y colonizar espacios exitosamente debe tener un crecimiento rápido y tomar los nutrientes de una forma más eficaz, de esta manera los nutrientes se agotan y así se previene que el patógeno los utilice para germinar o crecer, e iniciar el proceso de infección. También, deben adaptarse de una manera más rápida a las condiciones ambientales del ecosistema donde resida, por ejemplo, en la rizósfera (Nunes, 2012).

La inhibición del patógeno puede ser mayor si se incrementa la concentración de microorganismos antagonistas, es necesario realizar estudios de aplicación de diferentes concentraciones de microorganismos antagonistas para determinar la mínima concentración requerida para inhibir al patógeno (Carmona-Hernández *et al.*, 2019).

Uno de los primeros mecanismos de biocontrol en bacterias promotoras fue la producción de agentes quelantes de hierro, mejor conocidos como sideróforos. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de microorganismos. Los sideróforos son moléculas de naturaleza peptídica que contienen cadenas laterales y grupos funcionales con alta afinidad para atraer iones de hierro (Fe^{+3}). Cuando las bacterias producen sideróforos en un microecosistema como la rizósfera, pueden formarse complejos sideróforo-hierro, así, inhiben el desarrollo de los patógenos, limitando la germinación de esporas y el crecimiento del micelio (Carmona-Hernández *et al.*, 2019). Los complejos

Fe-sideróforo se unen a receptores de las membranas de las bacterias, facilitando la toma de hierro y previniendo que los patógenos adquieran suficiente cantidad de Fe^{+3} limitando su habilidad para proliferar, de esta manera los antagonistas compiten con el patógeno por el hierro disponible (Glick, 2012).

1.4.2 Antibiosis:

En general la antibiosis es considerada el proceso por el cual los antagonistas producen sustancias que inhiben o matan a los patógenos. Las familias de lipopeptidos cíclicos (LPs) incluyen iturina, surfactina y fengicina, estos son compuestos reconocidos por sus propiedades surfactantes, además diferentes grupos de LPs pueden estimular la respuesta de resistencia en frutas (Di Francesco *et al.*, 2016). Arrebola *et al.*, 2010, utilizaron extractos de lipopeptidos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 contra diversos patógenos fúngicos, ellos observaron una germinación de conidios y un desarrollo de tubos germinativos anormales cuando los conidios fueron tratados con diferentes concentraciones de los extractos de lipopeptidos. De estos extractos se demostró que la iturina es el compuesto que tiene mejor efecto inhibitorio. La iturina rompe la membrana citoplasmática del hongo, creando canales transmembranales que permiten la liberación de iones vitales como K^+ (Hsieh *et al.*, 2008).

Otros compuestos producidos por antagonistas son: pirrolnitrina, sirringomicina y bacilomicina (Di Francesco *et al.*, 2016). Entre las sustancias producidas por los antagonistas microbianos, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) están frecuentemente involucrados en el biocontrol de enfermedades postcosecha causadas por hongos (Di Francesco *et al.*, 2016). La bio-fumigación de la fruta utilizando microorganismos que producen VOCs en cámaras cerradas pueden ser una alternativa viable para controlar a los fitopatógenos. Los compuestos orgánicos volátiles son activos en bajas concentraciones y pertenecen a varios grupos químicos como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos y compuestos de azufre (Carmona-Hernández *et al.* 2019).

Compuestos como el alcohol fenético, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol son algunos de los VOCs producidos por *Aureobasidium pullulans* que han sido efectivos contra *B. cinerea*, *C. acutatum* y *Penicillium* spp. en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Di Francesco *et al.* 2014).

1.4.3 Resistencia inducida:

La inducción de resistencia es la capacidad que tienen los microorganismos antagonistas de provocar una respuesta de defensa en el hospedero a través de varias reacciones bioquímicas, incluyendo cambios en la estructura del tejido. La inducción de respuesta de defensa es dada por la producción de diferentes enzimas y metabolitos: proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR), las cuales incluyen: gluconasas, quitinasas, peroxidasas, superóxido dismutasa, catalasa (que protegen el tejido contra el daño oxidativo). Compuestos con actividad antimicrobiana como las fitoalexinas.

Deposiciones de calosa y lignina en la pared celular asegurando su fortalecimiento (Carmona-Hernández *et al.*, 2019).

Wang *et al.* 2018 encontraron que al inocular la bacteria antagonista *Burkholderia contaminans* B1 en fresas, se reduce el índice de decaimiento durante el almacenamiento de estas frutas, ya que este microorganismo provoca el incremento de la actividad de enzimas relacionadas con la ruta del metabolismo del fenilpropano. Lignina, fenoles y flavonoides son productos finales de esta vía. La lignina es el mayor componente de la pared celular y previene el esparcimiento de microorganismos patógenos, los fenoles pueden generar quinonas que son altamente tóxicas para los patógenos, los flavonoides son fitoalexinas importantes para prevenir la germinación de esporas patogénicas y la elongación del tubo germinativo y mata las células terminales del micelio (Ahuja *et al.*, 2012).

1.4.4 Parasitismo directo:

Algunos microorganismos antagonistas son capaces de anclarse a las hifas de los patógenos y producir enzimas líticas como gluconasas, quitinasas, proteinasas que participan en la degradación de la pared celular del patógeno (Sharma *et al.*, 2009).

Hernández-Montiel *et al.*, 2018 evaluaron la eficacia de *Debaryomyces hansenii* para controlar la antracnosis en papaya, determinaron la capacidad *in-vitro* de esta levadura de inhibir al patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* por distintos mecanismos de acción, uno de ellos la producción de enzimas hidrolíticas. *D. hansenii* produce β -1,3 gluconasas y proteasas, se ha reportado que ambas enzimas actúan directamente en la pared celular del fitopatógeno, la cual está constituida mayormente por quitina (aprox. 20%), β -glucanos (aprox. 50%-60%), y proteínas (aprox. 20%-30%). Las β -1,3 gluconasas hidrolizan las cadenas del polisacárido produciendo oligosacáridos y glucosa, que son utilizados como fuente de carbono por la levadura. Las proteinasas degradan las proteínas de la membrana, facilitando a la levadura una fuente de nitrógeno y aminoácidos (Hernández-Montiel *et al.*, 2018).

1.4.5 Biofilm y Quorum Sensing:

Para colonizar exitosamente las superficies de la fruta, las bacterias antagonistas deben tener características específicas que faciliten su adherencia, colonización y multiplicación. En la mayoría de los casos, estas características están asociadas con la formación de biofilm, en el cual las microcolonias están dentro de una matriz producida por las bacterias. La formación de esta estructura es medida por quorum sensing, las microcolonias mantienen una forma de comunicación a través de este mecanismo, empleando diversas señales químicas para supervisar el ambiente, alterar su expresión genética y obtener ventaja sobre sus competidores (Chi *et al.*, 2015). Como mecanismo biocontrol, los biofilms formados actúan como barreras que se interponen entre la superficie de la lesión del hospedero y el fitopatógeno (Carmona-Hernández *et al.*, 2019).

1.5 Criterios para seleccionar un microorganismo antagonista ideal:

Un potencial antagonista microbiano debe tener ciertas características que lo hagan un bioagente ideal (Wilson & Wisniewski, 1989). El antagonista debe ser: genéticamente estable, efectivo a bajas concentraciones, no fastidioso de acuerdo a sus requerimientos nutricionales, capaz de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales, debe ser efectivo contra un amplio rango de patógenos y en diferentes productos cosechados, resistente a pesticidas, no debe ser productor de metabolitos dañinos para los humanos, no debe ser patógeno para el hospedero, debe ser apto para poder preparar formas en las cuales pueda ser efectivamente almacenado y dispensado, debe ser compatible con otros tratamientos físicos y químicos. Además, un antagonista microbiano debe tener una ventaja adaptativa sobre un patógeno específico (Wilson & Wisniewski, 1989).

1.6 Métodos de aplicación de los antagonistas microbianos:

Una vez que un potencial antagonista microbiano es identificado o seleccionado, es necesario buscar un método para aplicarlo de manera efectiva para controlar o suprimir el patógeno. En general, los antagonistas son aplicados a través de dos estrategias: una es la aplicación antes de la cosecha (precosecha) y la otra, posterior a la cosecha (postcosecha) (Sharma *et al.*, 2009).

En muchos casos, los patógenos infestan a las frutas y vegetales en el campo, y estas infecciones latentes se convierten en el factor mayor de decaimiento durante el transporte o almacenamiento. Es por eso, que las aplicaciones precosecha de los antagonistas microbianos son efectivos en controlar el decaimiento postcosecha (Ippolito and Nigro, 2000; Janisiewicz and Korsten, 2002; Ippolito *et al.*, 2004; Irtwange, 2006). El propósito de las aplicaciones precosecha es pre-colonizar la superficie de la fruta con el microorganismo antagonista antes de la cosecha, así las lesiones que sufra la fruta durante la cosecha pueden ser colonizadas por el antagonista antes que sean colonizadas por el patógeno (Ippolito and Nigro, 2000). La aplicación postcosecha de los antagonistas microbianos es un método práctico y útil para controlar enfermedades postcosecha en frutas y vegetales. En este método, los cultivos microbianos son aplicados en spray o por inersiones en soluciones preparadas con los antagonistas (Barkai-Golan, 2001; Irtwange, 2006).

2.-Antecedentes

2.1 Importancia económica de la producción de berries en México y en el estado de Michoacán:

En diciembre de 2017 la Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario (SEDRUA, 2017) dio a conocer que México es el 4to productor mundial de berries. Michoacán aporta más del 90% de la producción de zarzamora y más del 60% de la producción de fresa del país. La producción de arándano en Michoacán se posiciona en 2do lugar a nivel nacional con una producción anual de 6 mil toneladas.

En agosto de 2018 la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2018) reiteró que Michoacán se mantiene en 1er lugar a nivel nacional en producción de fresa, estimando el valor de la producción en 9 mil 597 millones de pesos. El cultivo de fresa se siembra en 32 municipios michoacanos de los cuales destacan Zamora, Tangancícuaro, Jaconá y Panindícuaro como líderes de producción. Así mismo destacó que se exporta principalmente a los mercados de Canadá, Estados Unidos, Holanda, Chile, Arabia Saudita, Japón, China Republica Dominicana, Italia y Kuwait.

La producción de berries representa la segunda actividad económica del estado de Michoacán generando más de tres mil empleos fijos al año y más de 45 mil empleos temporales ligados a la actividad.

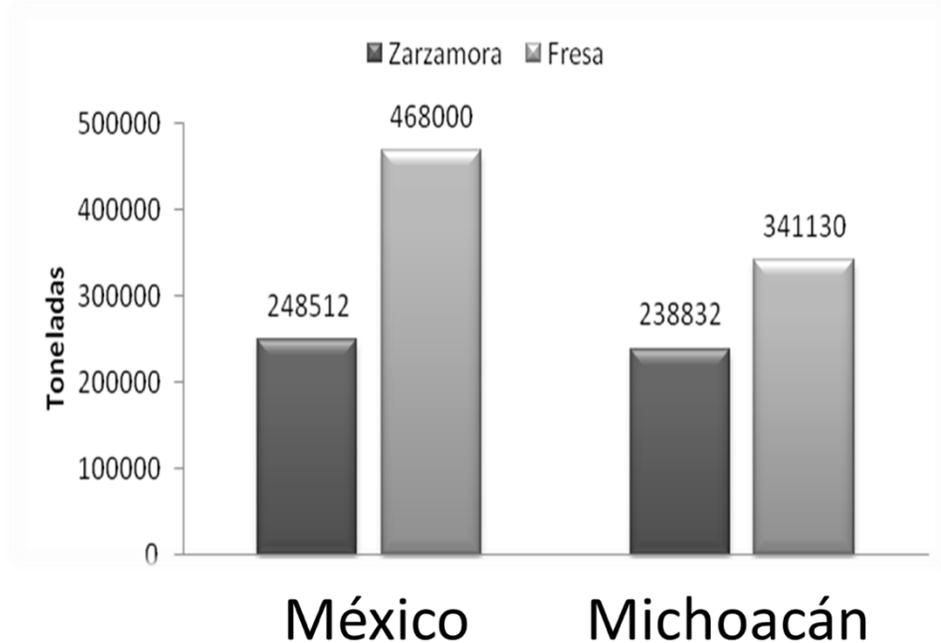


Figura 1: Toneladas de zarzamora y fresa producidas a nivel estatal y nacional. A nivel nacional se producen 248,512 toneladas de zarzamora de las cuales Michoacán aporta 238,832 toneladas. La producción de fresa a nivel nacional es de 468,000 y Michoacán aporta 341,130 toneladas. (SEDRUA, 2017. SAGARPA, 2018).

2.2 Microorganismos antagonistas utilizados contra patógenos postcosecha:

Se han realizado diversos trabajos donde los microorganismos antagonistas han resultado efectivos para controlar el crecimiento de hongos patógenos de frutas y vegetales en postcosecha, tanto en experimentos *in vitro* como experimentos *in vivo*. En la siguiente tabla se resumen algunos ejemplos de microorganismos antagonistas que han mostrado tener actividad de inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos y evitar las enfermedades postcosecha.

Tabla 1: Ejemplos de microorganismos antagonistas utilizados contra patógenos postcosecha.

Antagonista	Patógeno	Enfermedad	Fruta	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Moho gris Pudrición de Rhizopus	Fresa Zarzamora	Zhao <i>et al.</i> (2007) Chávez-Díaz <i>et al.</i> (2013)
<i>Burkholderia cepacia</i> BCSL	<i>Colletotrichum musae</i>	Antracnosis	Plátano	Costa y Erabadupitiya (2005)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf1	<i>Botrytis mali</i> <i>Ruehle</i>	Moho gris	Manzana	Mikani <i>et al.</i> (2008)
<i>Burkholderia contaminans</i> B-1	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Fresa	Wang <i>et al.</i> (2018)
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	Moho verde	Mandarina	Lu <i>et al.</i> (2013)

2.3 *Bacillus* sp. E25 y *Bacillus* sp. CR71 como microorganismos que inhiben el crecimiento del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*:

Como ya se mencionó anteriormente, una de las mayores causas de la pérdida de cultivos es la presencia de hongos fitopatógenos. Estos patógenos pueden ser específicos de cultivos o en su mayoría generalistas como el hongo *Botrytis cinerea* que es responsable de la enfermedad del moho gris y ataca a más de 200 especies de plantas. Rojas-solis *et al.*, 2018 evaluaron la capacidad antagonista de las cepas bacterianas CR71 y E25 contra el hongo *B. cinerea* por el efecto de los compuestos difusibles y volátiles producidos por dichas bacterias.

Los autores encontraron que ambas cepas bacterianas inhiben el crecimiento de *B. cinerea*. A través de la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) E25 inhibe el crecimiento del micelio en un 40%; mientras que la cepa CR71 lo inhibe en un 52%.

Por otra parte, los compuestos difusibles producidos por E25 inhiben el crecimiento del hongo en un 12%, mientras que CR71 lo inhibe en un 24%.

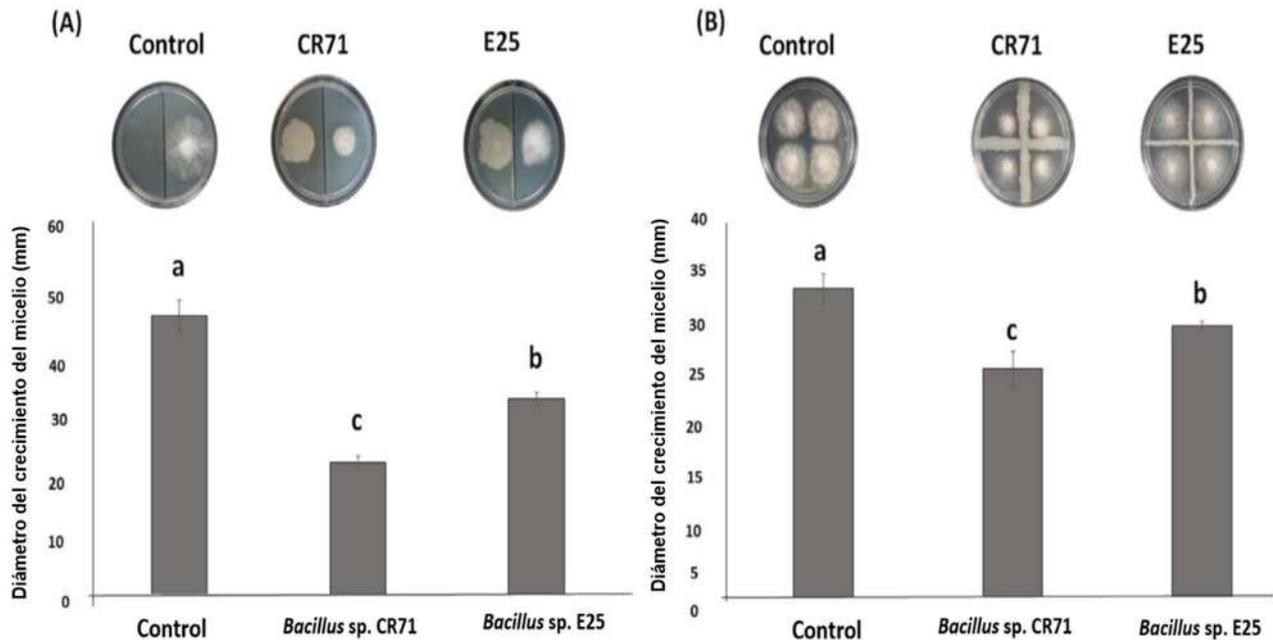


Figura 2: Efecto antifúngico de la co-inoculación de las cepas E25 y CR71 con el patógeno *B. cinerea*. (A) efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por CR71 y E25 en cajas Petri divididas. (B) Efecto directo de los compuestos difusibles producidos por CR71 y E25 en el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Ambos experimentos fueron realizados independientemente tres veces. Los gráficos respectivos de cada experimento son mostrados en los paneles inferiores de (A) y (B), donde las barras representan los valores de la media \pm SE. Las letras indican que la media difiere significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$). (Modificado de Rojas-Solís *et al.* 2018).

Debido al efecto observado por los compuestos orgánicos volátiles, se decidió analizar la mezcla de dichos compuestos utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La mayoría de los VOCs producidos por las cepas bacterianas incluyen: aldehídos, alcoholes, compuestos aromáticos, ésteres, éteres y compuestos de azufre, se detectaron 4 compuestos de azufre: S-metiltiobutirato, isobutil isotiocianato, S-metiltioetanol y Dimetildisulfuro (DMDS). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio puede ser debido a estos compuestos azufrados como el DMDS, el cual se ha reportado con actividad antimicrobiana (Huang *et al.*, 2012).

Tabla 2: Análisis de los compuestos orgánicos volátiles producidos por E25 y CR71 detectados por GC/MS. (Modificado de Rojas-solís *et al.* 2018).

Compuestos volátiles	Tr (min)	E25 (%)	CR71 (%)
Acetona	1,4	10,71	n.d.
2-Butanona	1,95	2,32	2.24*
Alcohol isopropílico	2,29	0,74	n.d.
Propionato de etilo	2,65	1,14	3.17*
Isobutirato de etilo	2,76	0,82	6.14*
3-Metil-2-pentanona	3,77	6,86	n.d.
Triclorometano	3,96	38,85	n.d.
2-metilbutanoato de etilo	4,72	n.d.	3,49
Isovalerato de etilo	5,24	n.d.	1,95
Dimetil disulfuro	5,35	2,11	2.65*
3-Metilbutanonitrilo	7,49	12,93	n.d.
S-Metil tio butirato	7,56	n.d.	5,91
1-Butanol	8,91	n.d.	0,93
1,3-Diazina	11,3	3,24	n.d.
Tiglato de etilo	12,26	1,92	4.94*
Metil pirazina	13,63	1,18	n.d.
Acetoina	14,47	n.d.	8,11
Isobutil isotiocianato	15,83	10,47	25.86*
Ácido acético	22,32	n.d.	5,4
3-hidroxybutanoato de etilo	24,74	0,48	6.24*
2-(Metiltio) etanol	25,11	2,1	2.74*
Ácido propiónico	25,83	n.d.	1,16
Ácido-2-metilpropanoico	26,96	n.d.	3,72
Feniloxirano	28,42	2,43	2.14*
Ácido butanoico	29,33	n.d.	1,37
Ácido-3-metilbutanoico	30,87	n.d.	2,32
Salicilato de metilo	34,34	n.d.	0,29
Ácido-2-butanoico	34,49	n.d.	6,07
Acetamida	34,93	1,24	0.31*
Alcohol bencílico	38,27	0,45	1.15*

*El asterisco indica los VOCs emitidos por ambas cepas

Dado que el DMDS fue uno de los principales volátiles detectados en la mezcla de compuestos producidos por las cepas bacterianas E25 y CR71, decidieron evaluar aún más su papel antifúngico como volátil en cajas Petri divididas y cuando se vierte directamente en el medio donde se inoculó el hongo *B. cinerea*. En ambos experimentos, el DMDS mostró mayor efecto de inhibición cuando fue vertido en el medio y estuvo en

contacto directo con el patógeno, aún a la baja concentración de 0.1 μM , como volátil el DMDS tiene efecto inhibitorio a la concentración de 10 μM .

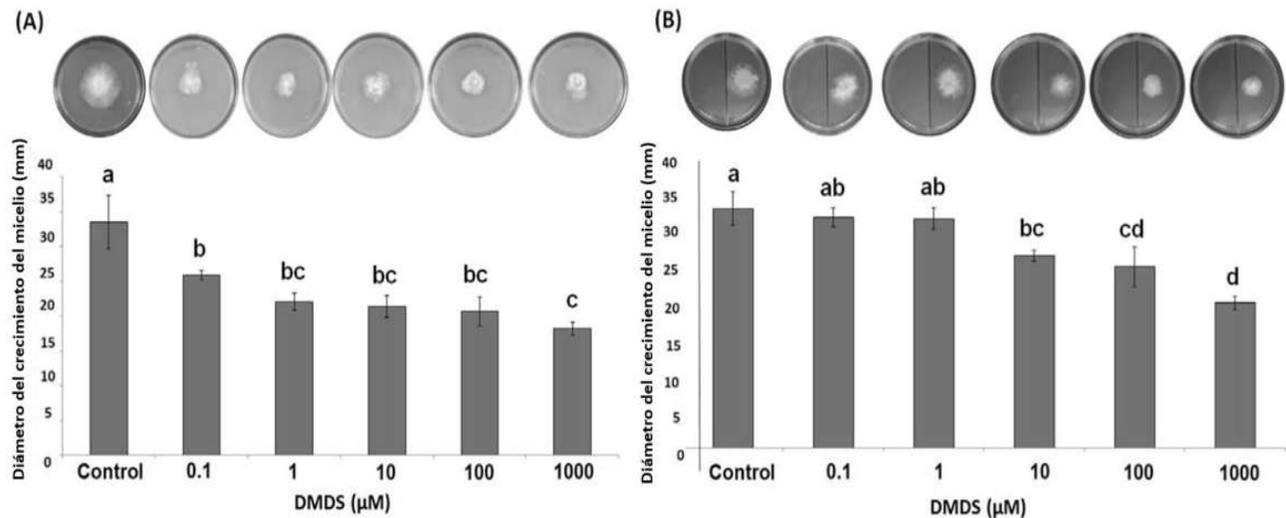


Figura 3: Efecto antifúngico de la co-inoculación del compuesto DMDS con el fitopatógeno *Botrytis cinerea*. (A) Efecto directo del DMDS en el crecimiento de *B. cinerea*. (B) Efecto del DMDS en cajas Petri divididas. Ambos experimentos fueron realizados independientemente 3 veces. Los gráficos respectivos de cada experimento se muestran en los paneles inferiores (A) y (B) donde las barras representan los valores de la media \pm SE. Las letras indican que el valor difiere significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$). (Modificado de Rojas-Solis *et al.* 2018).

2.4 Cepas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* inhiben el crecimiento de *B. cinerea* y reducen signos de enfermedad en plantas de *Medicago truncatula*:

Hernández-León *et al.*, 2015 aislaron 4 cepas de *Pseudomonas fluorescens* de la rizosfera de *Medicago* spp. con actividades de promoción del crecimiento vegetal y de biocontrol. Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad antagonista de las cepas por la producción de compuestos difusibles y compuestos orgánicos volátiles contra el patógeno *Botrytis cinerea*.

Las 4 cepas mostraron mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *B. cinerea* por compuestos difusibles comparados con los ensayos donde se observó el efecto de los VOCs, aunque ambos mecanismos fueron inhibitorios significativamente. En términos de porcentaje, los compuestos difusibles redujeron el crecimiento del hongo en un 86% mientras que por compuestos orgánicos volátiles (VOCs) hubo inhibición en un 53%.

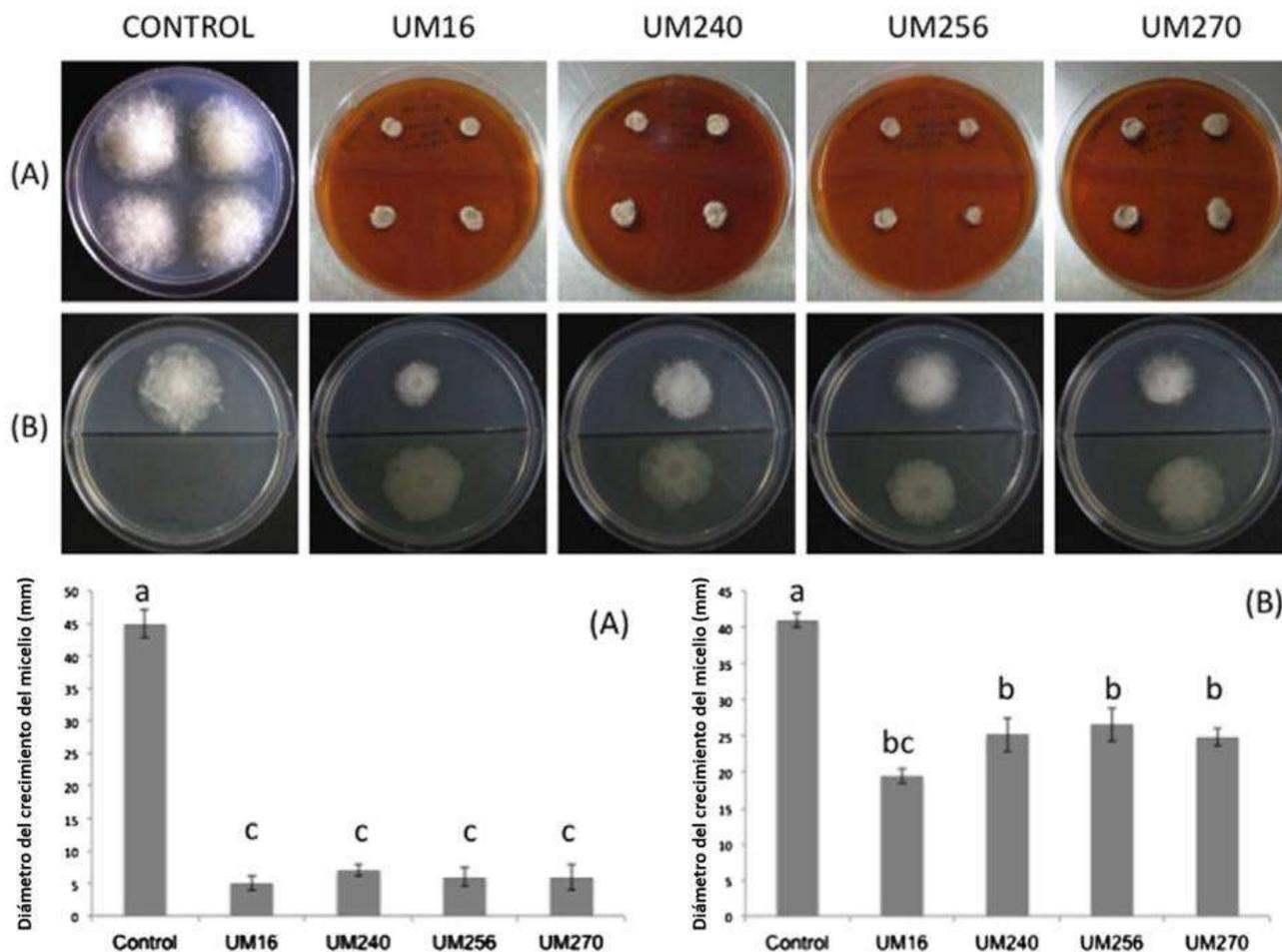


Figura 4: El efecto antifúngico de la co-inoculación de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 con el fitopatógeno *Botrytis cinerea*. En el panel superior (A) se muestra el efecto directo de los compuestos difusibles producidos por *Pseudomonas* en el crecimiento del micelio de *B. cinerea*. Los aislados bacterianos fueron estriados en forma de cruz en placas y cortes de micelio de 4 mm de diámetro fueron depositados en el centro de cada cuadrante formado. En el panel (B) se muestra el efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las cepas de *Pseudomonas* en placas Petri divididas. Aquí, un inoculo de cada cepa (1×10^6 UFC) fue simultáneamente depositado en uno de los lados de la caja Petri y en la otra sección fue inoculado *B. cinérea*. Ambos experimentos fueron realizados independientemente un mínimo de 3 veces. Las placas fueron incubadas y el crecimiento del micelio fue medido al sexto día. (Modificado de Hernández-León *et al.* 2015).

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por las 4 cepas de *Pseudomonas* fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se encontraron aldehídos, cetonas, alcoholes y compuestos de azufre, estos incluyen: metanotiol, dimetilsulfuro, dimetildisulfuro (DMDS) y dimetiltrisulfuro. La cepa UM270 es la única que produce dimetilhexadecilamina (DMHDA).

Tabla 3: Análisis de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Pseudomonas fluorescens* detectados por GC/MS (Modificado de Hernández-León *et al.* 2015).

Compuesto volátil	Tr (min)	UM16	UM240	UM56	UM270
		%	%	%	%
Metanotiol	0.28	12.34	10.57	12.99	15.13
Dimetil sulfuro	0.36	16.86	17.12	13.26	23.4
2-Butanona	0.96	0.23	n.d.	0.24	n.d.
1-Noneno	1.05	1.09	1.03	1.75	2.02
Tioacetato de metilo	1.46	0.15	1.36	1.35	1.17
Dimetil disulfuro	1.72	30.26	22.89	13.84	5.62
1-Deceno	1.95	1.53	1.82	1.13	0.53
1-Undecanol	3.56	35.07	38.77	52.5	50.01
2,4-Ditiopentano	5.32	1	0.96	0.52	n.d.
1-Dodeceno	6.09	n.d.	0.44	0.48	n.d.
Dimetil trisulfuro	7.28	0.42	1.07	0.7	0.57
S, S-Dimetil ditiocarbonato	9.15	0.13	0.52	n.d.	n.d.
2-Nonanona	11.65	0.26	0.54	0.18	n.d.
Decil oxirano	16.83	0.3	1.03	0.46	n.d.
Metiltiometil disulfuro de metilo	17.07	0.12	0.41	n.d.	n.d.
Ácido 2-Amino-5-metil benzoico	17.69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiazol	18.66	n.d.	0.58	0.31	0.41
Butilhidroxitolueno	26.22	0.25	0.86	0.3	0.49
Dimetilhexadecilamina	31.4	n.d.	n.d.	n.d.	0.64

El color gris indica los compuestos volátiles que contienen azufre

Para confirmar la eficacia de biocontrol de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* in vivo, se realizaron ensayos utilizando plantas de *Medicago truncatula*, las cuales fueron inoculadas con una concentración de esporas de *B. cinerea* de 1×10^6 esporas/mL. Los signos de enfermedad en las plantas fueron: crecimiento del micelio en la planta (moho gris), clorosis en las hojas, oscurecimiento de la raíz y necrosis en diferentes tejidos de la planta. Cuando se realizó la co-inoculación de las esporas con cada cepa de *Pseudomonas fluorescens* (1×10^6 UFC/mL) en las plantas, se observó que los signos de enfermedad fueron reducidos significativamente, y las plantas tenían una apariencia más sana. Los síntomas generales de la enfermedad del tallo, el oscurecimiento de la raíz y la necrosis se redujeron significativamente en las plantas coinoculadas con todas las cepas hasta en un 60%.

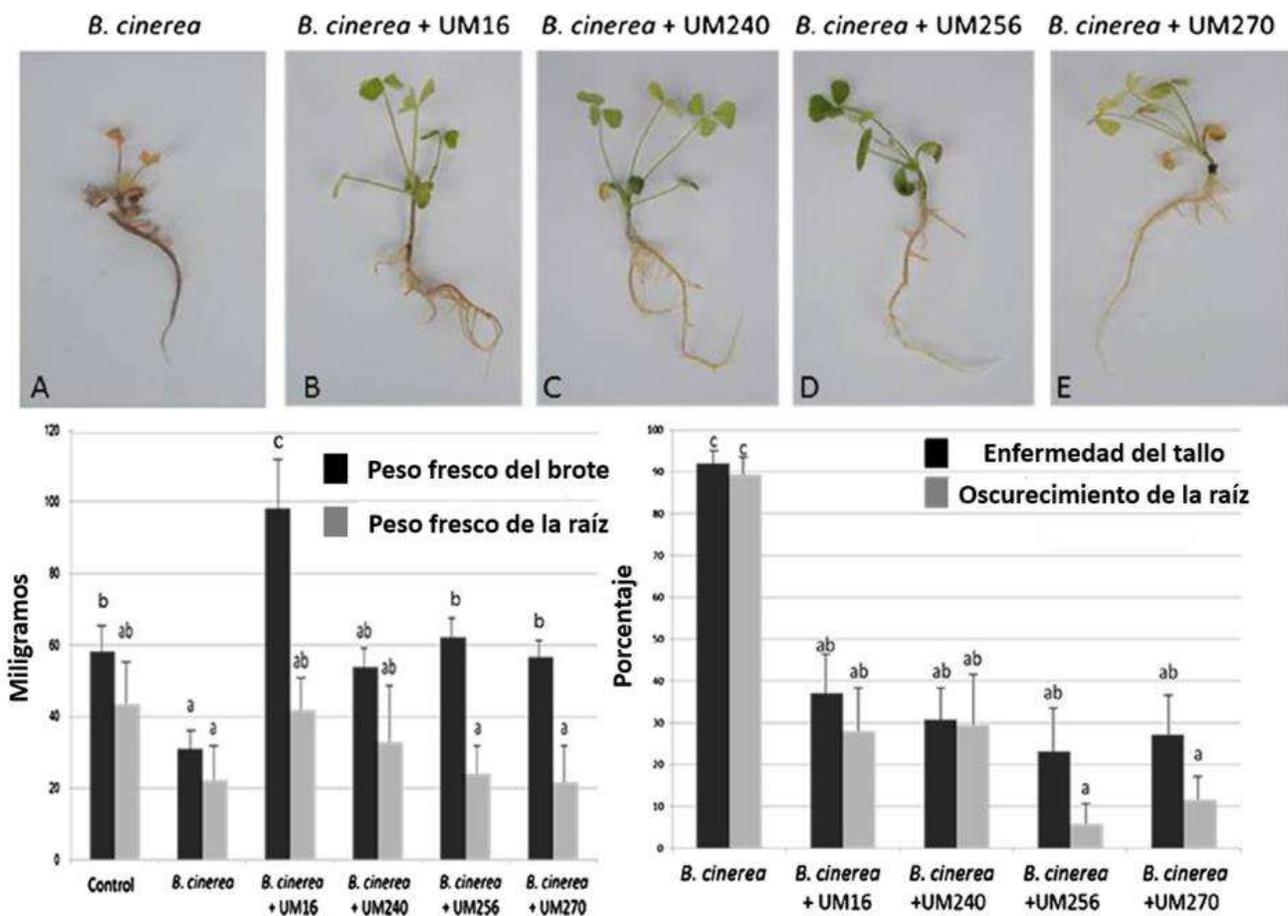


Figura 5: La capacidad de biocontrol de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* UM16, UM240, UM256 y UM270 contra *Botrytis cinerea* en plántulas de *Medicago truncatula*. Plantas representativas (n=12) se muestran en diferentes paneles (A-E). (A) Planta control inoculada con *B. cinerea*. (B) Plantas co-inoculadas con *B. cinerea* y UM16 (B), UM240 (C), UM256 (D) y UM270 (E). El grafico de la izquierda muestra el peso del brote (barras negras) y el peso de la raíz (barras grises). El grafico de la derecha muestra los signos de enfermedad del tallo (barras negras) y el oscurecimiento de la raíz (barras grises). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$). (Hernández-León *et al.* 2015).

2.5 *Trichoderma* spp. como agente biocontrol de *Penicillium digitatum* en postcosecha:

Panebianco *et al.*, 2015 evaluaron 14 cepas de *Pseudomonas* spp. y 3 cepas de *Trichoderma* spp. por sus propiedades de antagonizar al hongo *Penicillium digitatum*, agente causal del moho verde en cítricos. Los ensayos in-vitro mostraron que las cepas de *Pseudomonas* aplicadas de manera individual reducen significativamente el crecimiento de *P. digitatum* (reducen entre el 17.1% y 38% del crecimiento del micelio en medio PDA). Las cepas de *Trichoderma* reducen el crecimiento de *P. digitatum* más eficientemente con porcentajes de inhibición similares entre cepas (66.7% y 69.8% en medio PDA). La combinación de las cepas de *Pseudomonas* con *Trichoderma harzianum* T22 provoca una inhibición del crecimiento de *P. digitatum* similar a la mostrada utilizando solo las cepas de *Pseudomonas*, la combinación de las cepas de *Pseudomonas* con *T. atroviride* P1 y *T. reesei* T34 dieron significativamente una inhibición más grande comparada con la inhibición utilizando solo las cepas de *Pseudomonas* y una inhibición similar a la inhibición utilizando sólo las cepas de *Trichoderma*.

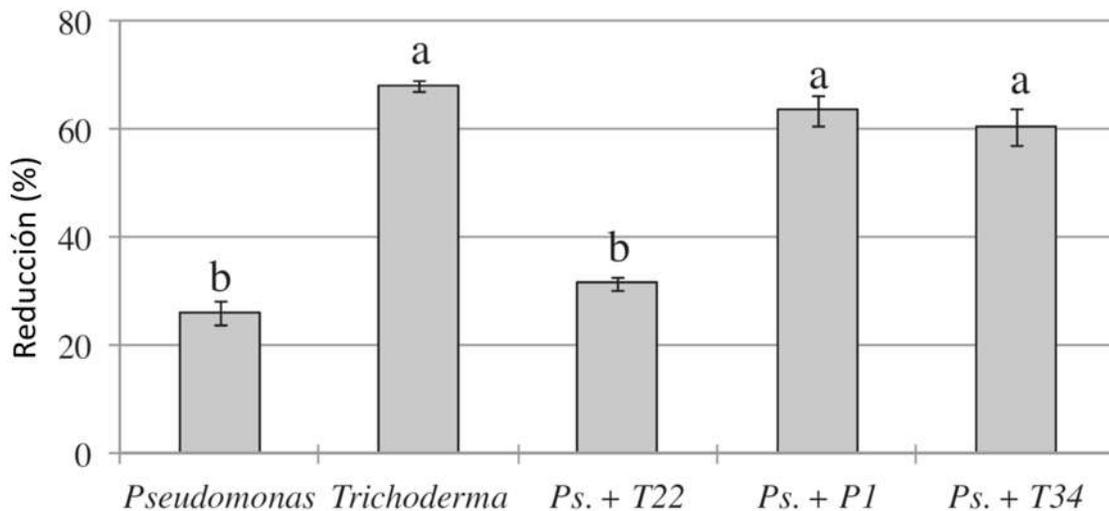


Figura 6: Reducciones acumulativas del crecimiento micelial de *P. digitatum* por cepas de *Pseudomonas* y *Trichoderma* de forma individual o combinadas. Los valores fueron tomados 7 días después de la incubación a 27°C. Cada valor se refiere a 14 cepas de *Pseudomonas* y 3 de *Trichoderma* y sus combinaciones relativas \pm error estándar de la media (SEM). Los datos en cada barra seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de todas las comparaciones múltiples por pares con la prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$). (Modificado de Panebianco *et al.* 2015).

Los ensayos de inhibición también se realizaron en medio con extracto de cascara de naranja, de estos ensayos, la cepa bacteriana de *P. syringae* 48SR2 mostró mayor inhibición del crecimiento de *P. digitatum* (64.3%), por lo cual se decidió utilizar esta cepa para realizar los ensayos de antagonismo in-vivo, sometiendo frutos de limón y naranja en inmersiones con soluciones que contenían esta cepa, en soluciones con *T. atroviride* P1, y en soluciones con ambos microorganismos en combinación. Los resultados mostraron que *P. syringae* 48SR2 y *T. atroviride* P1 aplicados de manera individual en tratamientos por inmersión reducen significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad en frutos de limón y naranja comparados con el control. Además, la combinación de ambos microorganismos reduce fuerte y significativamente la incidencia y severidad del moho verde en frutos de naranja y limón (0%), sinérgicamente mejoran el nivel de supresión de la enfermedad comparado con las cepas de *Pseudomonas* y *Trichoderma* aplicadas de manera individual.

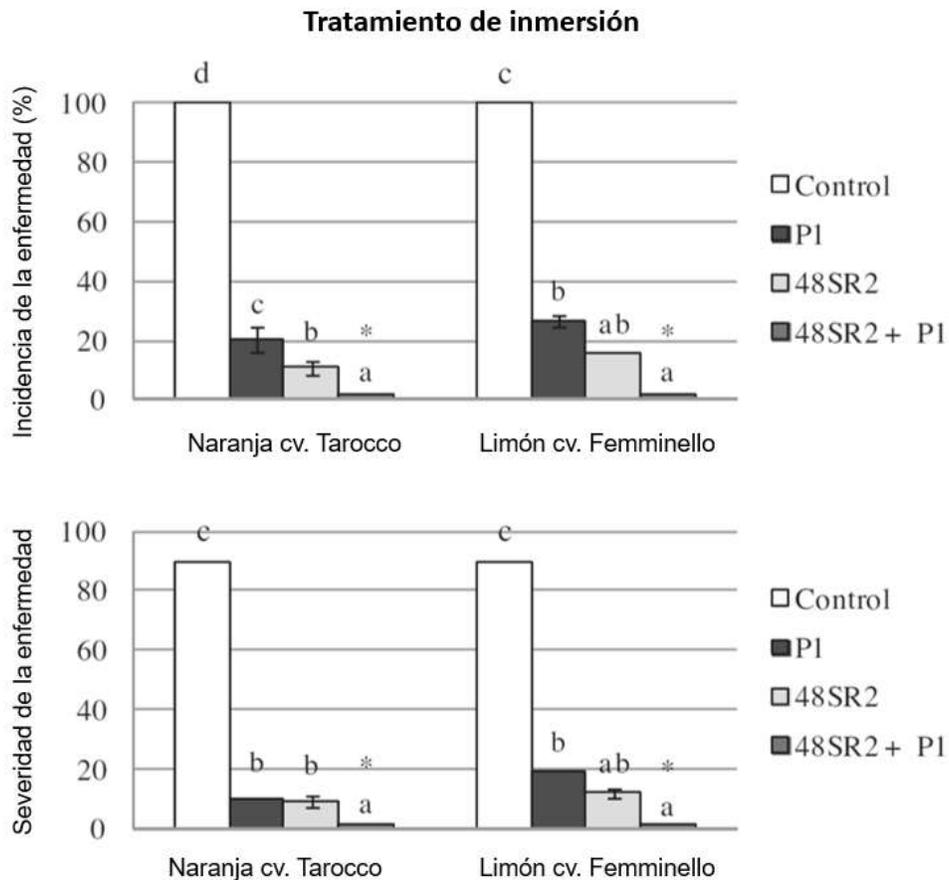


Figura 7: Incidencia y severidad de la enfermedad en las frutas de naranja "Tarocco" y "Limón Femminello" tratadas con *P. syringae* 48SR2 y *T. atroviride* P1, de manera individual y en combinación. Las frutas se sumergieron durante 2 min. en suspensiones acuosas de cada agente biocontrol e inoculadas con *P. digitatum* 72 h después. Los valores de incidencia y severidad de la enfermedad se determinaron con respecto a los controles después de 5 días de incubación a 20°C. Para cada hospedero, los datos medios (\pm SEM) seguidos de la misma letra en la columna indican que no hay diferencia entre los tratamientos según la prueba de diferencia menos significativa (LSD) de Fisher a $P = 0.01$. El asterisco indica que hubo actividad sinérgica de acuerdo con la fórmula de Limpel. (Modificado de Panebianco et al. 2015).

2.6 *Rahnella aquatilis* B16C destaca entre diversos endófitos como bacteria antagonista:

Bahrour *et al.*, 2018 analizaron una colección de 120 cepas bacterianas aisladas de nódulos de haba (*Vicia faba*) y garbanzo (*Cicer arietinum*) por su capacidad para inhibir al fitopatógeno *Fusarium solani* en pruebas de antibiosis "in vitro". Los resultados mostraron que 16 cepas endófitas bacterianas todas pertenecientes a los nódulos de haba mostraron actividad antifúngica, de las cuales 3 aislados bacterianos: B16C, B12 y B8P disminuyen de una manera más notable el crecimiento del micelio de *F. solani* (70.83%, 60% y 51% respectivamente).

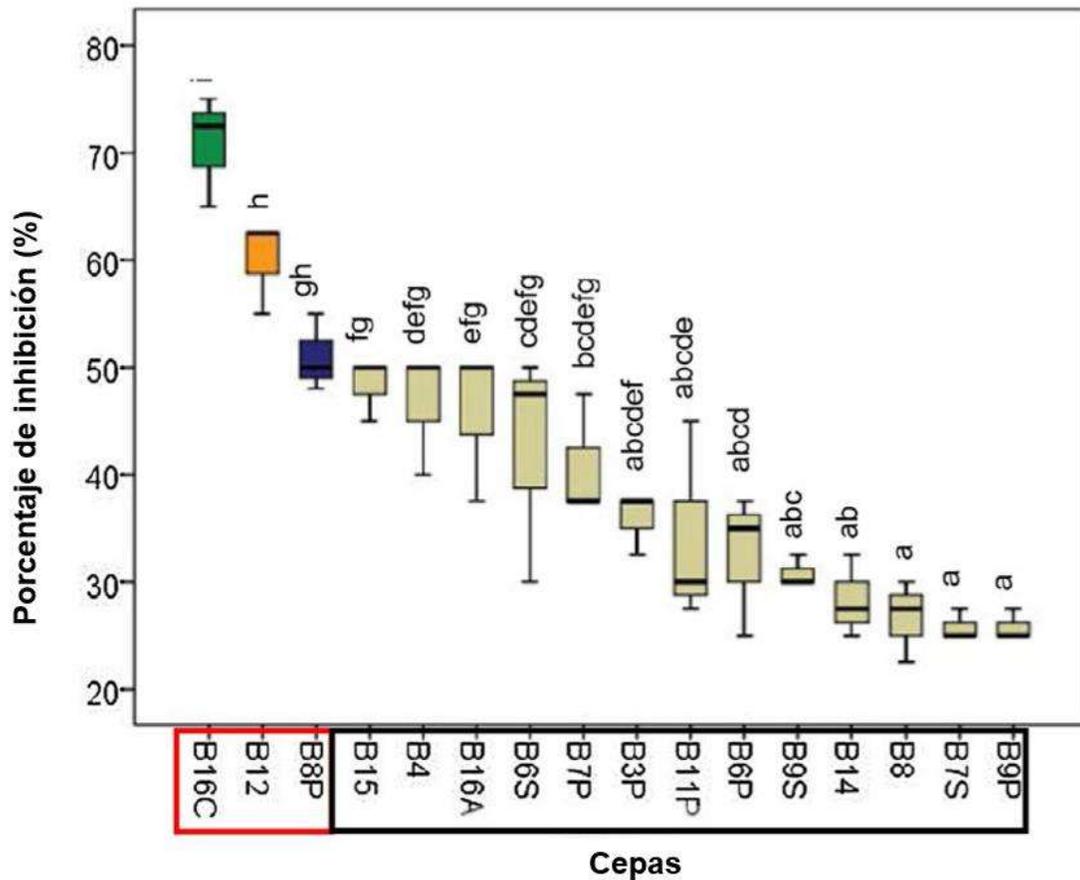


Figura 8: Actividad de inhibición (%) de 16 bacterias endófitas contra *F. solani*. a, b, c, d, e, f, g, h, denotan una diferencia significativa entre la actividad antagonista de las bacterias (SNK, $p < 0.05$). (Modificado de Bahrour *et al.*, 2017).

Estos 3 aislados son: *Rahnella aquatilis* B16C, *Pseudomonas yamanorum* B12 y *Pseudomonas fluorescens* B8P. Dados los resultados, estas cepas fueron analizadas para determinar su potencial de biocontrol "in vivo" en la supresión de la pudrición de la raíz causada por *F. solani* de tres cultivares de haba (cultivar Bachar, cultivar Saber,

cultivar Local) en condiciones de invernadero. Las tres cepas redujeron significativamente la gravedad de los síntomas del patógeno. *R. aquatilis* B16C mostró la mejor potencialidad protectora con los tres cultivares de haba y, en consecuencia, se sugiere como agente de biocontrol para la aplicación en campo.

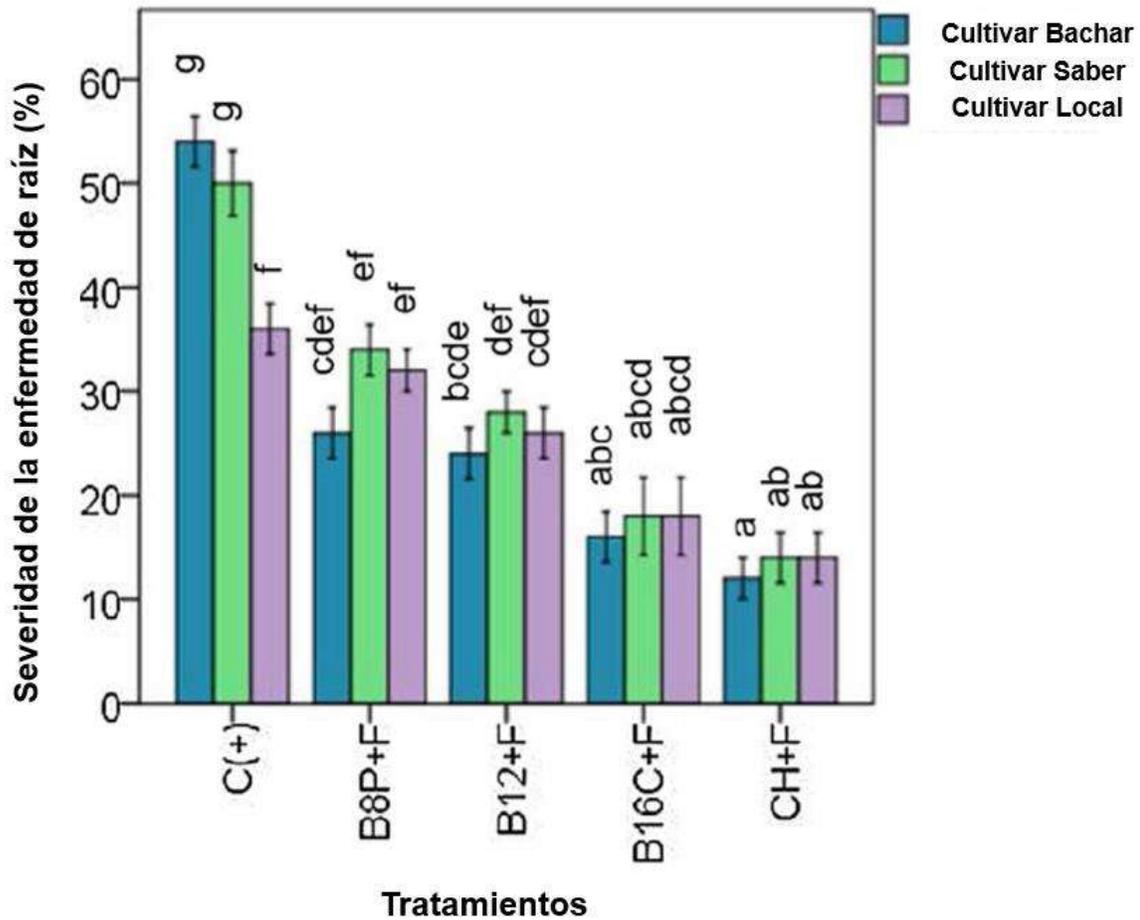


Figura 9: Severidad de los síntomas de la enfermedad de la raíz de tres cultivares; Bachar, Local y Saber, en suelos infestados con *F. solani* e inoculados con bacterias, B16C, B12, B8P o con tratamiento químico, CH; C (+), control positivo (con *F. solani*). Los histogramas representan el valor medio de los síntomas de enfermedad de la raíz en los cultivares. Las barras de error representan el error estándar y las letras (a, b, cyd) indican una diferencia significativa (SNK, $p < 0.05$) en la severidad de la raíz. (Bahround *et al.* 2017).

3.-Justificación

El manejo postcosecha de frutas, y en particular las frutillas o berries (fresas, arándano y zarzamora), incluye evitar la infección por patógenos con agroquímicos. Sin embargo, dichos compuestos pueden causar daño al ambiente y al consumidor, además de disminuir la distribución internacional del producto, causando pérdidas económicas para los productores y distribuidores. Por lo tanto, se necesitan métodos efectivos y no tóxicos para el control de patógenos postcosecha. Las bacterias antagonistas y los diversos compuestos que producen podrían ser una alternativa al uso de químicos en el manejo postcosecha.

4.-Hipótesis

Los microorganismos antagonistas que residen naturalmente en frutillas como fresa, zarzamora y arándano, biocontrolan el crecimiento de hongos patógenos postcosecha.

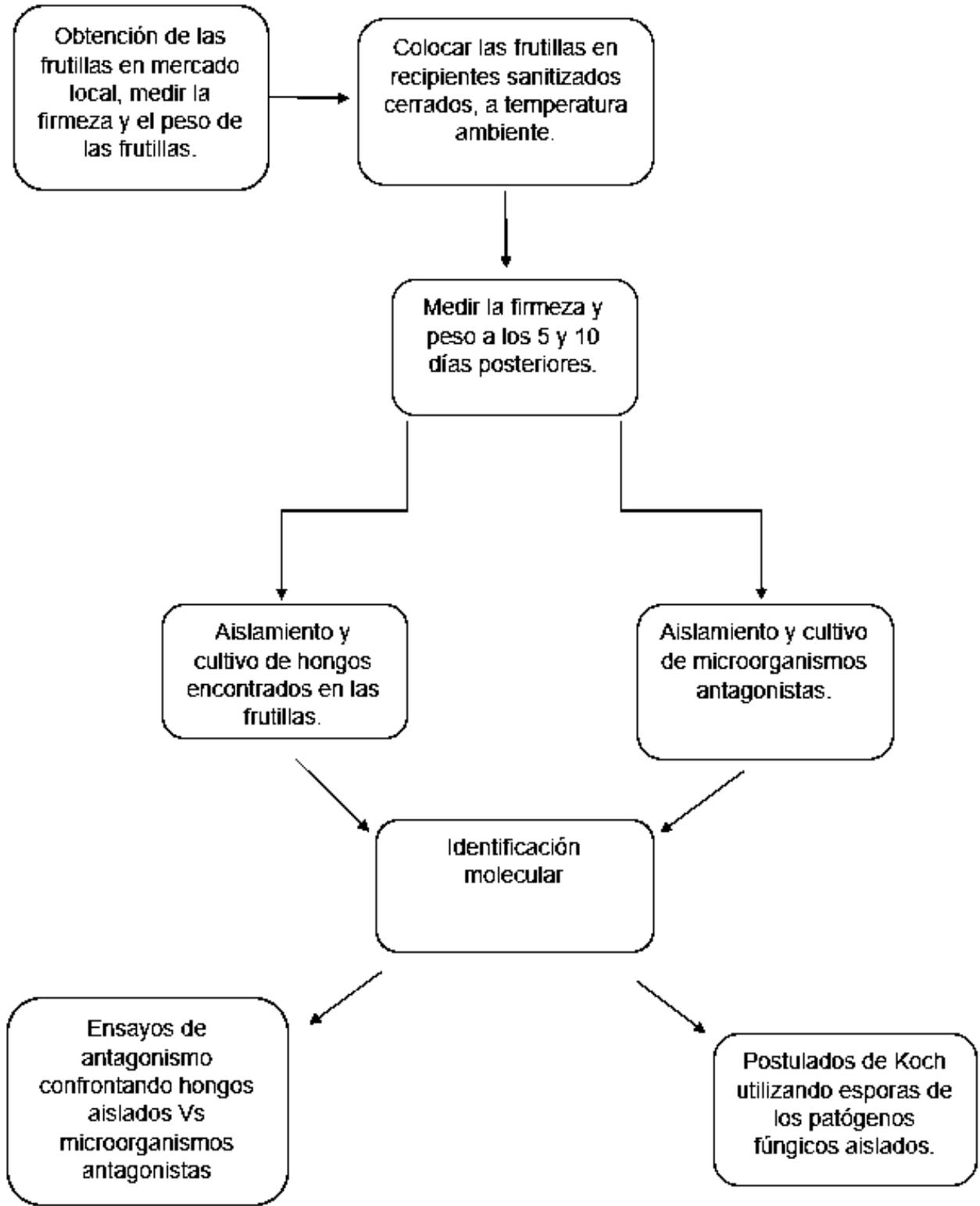
5.-Objetivo general

Aislar e identificar patógenos fúngicos que afectan a las berries postcosecha y evaluar bacterias antagonistas para su control biológico.

6.-Objetivos particulares

- Aislar e identificar patógenos fúngicos que afectan a las berries postcosecha (fresa, arándano y zarzamora).
- Aislar y caracterizar nuevos microorganismos antagonistas de fresa, arándano y zarzamora.
- Analizar el efecto de los compuestos difusibles y volátiles de los nuevos antagonistas identificados sobre el crecimiento del micelio de los patógenos fúngicos.
- Evaluar las bacterias *Pseudomonas fluorescens* UM270, *Bacillus* sp. E25, *Bacillus toyonensis* COPE52 y *Bacillus* sp. CR71 sobre el crecimiento del micelio de los patógenos fúngicos caracterizados.

7.- Estrategia experimental



8.-Materiales y Métodos

8.1 Medición y observación del decaimiento postcosecha en fresas, zarzamoras y arándanos:

Recipientes de plástico con tapa de rosca de una capacidad aproximada de 300mL fueron desinfectados con etanol al 70%, se seleccionaron 36 frutillas (36 fresas, 36 zarzamoras y 36 arándanos) con un tamaño aproximadamente igual de acuerdo con el tipo de frutilla, se realizó la medición del peso de 12 frutillas con la balanza analítica y se midió la firmeza con un esclerómetro de fruta apoyando cada frutilla sobre una superficie fija y presionándola con el esclerómetro hasta la marca del tornillo de presión, posteriormente se colocó el resto de las frutillas en los recipientes desinfectados (6 frutillas por recipiente) los cuales fueron mantenidos a temperatura ambiente. A los 5 días se realizó la medición de la firmeza y el peso de 12 frutillas y a los 10 días se realizó la medición de la firmeza y el peso de las últimas 12 frutillas.

Las frutillas fueron obtenidas del mercado Revolución ubicado en el centro histórico de la ciudad de Morelia Michoacán.

8.2 Aislamiento de hongos causantes del decaimiento postcosecha:

A los 5 días de haber colocado las frutillas en los recipientes de plástico cerrados, se tomó muestra de los hongos observados en las frutillas, las muestras fueron inoculadas en medio PDA. A los 10 días se realizó una segunda toma de muestras y se inocularon en medio PDA.

8.3 Aislamiento de nuevos microorganismos antagonistas:

Se tomaron muestras de la superficie de las frutillas y se inocularon en medio PDA. Las bacterias que crecieron y mostraban inhibición de los hongos fueron sembradas en medio agar nutritivo.

8.4 Extracción de DNA de los microorganismos aislados:

Para realizar la extracción de DNA de los microorganismos aislados de las frutillas se utilizó el protocolo modificado de Mahuku, 2004 descrito a continuación:

Un inóculo del microorganismo se colocó en un vial y se resuspendió en 300 μ L de buffer TES estéril (Tris-HCl 0.5M, EDTA 0.5 M, SDS 20%), para luego ser agitado utilizando un vortex durante 1 minuto. Se adicionaron 200 μ L de buffer TES y 1 μ L de la enzima proteinasa K y se agitó suavemente. La suspensión se incubó a 65°C por 30 minutos con agitación en termomixer, se adicionaron 250 μ L de acetato de amonio 7.5 M y agitó nuevamente con suavidad. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13 300 rpm durante 22 minutos. El sobrenadante fue transferido a un vial nuevo y se añadió un volumen semejante de isopropanol frío. Se incubó a -20°C por 18 horas, tras las cuales la mezcla se centrifugó a 13300 rpm por 17 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida fue lavada con etanol frío al 70%, se centrifugó nuevamente a 13300 rpm por 10 minutos y se desechó el

sobrenadante. La pastilla se incubó a 37°C hasta evaporar todo el etanol del vial. Se adicionaron 50 µL de agua desionizada estéril y se agitó con vortex 3 segundos. Finalmente se agregó 1 µL de la enzima RNAsa y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El DNA obtenido fue revisado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8.4.1 PCR para la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) del gen ribosomal 18S para la identificación de hongos:

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se prepararon las reacciones colocando para cada tubo: 24µL de enzima green taq DNA polimerasa, 2 µL del oligonucleótido ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y 2 µL del oligonucleótido ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', 20 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de DNA. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un lapso de desnaturalización de 4 minutos a 95° C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55° C y 40 segundos a 72° C, para terminar con un finalmente un lapso de extensión final de 7 minutos a 72° C.

Los productos amplificados fueron colocados en gel de agarosa al 1% y sometidos a electroforesis utilizando un marcador de peso molecular para ver el tamaño del amplicón.

8.4.2 PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S para la identificación de bacterias:

Se prepararon reacciones de PCR colocando para cada tubo: 24 µL de enzima green taq DNA polimerasa, 2 µL del oligonucleótido fD1, 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 2 µL del oligonucleótido rD1, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3', 20 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de DNA. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un lapso de desnaturalización de 4 minutos a 95° C seguido de 30 ciclos de un minuto a 95° C, un minuto a 55°C y dos minutos a 72° C, para terminar con un finalmente un lapso de extensión final de 2 minutos a 72° C.

Los productos amplificados fueron colocados en gel de agarosa al 1% y sometidos a electroforesis utilizando un marcador de peso molecular para ver el tamaño del amplicón.

8.5 Identificación de los microorganismos aislados:

Las reacciones obtenidas se mandaron secuenciar a Macrogen Korea, las secuencias fueron comparadas con la herramienta de búsqueda Blast de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). También se realizaron análisis filogenéticos, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa Mega 6. Para bacterias también se realizó una tinción Gram.

8.6 Postulados de Koch para corroborar los índices de infección:

Se colocó aproximadamente 1mL de agua desionizada estéril en los cultivos fúngicos seleccionados, se hizo un raspado con el asa digralsky sobre el micelio para desprender las esporas, la solución de esporas formadas se colocó en un vial para posteriormente hacer diluciones.

Se realizó el conteo de esporas utilizando la cámara de Neubauer.

Se realizó el cálculo para determinar la cantidad de esporas a inocular en las frutillas (1×10^5 esporas/mL) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/mm}^3 = \text{Esporas contadas} \times \text{dilución} / \text{superficie contada (mm}^2) \times \text{profundidad}$$

Es decir:

$$\text{Esporas/mm}^3 = \text{Esporas contadas} \times \text{dilución} / 4\text{mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$$

Las frutillas se sometieron a un lavado con agua corriente, se colocaron en un recipiente con etanol al 70% donde se lavaron por 1 minuto, se decantó el etanol y se hizo un lavado con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 1 minuto, se decantó y se volvió a agregar etanol al 70% para un tercer lavado durante 1 minuto, se decantó. Posteriormente las frutillas fueron sometidas a 3 lavados con agua desionizada estéril.

Se colocó una gasa estéril dentro de cada frasco de vidrio y posteriormente una frutilla previamente desinfectada en cada frasco y finalmente fueron inoculadas con las esporas obtenidas de los cultivos (1×10^5 esporas/mL).

8.7 Ensayos de antagonismo entre los microorganismos antagonistas aislados de frutillas, *Pseudomonas fluorescens* UM270, *Bacillus toyonensis* COPE52, *Bacillus* sp. E25 y *Bacillus* sp. CR71 (cepas antagonistas ya caracterizadas) contra los patógenos fúngicos aislados:

Se prepararon inóculos bacterianos tomando una asada de cada cultivo con un palillo de madera estéril e introduciéndolo en un tubo de ensaye con el caldo nutritivo. Se utilizó como control un palillo de madera estéril sin inóculo, introducido en un tubo con caldo nutritivo, estos fueron incubados por 24h a 29°C.

Posteriormente se midió la absorbancia a 590 nm para determinar la concentración bacteriana.

8.7.1 Ensayos de inhibición por compuestos difusibles:

Cajas Petri con medio PDA mezclado con medio agar nutritivo (1:1) fueron inoculadas en forma de cruz con cada una de las bacterias formando 4 cuadrantes, en cada cuadrante se colocó un corte de micelio de aproximadamente 6 mm de diámetro.

Como control se utilizó una caja Petri con medio PDA mezclado con agar nutritivo la cual se dividió en 4 cuadrantes, pero sin colocar las bacterias, en cada cuadrante se colocó un corte de micelio de aproximadamente 6 mm de diámetro.

Posteriormente se realizó la medición del crecimiento del micelio y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula utilizada por Hernández-León *et al.* 2015 descrita a continuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{control} - \text{tratamiento}}{\text{control}} \times 100$$

El crecimiento del micelio fue medido a determinados días, dependiendo el aislado, ya que tienen una velocidad de crecimiento distinta.

8.7.2 Ensayos de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOCs):

Cajas Petri divididas conteniendo de un lado medio agar nutritivo y del otro medio PDA fueron inoculadas con cada una de las bacterias y del otro lado con un corte de micelio de aproximadamente 6mm de diámetro del patógeno fúngico.

Posteriormente se realizó la medición del crecimiento del micelio y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula descrita anteriormente.

8.7.3 Ensayos de inhibición con *Trichoderma* sp. 4AF por compuestos orgánicos volátiles y en co-inoculación directa con los patógenos postcosecha:

Se utilizaron cajas Petri divididas con agar PDA de ambos lados, de un lado se colocó un corte de micelio de aproximadamente 6 mm de diámetro de *Trichoderma* sp. 4AF y del otro lado un corte de micelio del patógeno fúngico del mismo tamaño.

La medición del crecimiento del micelio se realizó 3 días después y se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula ya descrita anteriormente.

Para los ensayos en co-inoculación directa, en un extremo de una caja de Petri con PDA se colocó un corte de micelio de *Trichoderma* sp. 4AF de aproximadamente 6 mm de diámetro y del otro extremo se colocó un corte de micelio del patógeno fúngico de aproximadamente 6 mm de diámetro.

Como control en un extremo de una caja Petri con PDA se colocó un corte de micelio del patógeno fúngico de aproximadamente 6 mm de diámetro.

La medición del crecimiento del micelio se realizó 7 días después y se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula descrita en el paso 8.6.1.1.

8.8 Visualización del daño al micelio ocasionado a los patógenos fúngicos por los microorganismos antagonistas utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB):

Cortes de micelio de aproximadamente 6 mm de diámetro se colocaron en tubos eppendorf conteniendo formaldehído al 2% y buffer de fosfatos. Se incubaron a 4°C durante 18h.

Posteriormente se hicieron 3 lavados con buffer de fosfatos durante 10 minutos.

Los cortes del micelio se suspendieron en 500 µL de buffer de fosfatos (NaCl 130 mM, NaPO₄ 10 mM; pH 7.4) y 500 µL de etanol al 100% y se almacenaron a -20°C.

Las muestras se deshidrataron con series de etanol (70%, 80%, 90% y 100%) por 10 minutos, 3 veces y posteriormente se pusieron a secar en termomixer a 37°C hasta evaporar completamente los restos de etanol.

Por ultimo las muestras se colocaron en un desecador hasta su observación con el microscopio electrónico de barrido.

8.9 Análisis estadístico:

Los resultados se analizaron utilizando el software Statistica 8.0, se realizó un análisis de varianza y la prueba de Duncan para comparación de medias ($p < 0.05$).

9.-Resultados

9.1 Medición y observación del decaimiento postcosecha en fresas, zarzamoras y arándanos:

Se realizó la medición de los índices de decaimiento en los 3 tipos de frutillas tomando en cuenta el peso y la firmeza y observamos una disminución progresiva de estos parámetros conforme el tiempo.

En fresa se observó una pérdida de hasta del 31% del peso, comparando el peso que corresponde al día 10 con el peso del día 1 que es nuestro control.

La pérdida de la firmeza también es progresiva, en promedio la firmeza del primer día fue de 4.6 kg/cm², para el día 5 había disminuido un 39% y al día 10 la firmeza disminuyó al 56%.

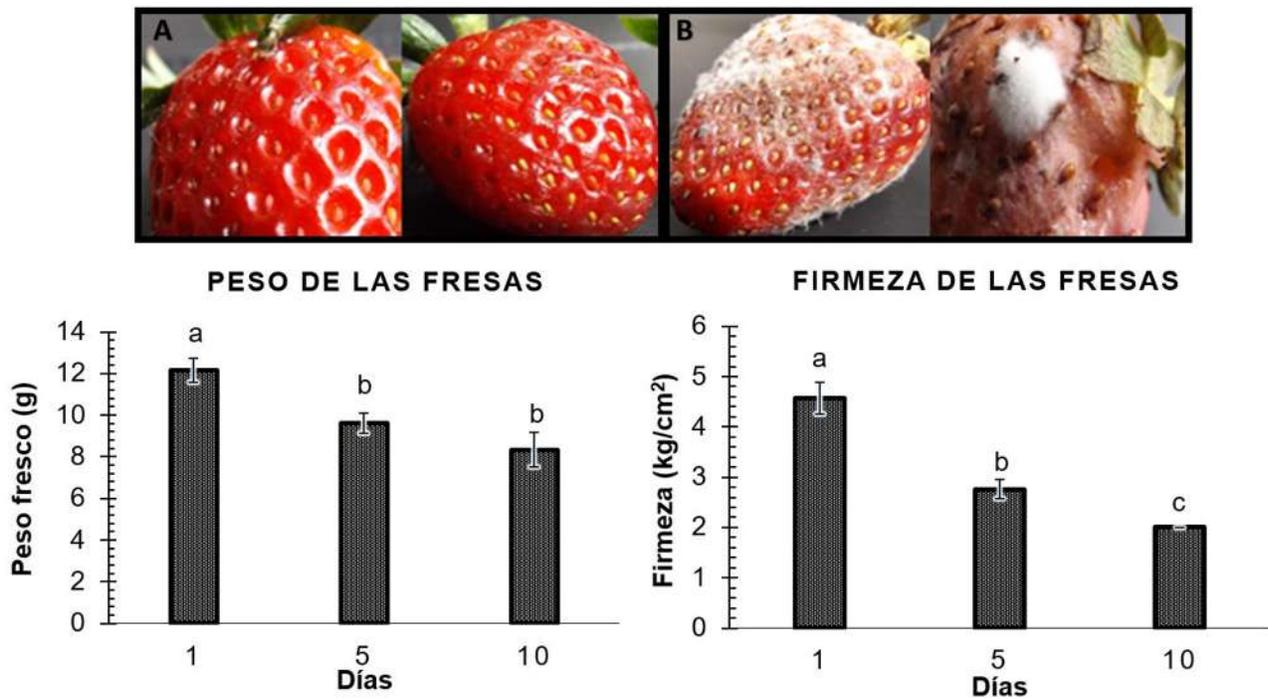


Figura 10: Decaimiento postcosecha en fresas representado por la pérdida de peso y firmeza conforme transcurren los días. Frutas representativas se muestran en los paneles A-B. (A) fruta al inicio del experimento (control). (B) Frutas en decaimiento a los 5 y 10 días. El gráfico de la izquierda muestra la disminución del peso de las fresas. El gráfico de la derecha muestra la disminución de la firmeza. Las barras representan los promedios \pm desviación estándar ($n = 12$). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

En el caso de la zarzamora, se observó un comportamiento similar, si comparamos el peso que obtuvimos al quinto día con el peso que medimos el día 1, observamos que el peso disminuyó un 13% y al décimo día había una pérdida del 19% del peso total. Por otro lado, la firmeza de este tipo de frutilla disminuyó significativamente, al comparar las medidas obtenidas el primer y quinto día observamos que la firmeza disminuyó de 4.5 kg/cm² a 2 kg/cm² que es la medida mínima que puede ser tomada con el esclerómetro, es decir, a la medición del quinto día este tipo de frutilla ya no tenía firmeza medible.

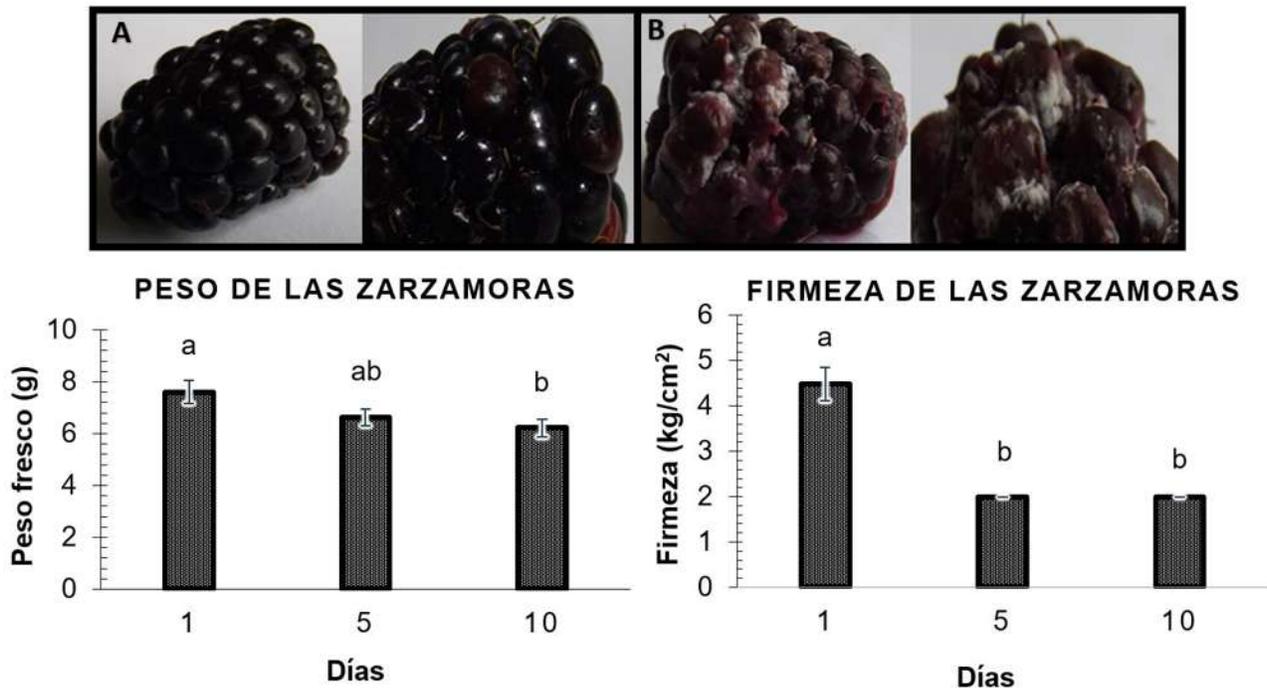


Figura 11: Decaimiento postcosecha en zarzamoras representado por la pérdida de peso y firmeza conforme transcurren los días. Frutas representativas se muestran en los paneles A-B. (A) fruta al inicio del experimento (control). (B) Frutas en decaimiento a los 5 y 10 días. El gráfico de la izquierda muestra la disminución del peso de las zarzamoras. El gráfico de la derecha muestra la disminución de la firmeza. Las barras representan los promedios \pm desviación estándar ($n = 12$). Las letras indican que las medias difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

En el caso de los arándanos, el peso disminuyó del primer al quinto día un 15% y del quinto al décimo día un 8% adicional, teniendo en total una pérdida del 23% del peso. Mientras que la firmeza disminuyó del primer al quinto día un 16% y del quinto al décimo día un 13%, en total una pérdida del 29% de la firmeza.

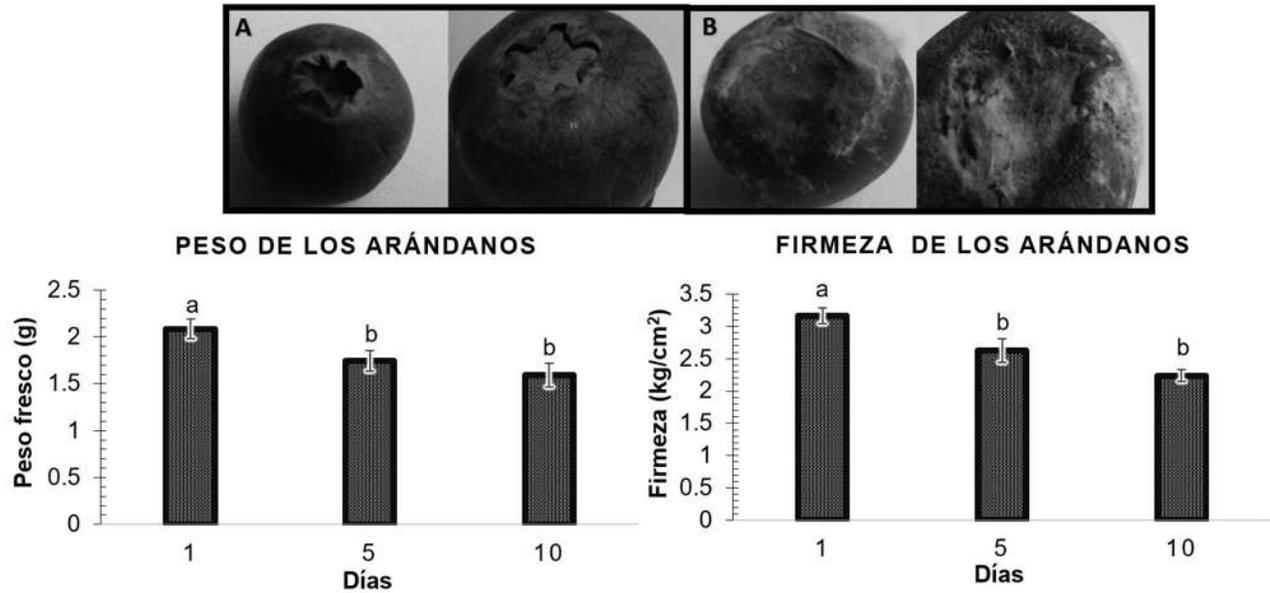


Figura 12: Decaimiento postcosecha en arándanos representado por la pérdida de peso y firmeza conforme transcurren los días. Frutas representativas se muestran en los paneles A-B. (A) fruta al inicio del experimento (control). (B) Frutas en decaimiento a los 5 y 10 días. El gráfico de la izquierda muestra la disminución del peso de los arándanos. El gráfico de la derecha muestra la disminución de la firmeza. Las barras representan los promedios \pm desviación estándar ($n = 12$). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

9.2 Aislamiento e identificación de patógenos fúngicos que afectan a las berries postcosecha (fresa, arándano y zarzamora):

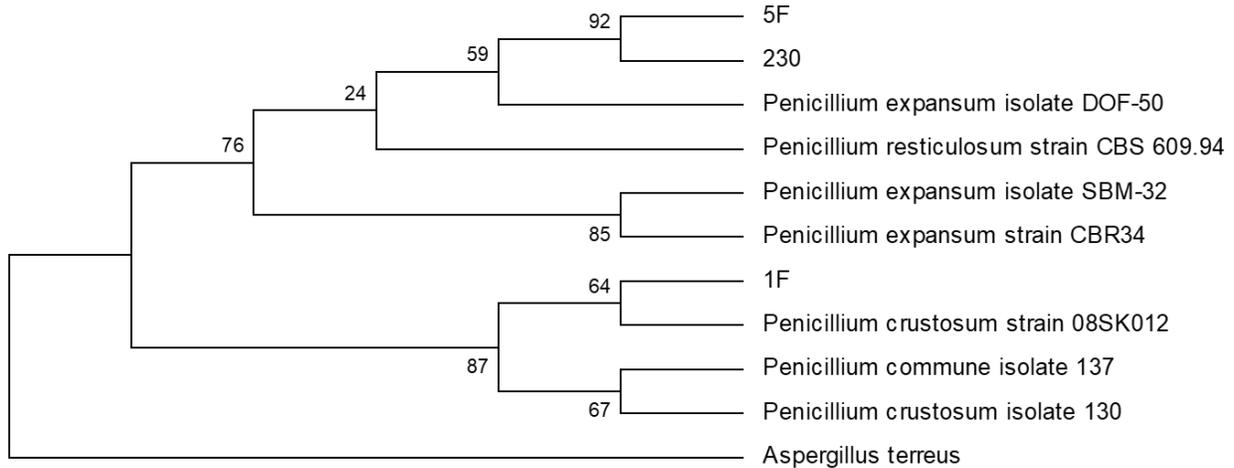
Se lograron aislar e identificar 12 hongos de fresas, 2 de zarzamoras y 6 de arándanos, en total 20 hongos pertenecientes a 9 géneros fúngicos. Algunos de ellos son: fitopatógenos, patógenos postcosecha, saprofitos y oportunistas (Woudenberg *et al.*, 2013, Phillips *et al.*, 2013, Elad *et al.*, 2004, Bensch *et al.*, 2012, Naureen *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 1979, He *et al.*, 2010, Vinale *et al.*, 2007, Moretti, 2009). En la tabla 6 se describe el género y especie de cada aislado, el porcentaje de identidad, número de acceso del GenBank y la fuente de aislamiento.

Tabla 4: Hongos aislados e identificados, cada aislado muestra el porcentaje de identidad comparado en el GenBank y el número de acceso, así como la fuente de aislamiento.				
Aislado	Género y especie	% identidad GenBank	# de acceso del GenBank	Fuente de aislamiento
62BCV	<i>Botrytis cinerea</i>	99.8	MN080331	Fresas
62C	<i>Botrytis sp.</i>	99.4	MK880497	
4BF	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	99.2	MN393696	
HBF	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	98.3	MN365051	
FRB	<i>Geotrichum candidum</i>	98.3	MN365013	
1BF	<i>Mucor circinelloides</i>	99.1	MN365015	
22	<i>Mucor fragilis</i>	99	MN080332	
FRA	<i>Mucor fragilis</i>	99	MN365050	
1F	<i>Penicillium crustosum</i>	96.8	MN365049	
230	<i>Penicillium expansum</i>	99.6	MN364941	
5F	<i>Penicillium expansum</i>	99.6	MN394447	
4AF	<i>Trichoderma sp.</i>	98.8	MN365017	
2Z	<i>Alternaria alternata</i>	99	MK881030	
7Z	<i>Geotrichum phurueaensis</i>	98	MN364646	
1A	<i>Alternaria alternata</i>	99.6	MN397936	Arándanos
3A	<i>Alternaria sp.</i>	99.4	MN393668	
4A	<i>Alternaria alternata</i>	96.2	MN410562	
6A	<i>Alternaria alternata</i>	97.3	MN364705	
5A	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	99.4	MN365025	
1BOA	<i>Cladosporium sp.</i>	98.8	MN397937	

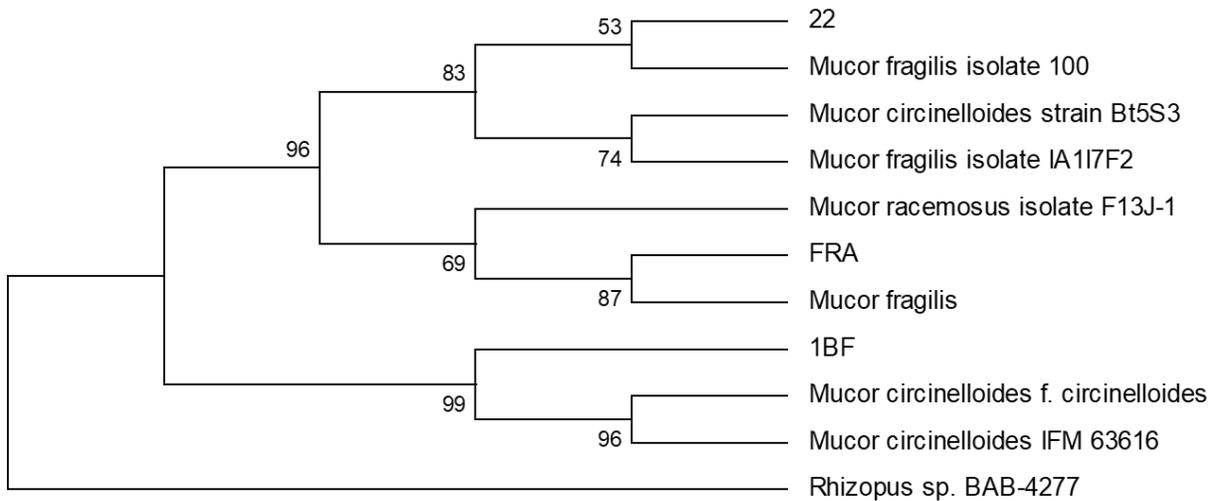
9.2.1 Análisis filogenético de los hongos aislados:

Los árboles filogenéticos construidos con el programa Mega 6 se muestran a continuación:

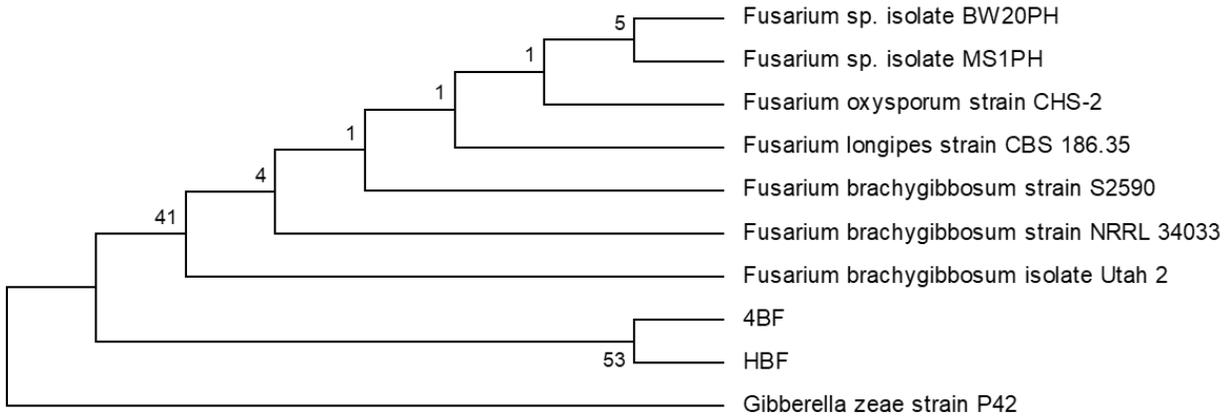
Los aislados 5F, 230 y 1F se agrupan en el género *Penicillium*.



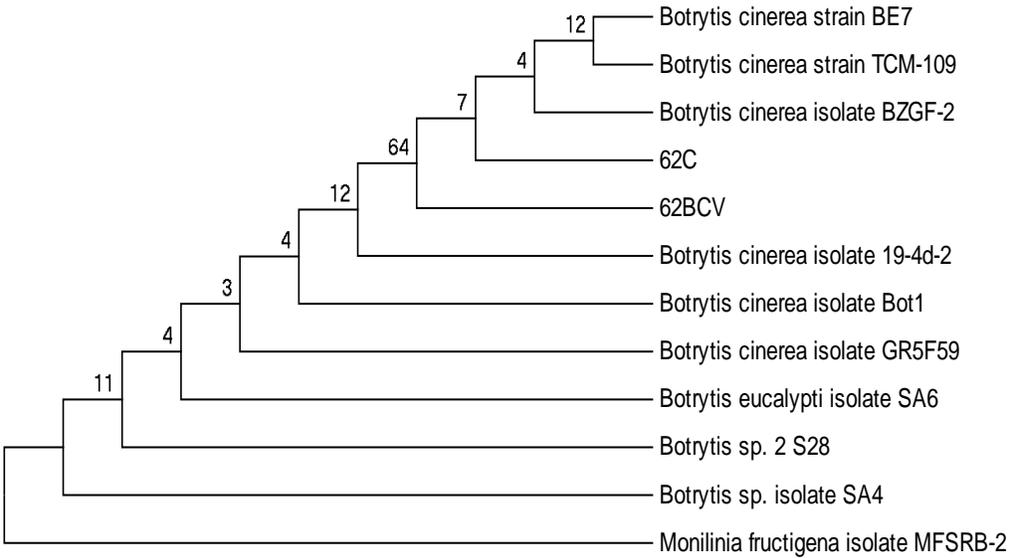
Los aislados 22, FRA, y 1BF se agrupan en el género *Mucor*.



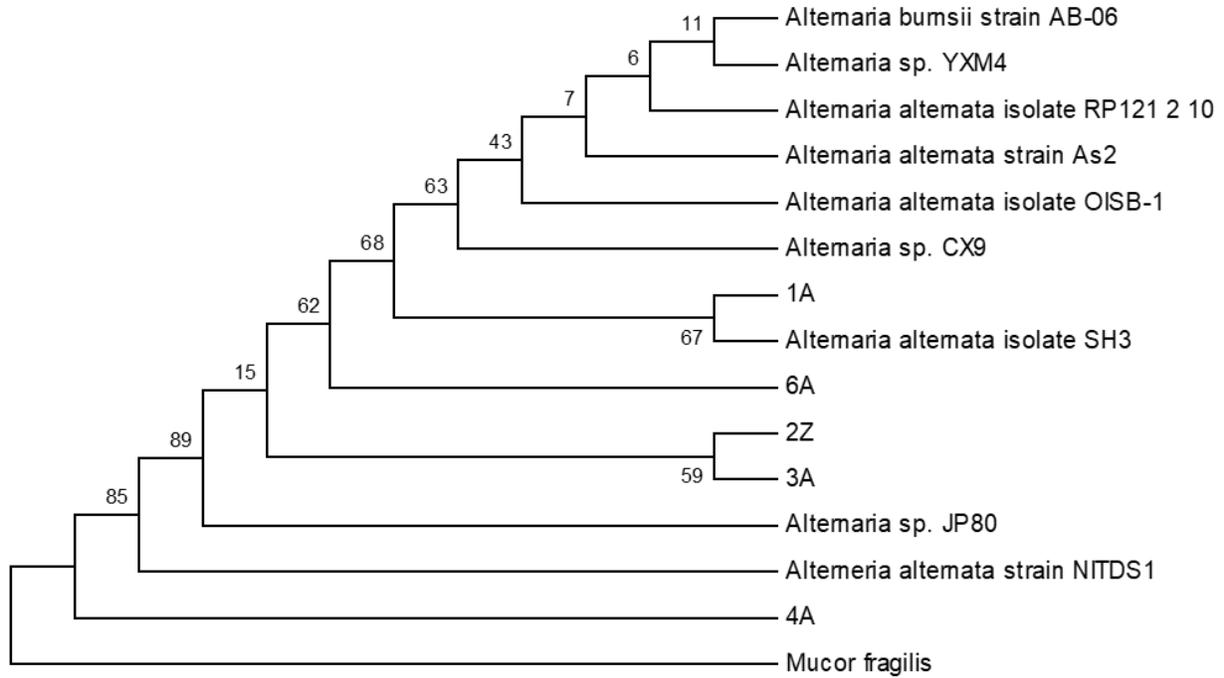
Los aislados 4BF y HBF se agrupan en el género *Fusarium*.



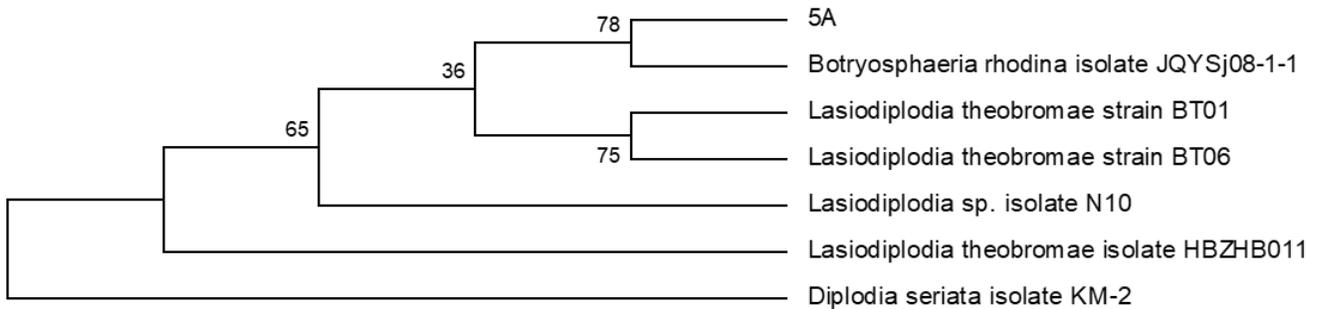
Los aislados 62C y 62BCV se agrupan en el género *Botrytis*.



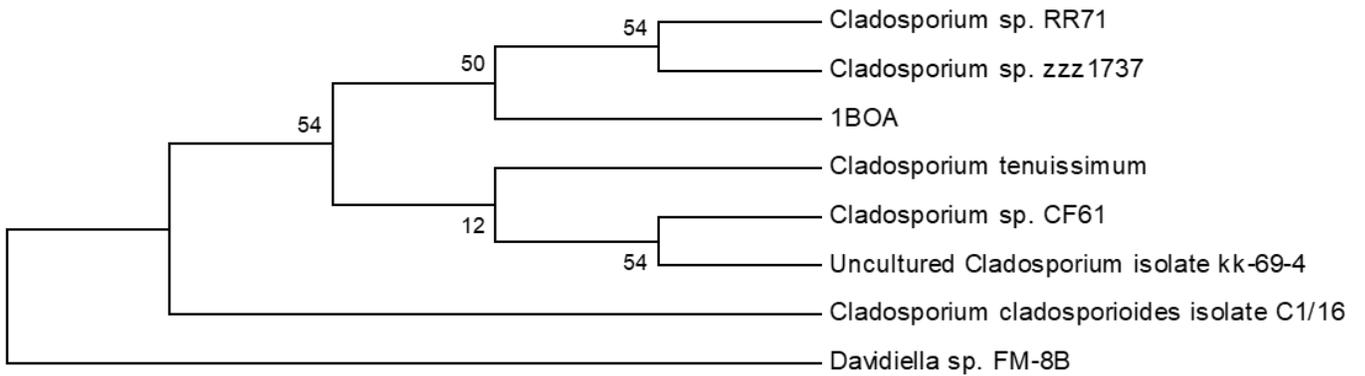
Los aislados 1A, 2Z, 3A, 4A, y 6A se agrupan en el género *Altemaria*:



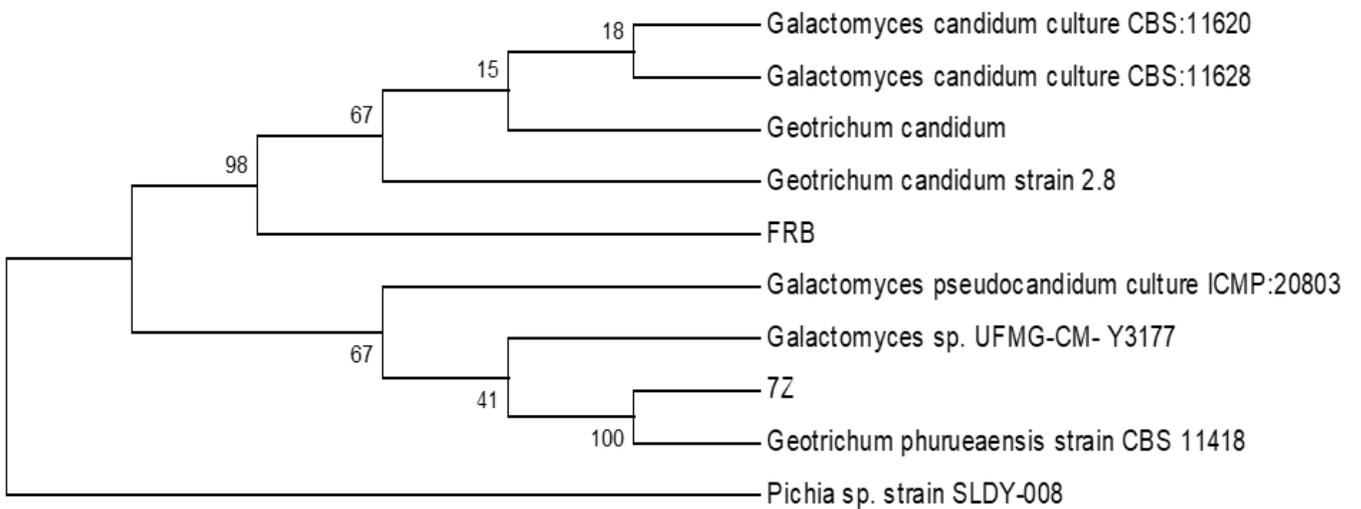
El aislado 5A se agrupa en el género *Botryosphaeria*.



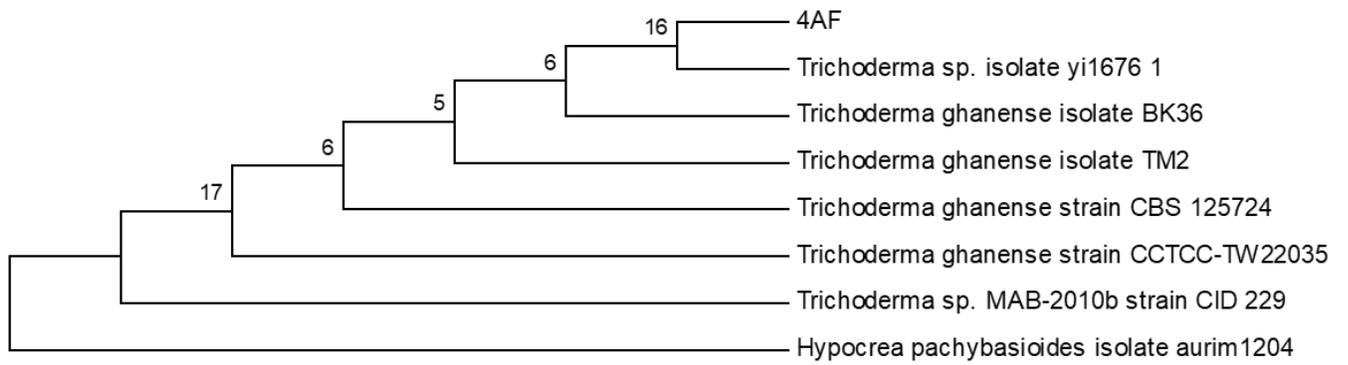
El aislado 1BOA se agrupa en el género *Cladosporium*.



Los aislados FRB y 7Z se agrupan en el género *Geotrichum*.



El aislado 4AF se agrupa en el género *Trichoderma*.



9.3 Aislamiento e identificación de nuevos microorganismos antagonistas:

Se observó crecimiento bacteriano alrededor de un corte de fresa que fue inoculado en medio PDA, también un halo de inhibición y en la parte más externa el crecimiento de hongo (Fig. 14). En la fig. 13 se observa una fresa infectada con un hongo de micelio blanco algodónoso de crecimiento limitado, de esta frutilla fueron aislados dos microorganismos antagonistas, la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3 y el hongo *Trichoderma* sp. 4AF.



Figura 13: Fresa de donde fueron aislados los nuevos microorganismos antagonistas (*Trichoderma* sp. 4AF y *Rahnella aquatilis* SER3). El micelio de color blanco corresponde a *Fusarium brachygibbosum* y fue inoculado en medio PDA a parte del corte de fresa.



Figura 14: Corte de fresa inoculado en medio PDA donde se observa el crecimiento bacteriano (*R. aquatilis* SER3), seguido de un halo y en la parte más externa crecimiento de hongo (*Trichoderma* sp. 4AF).

En la figura 15 se muestra el cultivo puro de la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3 obtenido mediante resiembras. En la figura 16 se muestra el cultivo puro del hongo *Trichoderma* sp. 4AF obtenido mediante resiembras.



Figura 15: Cultivo purificado de *Rahnella aquatilis* SER3 en medio agar nutritivo.



Figura 16: Cultivo purificado de *Trichoderma* sp. 4AF en medio PDA.

9.3.1 Identificación de los microorganismos antagonistas aislados:

El hongo obtenido corresponde al aislado 4AF, los resultados de la identificación y el análisis filogenético se muestran en los apartados 9.2 y 9.2.1.

En el caso del aislado bacteriano obtenido, la tinción gram reveló la presencia de bacillos gram negativos (Fig. 17).

Al notar el halo de inhibición mostrado en la fig. 14 se pensó que esta bacteria podría tener actividad de biocontrol, por lo tanto, se realizaron ensayos de antagonismo para corroborar si inhibía el crecimiento de los hongos aislados (los resultados de inhibición se muestran más adelante).

Los resultados obtenidos de la Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) de esta cepa bacteriana y del aislado 4AF se muestran en la tabla 5.

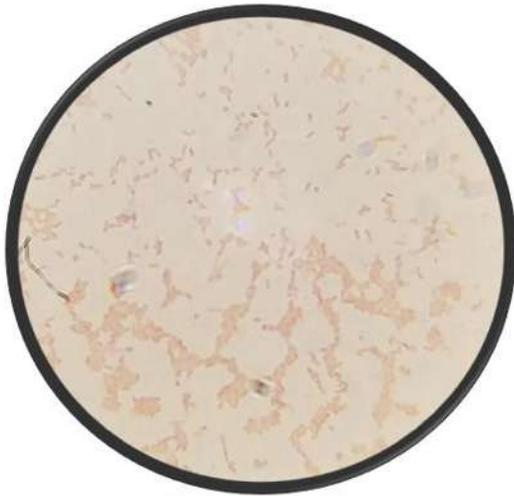


Figura 17: Tinción gram de *Rahnella aquatilis* SER3 observada con microscopio óptico con objetivo de 100X.

Tabla 5: Microorganismos antagonistas aislados.

Aislado	Género y especie	% identidad GenBank
4AF	<i>Trichoderma</i> sp.	99
SER3	<i>Rahnella aquatilis</i>	94

9.4 Índices de infección ocasionados por hongos no reportados como principales patógenos postcosecha de berries:

Un total de 18 arándanos inoculados con una solución de esporas de *Cladosporium* sp. 1BOA mostraron que este hongo es capaz de infectar al 39% de estas frutillas. Por otra parte, *Penicillium expansum* causa infección en el 100% de las fresas inoculadas, mientras que *Mucor circinelloides* 1BF, es capaz de infectar al 89% de las fresas. En la fig. 18 se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados y en la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos de los índices de infección de los 3 aislados ensayados.

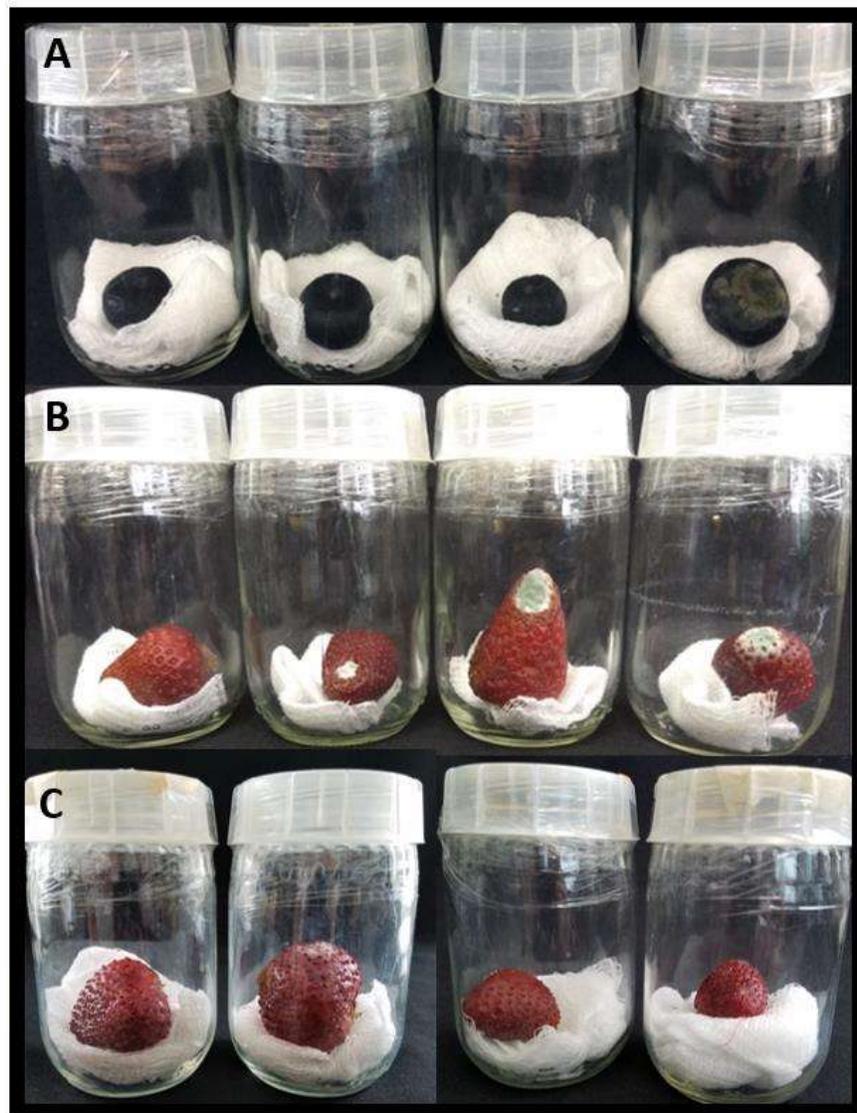


Figura 18: Frutillas infectadas (n=18) con soluciones de esporas (1×10^5 esporas/mL). En el panel A se observan arándanos inoculados con esporas de *Cladosporium* sp. 1BOA. En el panel B fresas inoculadas con esporas de *P. expansum* 230 y en el panel C fresas inoculadas con esporas de *Mucor circinelloides* 1BF.

Tabla 6: Porcentaje de frutas infectadas con los aislados 1BOA, 230 y 1BF

Hongo	Porcentaje de frutas infectadas
<i>Cladosporium</i> sp. 1BOA	39%
<i>Penicillium expansum</i> 230	100%
<i>Mucor circinelloides</i> 1BF	89%

n=18

9.5 Efecto de los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresas:

Los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas mostraron inhibición del crecimiento de los hongos que fueron aislados de fresas, los resultados se muestran en la tabla 7. La mayoría de las cepas provoca diferencias significativas en el crecimiento de los hongos comparados con sus respectivos controles, sin embargo, las cepas que provocan los mayores porcentajes de inhibición son *Pseudomonas fluorescens* UM270 y *Rahnella aquatilis* SER3. En la fig. 19 se muestran imágenes representativas de los ensayos de inhibición por compuestos difusibles de las diferentes cepas sobre el crecimiento de *Botrytis* y *Fusarium*, principales géneros fúngicos causantes de enfermedad postcosecha en berries.

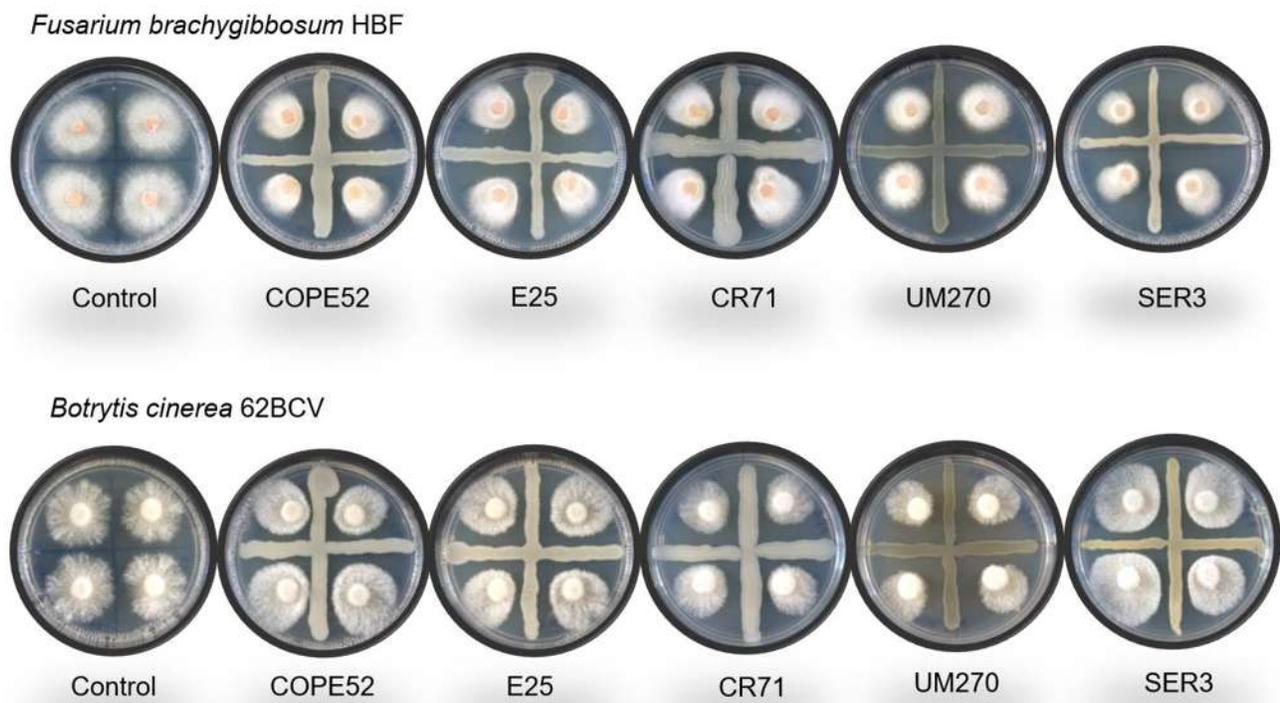


Figura 19: Efecto de los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas en co-inoculación directa con los principales géneros fúngicos patógenos de berries (*Fusarium* y *Botrytis*).

Tabla 7: Porcentajes de inhibición por compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresa.

Tratamiento	Inhibición por compuestos difusibles (%)					
	<i>P. crustosum</i> 1F	<i>M. circineoides</i> 1BF	<i>P. expansum</i> 230	<i>M. fragilis</i> 22	<i>F. brachygibbosum</i> 4BF	<i>P. expansum</i> 5F
<i>B. toyonensis</i> COPE52	5.8±28.2a	7.0±3.0a	9.7±19.5a	15.8±6.4b	14.0±8.6ab	13.3±14.4abc
<i>Bacillus</i> sp. E25	10.3±14.4ab	14.6±4.1ab	6.9±4.9a	18.8±5.4b	28.0±7.9bd	7.0±10.3ab
<i>Bacillus</i> sp. CR71	17.3±9.2ab	14.2±5.3ab	20.8±10.7ab	30.7±10.4c	38.1±19.6cd	24.2±13.3abc
<i>P. fluorescens</i> UM270	40.8±10.1b	12.1±7.8a	45.4±8.3bc	12.8±4.4b	45.1±6.8cd	41.4±20.7bc
<i>R. aquatilis</i> SER3	28.6±23.3ab	28.6±17.1b	52.4±31.7c	13.1±7.0b	56.2±7.9c	46.5±35.3c
	<i>Botrytis</i> sp. 62C	<i>B. Cinerea</i> 62BCV	<i>M. fragilis</i> FRA	<i>G. candidum</i> FRB	<i>F. brachygibbosum</i> HBF	
<i>B. toyonensis</i> COPE52	13.6±21.7ab	11.5±5.3a	N.I.	12.2±9.3ab	29.5±8.3d	
<i>Bacillus</i> sp. E25	28.5±9.6bc	17.2±7.3ab	9.1±21.2a	21.2±9.5ab	34.3±2.8cd	
<i>Bacillus</i> sp. CR71	48.4±6.0c	35.0±7.2b	8.4±29.8a	26.4±13.9b	29.8±4.8d	
<i>P. fluorescens</i> UM270	78.6±0.4d	62.6±25.9c	N.I.	60.7±23.1c	45.0±12.2bc	
<i>R. aquatilis</i> SER3	36.2±14.3c	16.6±4.2ab	8.6±14.7a	28.0±11.6b	50.6±5.8b	

(±) desviación estándar (n = 3). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (p<0.05). N.I. Indica que no hay inhibición.

9.5.1 Efecto de los compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamoras y arándanos:

Para la mayoría de los aislados obtenidos de frutillas de zarzamora y arándanos hubo porcentajes de inhibición significativos con las cepas bacterianas ensayadas. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Cabe resaltar que la cepa UM270 es la que provoca los mayores porcentajes de inhibición para la mayoría de los aislados, con excepción de *Alternaria alternata* 1A, aislado que muestra mayor inhibición de su crecimiento en presencia de la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3.

Tabla 8: Porcentajes de inhibición por compuestos difusibles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamora y arándano.

Tratamiento	Inhibición por compuestos difusibles (%)			
	<i>A. alternata</i> 1A	<i>Cladosporium</i> sp. 1BOA	<i>A. alternata</i> 2Z	<i>Alternaria</i> sp. 3A
<i>B. toyonensis</i> COPE52	28.3±4.9b	39.2±11.7c	N.I.	4.9±11.2a
<i>Bacillus</i> sp. E25	40.7±5.8c	48.6±6.2bc	N.I.	14.0±9.6a
<i>Bacillus</i> sp. CR71	40.4±11.2c	45.5±8.9bc	N.I.	13.8±10.4a
<i>P. fluorescens</i> UM270	43.6±4.8c	59.5±5.3bc	22.4±6.8ab	36.6±9.8ab
<i>R. aquatilis</i> SER3	47.8±7.0c	44.2±14.7b	N.I.	18.6±15.7b
	<i>A. alternata</i> 4A	<i>B. rhodina</i> 5A	<i>A. Alternata</i> 6A	<i>G. Phurueaensis</i> 7Z
<i>B. toyonensis</i> COPE52	16.4±9.3d	9.2±5.7b	1.9±0.6a	22.7±4.1c
<i>Bacillus</i> sp. E25	27.6±6.8bcd	8.4±1.5b	5.5±8.5a	37.7±7.3b
<i>Bacillus</i> sp. CR71	32.0±10.9bc	12.6±3.8b	16.6±7.0a	35.4±8.8b
<i>P. fluorescens</i> UM270	40.9±12.0b	12.5±8.9b	34.1±7.8b	52.6±8.3d
<i>R. aquatilis</i> SER3	23.0±1.2cd	9.7±1.9b	7.1±20.8c	2.6±6.9a

(±) desviación estándar (n = 3). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (p<0.05). N.I. significa que no hay inhibición.

9.6 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresas:

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar la capacidad antagonista de las cepas bacterianas por producción de compuestos orgánicos volátiles sobre el crecimiento de los hongos aislados obtenidos de fresas se muestran en la tabla 9. Observamos que para la mayoría de los aislados no hay inhibición o no es significativa a excepción de los aislados: *P. expansum* 230 y 5F, donde se muestra un porcentaje de inhibición del 43.6% y 34.1% respectivamente con la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3 y *F. brachygibbosum* 4BF con un porcentaje de inhibición del 26%, también con la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3.

Tabla 9: Porcentajes de inhibición por compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de fresa.

Tratamiento	Inhibición por compuestos volátiles (%)					
	<i>P. crustosum</i> 1F	<i>M. circinelloides</i> 1BF	<i>P. expansum</i> 230	<i>M. fragilis</i> 22	<i>F. brachygibbosum</i> 4BF	<i>P. expansum</i> 5F
<i>B. toyonensis</i> COPE52	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>Bacillus</i> sp. E25	2.4±36.8b	N.I.	N.I.	N.I.	2.3±2.5b	N.I.
<i>Bacillus</i> sp. CR71	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	1.7±6.7b	N.I.
<i>P. fluorescens</i> UM270	6.5±38.8b	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<i>R. aquatilis</i> SER3	16.8±24.1b	N.I.	43.6±39.4a	N.I.	26.0±25.9a	34.1±59.6a
	<i>Botrytis</i> sp. 62C	<i>Botrytis cinerea</i> 62BCV	<i>M. fragilis</i> FRA	<i>G. candidum</i> FRB	<i>F. brachygibbosum</i> HBF	
<i>B. toyonensis</i> COPE52	33.1±35.6b	8.7±6.7b	12.4±14.4b	0.4±2.3b	N.I.	
<i>Bacillus</i> sp. E25	36.4±27.2b	14.5±17.2b	5.8±10.6b	2.8±6.9b	N.I.	
<i>Bacillus</i> sp. CR71	15.5±46.5b	19.7±14.1b	9.6±8.3b	N.I.	N.I.	
<i>P. fluorescens</i> UM270	44.6±37.8b	4.1±3.5b	N.I.	5.8±7.5b	N.I.	
<i>R. aquatilis</i> SER3	37.0±37.1b	17.2±16.8b	N.I.	13.7±19.4b	9.2±13.7a	

. (±) desviación estándar (n = 3). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (p<0.05). N.I. Significa que no hay inhibición.

9.6.1 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamoras y arándanos:

Los resultados obtenidos de los ensayos de antagonismo por compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas contra los hongos aislados de zarzamora y arándanos se muestran en la tabla 10. Para estos aislados fúngicos no hay inhibición de su crecimiento, o esta no es significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

Tabla 10: Porcentajes de inhibición por compuestos orgánicos volátiles de las bacterias antagonistas sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de zarzamora y arándanos

Tratamiento	Inhibición por compuestos volátiles (%)			
	<i>A. alternata</i> 1A	<i>Cladosporium</i> sp. 1BOA	<i>A. alternata</i> 2Z	<i>Alternaria</i> sp. 3A
<i>B. toyonensis</i> COPE52	6.4±6.9b	N.I.	N.I.	0.5±5.2b
<i>Bacillus</i> sp. E25	8.4±8.7b	1.3±15.0b	N.I.	2.4±6.2b
<i>Bacillus</i> sp. CR71	7.3±6.4b	5.8±5.7b	N.I.	4.1±2.1b
<i>P. fluorescens</i> UM270	17.4±8.1b	N.I.	N.I.	4.3±5.9b
<i>R. aquatilis</i> SER3	13.2±7.4b	N.I.	N.I.	8.9±9.4b
	<i>A. alternata</i> 4A	<i>B. rhodina</i> 5A	<i>A. alternata</i> 6A	<i>G. phurueaensis</i> 7Z
<i>B. toyonensis</i> COPE52	13.6±14.9b	3.5±6.1b	N.I.	4.3±16.2b
<i>Bacillus</i> sp. E25	11.3±3.6b	1.2±9.5b	N.I.	5.7±19.2b
<i>Bacillus</i> sp. CR71	22.0±12.9b	2.8±1.3b	N.I.	3.4±20.3b
<i>P. fluorescens</i> UM270	27.8±28.0b	6.1±11.6b	5.4±2.1b	N.I.
<i>R. aquatilis</i> SER3	30.0±39.7b	1.3±3.8b	N.I.	N.I.

(±) desviación estándar (n = 3). Las letras indican que los promedios difieren significativamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (p<0.05). N.I. Indica que no hay inhibición.

9.6.2 *Rahnella aquatilis* SER3 como agente biocontrol de hongos postcosecha:

La bacteria *Rahnella aquatilis* SER3 aislada de frutas de fresa, mostró un buen porcentaje de inhibición por compuestos difusibles para varios de los aislados fúngicos obtenidos, particularmente para algunos de los principales géneros que afectan a diversas frutas y vegetales en postcosecha como son: *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Mucor*, *Geotrichum* y *Alternaria*. En la figura 20 se grafican los porcentajes de inhibición por compuestos difusibles de *Rahnella aquatilis* SER3 para cada uno de los aislados obtenidos.

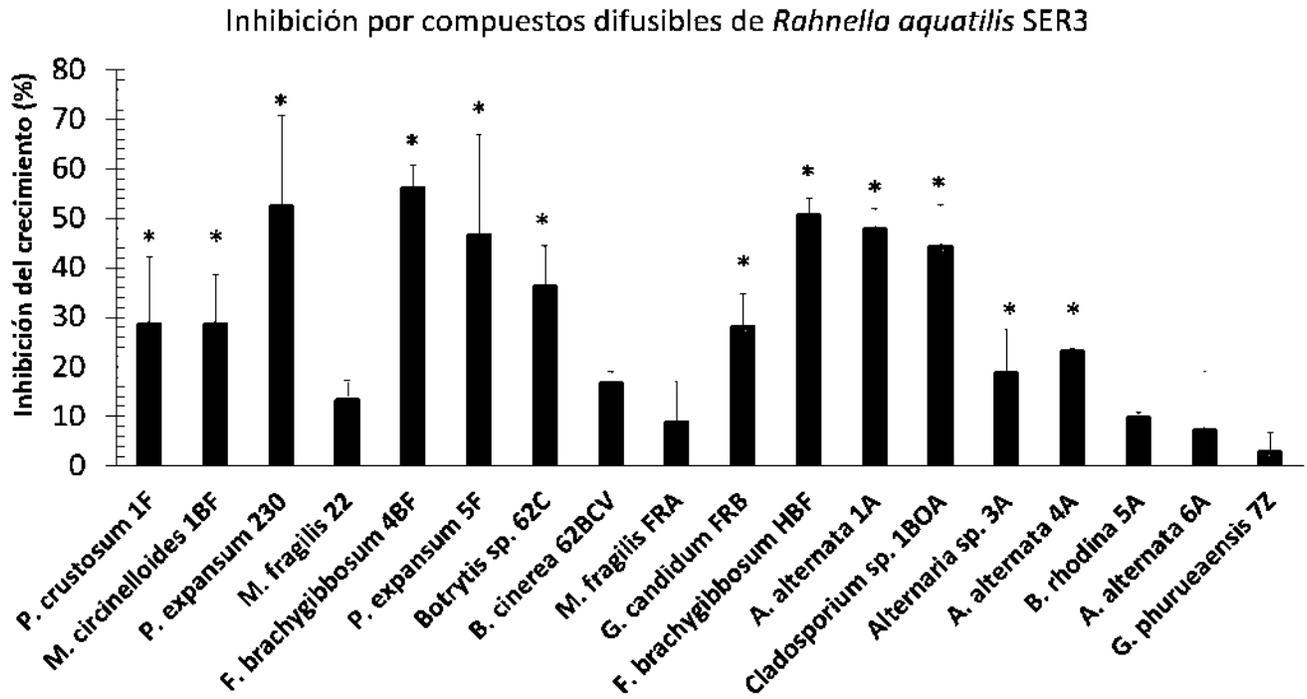


Figura 20: Gráfica de los porcentajes de inhibición causados por compuestos difusibles de *Rahnella aquatilis* SER3 con los hongos aislados de berries postcosecha. Los experimentos fueron realizados independientemente tres veces. Las barras representan los valores de la media \pm SE. El * indica que los promedios difieren significativamente comparados con sus respectivos controles de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

Por compuestos orgánicos volátiles, la bacteria *Rahnella aquatilis* SER3 mostró porcentajes de inhibición significativos para los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. En los aislados 230 y 5F los porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio fueron de 43.6% y 34.1% respectivamente. Para el aislado 4BF el porcentaje de inhibición fue del 56.2%.

En la figura 21 se muestra en una gráfica los porcentajes de inhibición causados por compuestos orgánicos volátiles de SER3 contra los hongos aislados de berries.

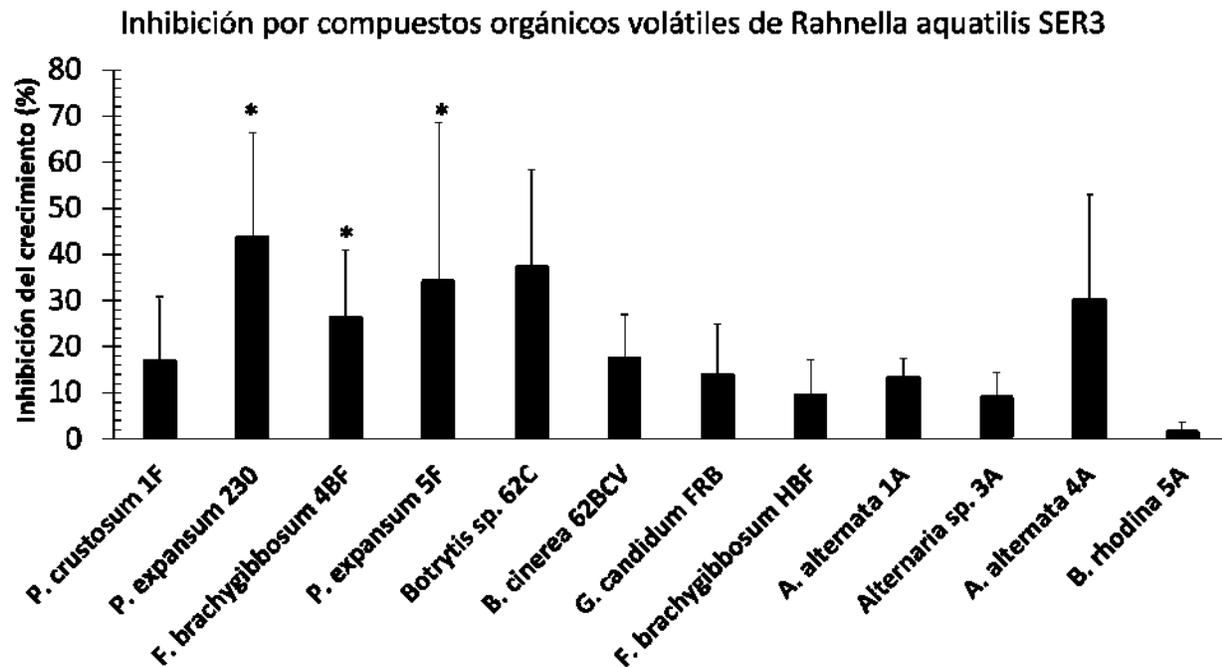


Figura 21: Gráfica de los porcentajes de inhibición ocasionados por los compuestos orgánicos volátiles de *Rahnella aquatilis* SER3 sobre el crecimiento del micelio de los hongos aislados de berries. Los experimentos fueron realizados independientemente tres veces. Las barras representan los valores de la media \pm SE. El * indica que los promedios difieren significativamente comparados con sus respectivos controles de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

9.7 Ensayos de *Trichoderma* sp. 4AF en co-inoculación directa con los principales patógenos postcosecha aislados:

Trichoderma sp. 4AF mostró reducir el crecimiento de los principales géneros fúngicos que se han reportado como agentes causales de enfermedad postcosecha de una variedad de frutas y vegetales, entre ellos *Botrytis* y *Fusarium*, principales agentes causales de enfermedad postcosecha en berries. Los resultados se muestran en la tabla 11. Observamos que *Trichoderma* sp. 4AF inhibe significativamente en co-inoculación directa todos los aislados, con excepción de *Mucor circinelloides* 1BF.

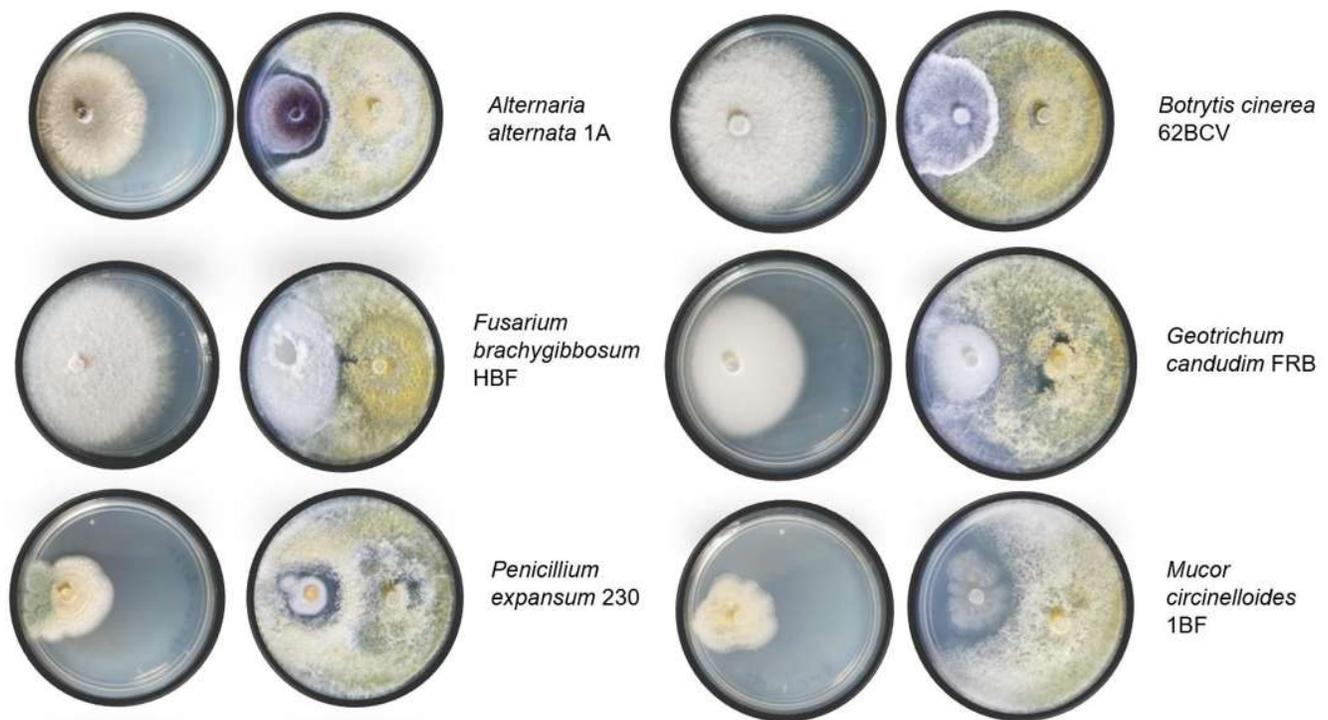


Figura 22: Ensayos de *Trichoderma* sp. 4AF en co-inoculación directa con los principales géneros fúngicos que causan enfermedad postcosecha en diversas frutas y vegetales. Los experimentos fueron realizados independientemente 3 veces, los resultados y el estadístico se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Porcentajes de inhibición de los principales géneros fúngicos reportados como patógenos postcosecha en confrontación con *Trichoderma* sp. 4AF.

Tratamiento	Inhibición del crecimiento del micelio (%)		
	<i>Trichoderma</i> sp. 4AF	<i>Alternaria alternata</i> 1A	<i>Botrytis cinerea</i> 62BCV
38.5*		44.8*	33.6*
<i>Geotrichum candidum</i> F.R.B.		<i>Mucor circinelloides</i> 1BF	<i>Penicillium expansum</i> 230
42*		4.3	50.1*

(n=3), * Indica diferencia significativa con respecto al control de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

9.7.1 Ensayos de antagonismo por compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sp. 4AF contra los principales patógenos postcosecha aislados:

Al realizar los ensayos por compuestos orgánicos volátiles observamos que no hay diferencias significativas en los porcentajes de inhibición comparados con el control. Los resultados se muestran en la tabla 12. *Trichoderma* provoca poca inhibición del crecimiento del micelio de los aislados, o esta no es significativa de acuerdo con el análisis estadístico.

Tabla 12: Porcentajes de inhibición de los principales géneros fúngicos reportados como patógenos postcosecha en confrontación con compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma* sp. 4AF.

Tratamiento	Inhibición del crecimiento del micelio (%)		
<i>Trichoderma</i> sp. 4AF	<i>Alternaria alternata</i> 1A	<i>Botrytis cinerea</i> 62BCV	<i>Fusarium brachygibbosum</i> HBF
	18.5	N.I.	1.3
	<i>Geotrichum candidum</i> F.R.B.	<i>Mucor circinelloides</i> 1BF	<i>Penicillium expansum</i> 230
	1	11	5.2

(N.I.) Indica que no hay inhibición, n=3 prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$).

9.8 Visualización del daño al micelio ocasionado a los patógenos fúngicos por los microorganismos antagonistas utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB):

Ya que *Botrytis cinerea* es uno de los principales patógenos postcosecha en berries y que *Pseudomonas fluorescens* UM270 mostró el mayor porcentaje de inhibición de este patógeno, se decidió observar el daño al micelio ocasionado por los compuestos difusibles de esta bacteria utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB). En las imágenes del control (paneles A y B) observamos la estructura de una hifa en condiciones normales, con una superficie lisa. Sin embargo, en presencia de UM270 (paneles C y D) las hifas sufren daños, se observan cambios en su morfología, forman protuberancias superficiales, lo que indica que UM270 inhibe el crecimiento de *B. cinerea* al causar deformación de la estructura de las hifas.

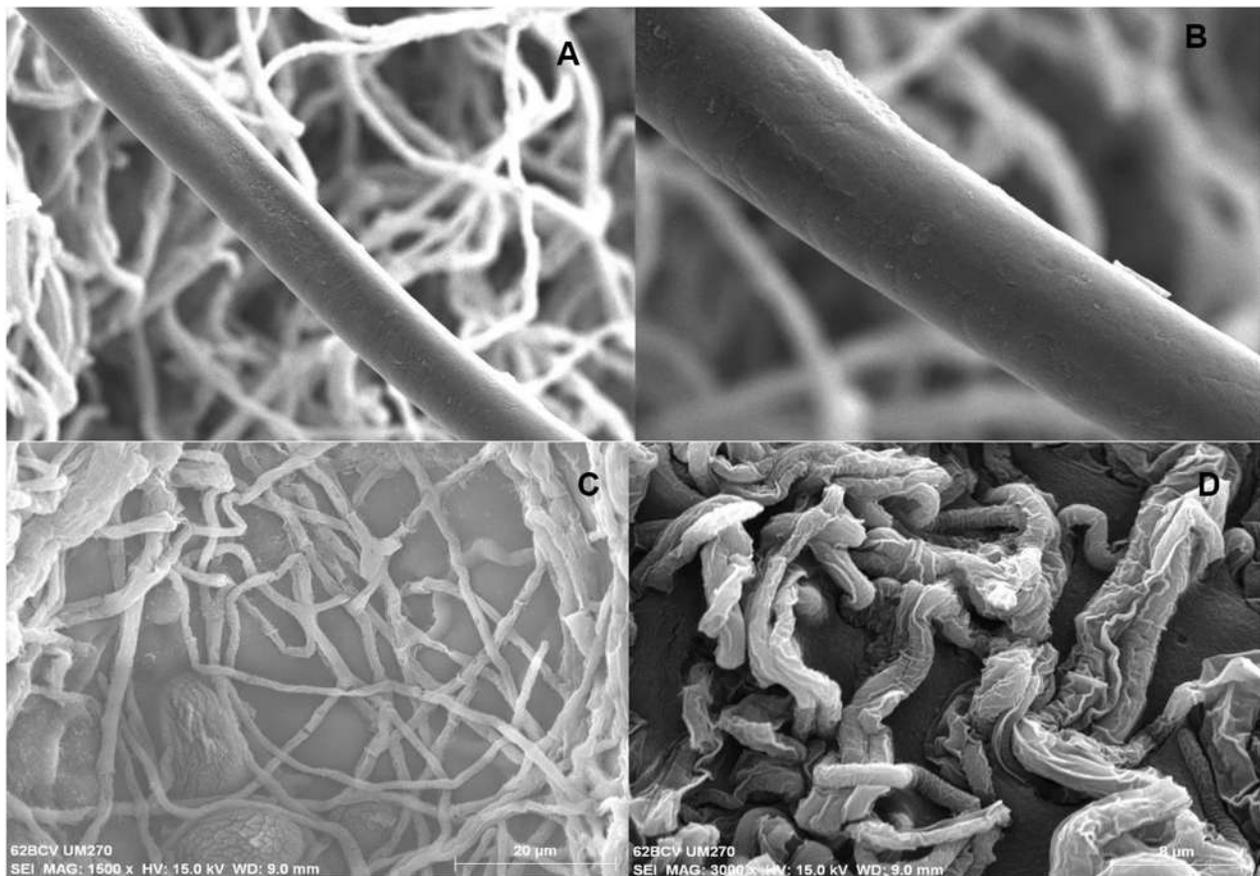


Figura 23: Daño al micelio de *Botrytis cinerea* ocasionado por los compuestos difusibles de *Pseudomonas fluorescens* UM270. En los paneles A y B se observan las hifas sin la presencia de la bacteria (control), en los paneles C y D hifas en contacto con los compuestos difusibles de UM270. (Paneles A y C observados a 1500X, paneles B y D observados a 3000x).

10.- Discusión

La fruta postcosecha tiene cierto tiempo de vida útil, la cual sufre un proceso normal de deterioro o decaimiento, debido a la respiración, la producción de etileno, la presencia de hongos, las condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, atmosfera, etc.). Durante este proceso la fruta pierde peso y firmeza y disminuye la calidad, midiendo estos parámetros se puede cuantificar esa pérdida, esto nos permite saber que tanto pierden en peso y firmeza este tipo de frutillas.

Es necesario identificar los géneros fúngicos que son capaces de producir enfermedad postcosecha en berries para poder generar mejores estrategias de biocontrol, por eso parte del objetivo principal de este trabajo es identificar patógenos fúngicos que afecten a las berries postcosecha. Al comprar estas frutillas en mercado local se obtuvieron fresas, arándanos y zarzamoras que han pasado por un proceso de recolección y transporte que se utiliza normalmente en el manejo de estas frutillas. Esto nos permite obtener evidencia más confiable de los hongos que son capaces de infectar a este tipo de frutillas en postcosecha, ya que una recolección directa en campo mostraría los géneros fúngicos que son capaces de infectar las frutillas en campo y se produciría un sesgo en cuanto a los hongos que pueden afectar a las frutillas en postcosecha. En este trabajo se realizó la identificación molecular de los hongos aislados y varios de ellos corresponden con agentes causales de enfermedades postcosecha en frutas y vegetales. Se ha reportado que los principales patógenos postcosecha de una variedad de frutas y vegetales son los géneros: *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* y *Alternaria* (Dukare *et al.*, 2018). Siendo *Botrytis* y *Fusarium* los mayores agentes causales de enfermedad postcosecha en berries (Petrasch *et al.*, 2019, Koike & Gordon, 2015, Pastrana *et al.*, 2017, Rivera *et al.*, 2013, Saito *et al.*, 2016).

De acuerdo con los resultados de índices de infección ocasionados por hongos no reportados como principales patógenos postcosecha de berries, especies de *Cladosporium* son de distribución cosmopolita, son frecuentemente aislados del suelo, la comida y otra materia orgánica, o se encuentran colonizando como invasores secundarios lesiones de hojas causadas por hongos fitopatógenos. Algunas especies de este género son patógenas de plantas, también algunas especies son conocidas por ser endófitos comunes, así como hongos que se encuentran en el filoplano (Bensch *et al.* 2012).

Mehra *et al.* 2013 hacen mención sobre los principales patógenos postcosecha de arándanos donde *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp., y *Botrytis cinerea* son los patógenos postcosecha más comúnmente reportados. Sin embargo, también menciona otros géneros fúngicos que son capaces de causar enfermedad postcosecha en arándanos, algunos como oportunistas: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Catenophora*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* y *Rhizopus*.

Ya que *Cladosporium* es reportado como patógeno oportunista y no como uno de los principales patógenos postcosecha de arándanos, se generó la pregunta de cuál sería el grado de infección que tendría este hongo, por lo tanto, en este estudio se decidió

corroborar los índices de infección en frutas de arándanos causados por *Cladosporium* sp. 1BOA. Al causar infección en el 39% de los arándanos inoculados se determinó que puede ser un agente causal de enfermedad postcosecha de arándanos no severo.

Penicillium expansum se ha reportado como patógeno postcosecha de una variedad de frutas y vegetales, sin embargo, pocos reportes se han encontrado como agente causal de enfermedad postcosecha en fresas, por lo tanto, también se decidió corroborar los índices de infección de *Penicillium expansum* 230, encontrando que es capaz de infectar el 100% de las fresas inoculadas, por lo tanto, se podría clasificar como un potencial agente causal de enfermedad postcosecha en fresas.

Aunque *Mucor* spp. se ha encontrado en frutas de fresa en postcosecha, no hay reportes particularmente de *Mucor circinelloides* como agente causal de enfermedad postcosecha en fresas, por lo tanto, de igual manera se evaluaron los índices de infección con el aislado *Mucor circinelloides* 1BF para corroborar su potencial de infección en estas frutillas, encontrando que es capaz de producir infección en el 89% de las fresas inoculadas, por lo tanto, *Mucor circinelloides* 1BF también podría clasificarse como agente causal de enfermedad postcosecha en fresas.

Se encontraron 2 microorganismos con capacidad de antagonizar los hongos aislados, uno corresponde a *Trichoderma* sp. 4AF y el otro corresponde a una cepa bacteriana. Para la identificación de la bacteria la secuencia obtenida mostró un 94% de identidad con *Rahnella aquatilis*, sin embargo, al realizar el análisis filogenético, no hubo una agrupación de este aislado con ninguna de las cepas comparadas, probablemente debido a la calidad de la secuencia. Una de las perspectivas mencionadas posteriormente en este trabajo es analizar el genoma de esta cepa bacteriana, esto nos dará información más precisa para poder asegurar la identificación correcta de esta cepa. Pero hasta ahora la comparación de secuencia en la base de datos del GenBank nos da un indicio de la identificación.

En los resultados de inhibición por compuestos difusibles y volátiles de las diferentes cepas bacterianas contra los aislados fúngicos obtenidos, se observó que la inhibición de varios aislados es mayor por compuestos difusibles que por compuestos orgánicos volátiles, una probable explicación para estos resultados podría ser que los compuestos producidos por las bacterias que difunden en el medio afectan de una manera más directa el crecimiento del hongo, ya que están en contacto directo con el micelio vegetativo y quizás perjudique al hongo en su capacidad de adquirir nutrientes y desarrollarse, en cambio por compuestos orgánicos volátiles es posible que haya cierta pérdida en la concentración de los compuestos producidos, o que estos no afecten de igual manera al micelio vegetativo ya que no está en contacto directo con él, podrían afectar el micelio aéreo limitando su reproducción y no tanto su crecimiento.

Por otra parte, las cepas bacterianas que provocan los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos aislados son *Pseudomonas fluorescens* UM270 y *Rahnella aquatilis* SER3. El genoma de UM270 ha sido secuenciado y analizado (Hernández-

Salmerón *et al.* 2016), los resultados de ese análisis mostraron que UM270 es capaz de producir diversos compuestos antifúngicos, lo cual explicaría que inhiba el crecimiento de varios de los patógenos aislados en este trabajo. Para el caso de *Rahnella aquatilis* SER3 con los resultados obtenidos podemos decir que debe producir algún o algunos compuestos antifúngicos que inhiben el crecimiento de los hongos ensayados, queda como perspectiva identificar dicho o dichos compuestos y analizar su genoma para determinar todos los modos de acción que esta cepa puede utilizar como agente biocontrol.

En los ensayos de confrontación entre *Trichoderma* sp. 4AF con los principales géneros fúngicos de patógenos postcosecha de una variedad de frutas y vegetales reportados, se observó que hay inhibición del crecimiento de los patógenos fúngicos cuando los ensayos se realizaron en co-inoculación directa, *Trichoderma* sp. 4AF tiene una velocidad de crecimiento mayor que los patógenos analizados, por lo que ocupa la mayor parte de la caja Petri, limitando así el crecimiento del patógeno. En cambio, en los ensayos realizados por compuestos volátiles observamos que no hay diferencias significativas en el crecimiento de los patógenos, lo que sugiere que el mecanismo de acción que utiliza *Trichoderma* sp. 4AF para inhibir el crecimiento de los patógenos fúngicos es la competencia por espacio y nutrientes.

En las imágenes mostradas con ayuda del MEB, se observó deformidad de las hifas causada por los compuestos difusibles de UM270. Simionato *et al.*, 2017 observaron el daño al micelio de *Botrytis cinerea* causado por el ácido carboxílico-1-fenazina (PCA) compuesto producido por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* LV, ellos, basándose en otros estudios, sugieren una posible hipótesis para explicar la deformidad de las hifas, mencionan que al igual que la piocianina, la fenazina (PCA) tiene la capacidad de disminuir la oxidación de NADH y el glutatión, lo que puede ocurrir con niveles elevados de oxidación celular y desestabilización de las mitocondrias. Con la desestabilización mitocondrial hay una disminución de la eficiencia en la cadena de transporte de electrones, formando así especies reactivas de oxígeno, lo que puede conducir a estrés oxidativo celular y la alteración de la permeabilidad de la membrana. Pero se necesitan realizar ensayos de permeabilidad de membrana y estrés oxidativo para comprobar esta hipótesis.

Hernández-Salmerón *et al.*, 2016 al secuenciar y analizar el genoma de *Pseudomonas fluorescens* UM270, encontraron que es capaz de producir diversos compuestos antifúngicos entre los cuales se encuentran la fenazina y la piocianina, por lo cual, si la hipótesis sugerida por Simionato es correcta, ésta podría ser la respuesta para explicar la deformidad observada en las hifas de *Botrytis cinerea*.

11.- Conclusión

Los microorganismos antagonistas *Rahnella aquatilis* SER3 y *Trichoderma* sp. 4AF, residentes naturales en frutillas como fresa, zarzamora y arándano, son capaces de inhibir el crecimiento de los hongos que afectan a berries postcosecha.

12.- Perspectivas

Realizar ensayos *in vivo* para determinar la capacidad antagonista de las bacterias directamente en las frutillas y determinar la concentración mínima requerida para evitar el crecimiento de hongos patógenos.

Analizar el genoma de *Rahnella aquatilis* SER3 con el propósito de determinar los mecanismos que es capaz de utilizar como agente biocontrol.

Realizar pruebas de biocontrol de patógenos con los sobrenadantes de *Rahnella aquatilis* SER3.

Identificar los metabolitos o compuestos de *Rahnella aquatilis* SER3 y *Trichoderma* sp. 4AF involucrados en el biocontrol.

13.- Referencias

- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A. M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17,73-90.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J. C., 2004. *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2421–2428.
- Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology.* 108, 386–395.
- Bahroun, A., Jousset, A., Mhamdi, R., Mrabet, M., Mhadhbi, H., 2018. Anti-fungal activity of bacterial endophytes associated with legumes against *Fusarium solani*: Assessment of fungi soil suppressiveness and plant protection induction. *Applied Soil Ecology.* 124, 131-140.
- Barkai-Golan, R., 2001. *Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control.* Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology.* 72, 1–401.
- Carmona-Hernández, s., Reyes-Pérez, J.J., Chiquito-Contreras, R.G., Rincón-Enriquez, G., Cerdán-Cabrera, C.R., Hernández-Montiel, L.G., 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. *Agronomy.* 121, 1-15.
- Chávez-Díaz, I., Angoa-Pérez, V., López-Díaz, S., Velázquez-Del Valle, M.G., Hernández-Lauzardo, A.N., 2013. Antagonistic bacteria with potencial for biocontrol on *Rhizopus stolonifer* obtained from blackberry fruits. *Fruits.*69, 41-46.
- Chi, M.; Li, G.; Liu, Y.; Liu, G.; Li, G.; Li, M.; Zhang, X.; Sun, Z.; Sui, Y.; Liu, J., 2015. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biol. Control,* 90, 113–119.
- De Costa, D.M., Erabadupitiya, H.R.U.T., 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology.* 36, 31-39.
- Di Francesco, A., Martini, C., Mari, M., 2016. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 711-717.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., & Mari, M., 2014. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control.* 81, 8–14.

Dukare, A.S., Paul, S., Nambi, V.E., Gupta, R.K., Singh, R., Sharma, K., Vishwakarma, R.K., 2018. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*. 1-16.

Droby, S., E. Chalutz, C. L. Wilson, and M. E. Wisniewski. 1992. Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica* 20,1495–1503.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., 2007. *Botrytis* spp. and diseases, they cause in agricultural systems – An introduction. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 1-8.

Gilbert, S.G., 2012. *A Small Dose of Toxicology: The Health Effects of Common Chemicals*, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Glick, B.R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mecanisms and Applications*. Scientifica. 2012, 1-18.

He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M., 2010. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*. 166, 207-215.

Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M.C., Macías-Rodríguez, L.I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*. 81, 83-92.

Hernández-Montiel, L.G., Gutierrez-Pérez, E.D., Murillo-Amador, B., Vero, S. Chiquito-Contreras, R.G., Rincón-Enríquez, G., 2018. Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 139, 31-37.

Hernández-Salmerón, J.E., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., Santoyo, G., 2016. Draft Genome Sequence of the Biocontrol and Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Standards in Genomic Sciences*. 11, 1-7.

Hsieh, F.C., Lin, T.C., Meng, M. and Kao, S.S. (2008) Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Curr Microbiol* 56, 1–5.

Huang, C.J., Tsay, J.F., Chang, S.Y., Yang, H.P., Wu, W.S., Chen, C.Y., 2012. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1306–1310.

Ippolito, A., Nigro, F., Schena, L., 2004. Control of postharvest diseases of fresh fruit and vegetables by preharvest application of antagonistic microorganisms. In: Niskanen, D.R.,

- Jain, R. (Eds.), Crop management and postharvest handling of horticultural products Volume: IV: Diseases and disorders of fruit and vegetables. SM Science Publishers, Inc. Enfield, USA, 1–30.
- Ippolito, A., Nigro, F., 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruit and vegetables. *Crop Protection* 19, 715–723.
- Irtwange, S., 2006. Application of Biological Control Agents in Pre- and Post-harvest Operations. *Agri. Eng. Intl.* 8, Invited Overview 3, A & M University Press, Texas.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411–441.
- Koike, S.T., Gordon, T.R., 2015. Management of Fusarium wilt of strawberry. *Crop Protection* 73, 67-72.
- Lu, L., Lu, H., Wu, C., Fang, W., Yu, C., Ye, C., Shi, Y., Yu, T., Zheng, X., 2013. *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 85, 196-202.
- Mahuku, G.S., 2004. A Simple Extraction Method Suitable for PCR Based Analysis of Plant, Fungal, and Bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22, 71-81.
- Mehra, L. K., MacLean, D. D., Savelle, A. T., Scherm, H., 2013. Postharvest disease development on southern highbush blueberry fruit in relation to berry flesh type and harvest method. *Plant Dis.* 97, 213-221.
- Mikani, A., Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., O’Gorman, D.T., Stokes, S., Alizadeh, A., 2007. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology*. 48, 107-112.
- Moretti, A.N., 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. *Proc. Nat. Sci.* 117, 7-13.
- Naureen, F., Humaira, B., Viqar, S., Jehan, A., Syed E.H., 2009. Prevalence of post-harvest rot of vegetables and fruits in Karachi Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41, 3185-3190.
- Nunes, C.A., 2012. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur J Plant Pathol.* 133, 181-196.
- Panebianco, S., Vitale, A., Polizzi, G., Polizzi, F., Cirvilleri, G., 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control*. 84, 19-27.
- Pastrana, A.M., Kirkpatrick, S.C., Kong, M., Broome, J.C., Gordon, T.R., 2017. *Plant Disease*. 101, 2066-2072.
- Petrasch, S., Knapp, S.J., Van Kan, J.A.L., Blanco-Ulate, B., 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. 20, 877-892.

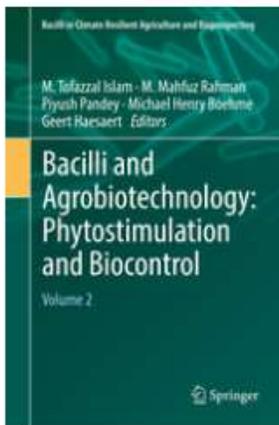
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J. Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76, 51–167.
- Rivera, S. A., Zoffoli, J. P., and Latorre, B. A. 2013. Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Dis.* 97, 1069-1074.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M.C., Macías-Rodríguez, L., Santoyo, G., 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13, 46-52.
- Saito, S., Michailides, T.J., Xiao, C.L., 2016. Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberry in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant. Dis.* 100, 2087-2093.
- Sanzani, S., M. Reverberi, and R. Geisen. 2016. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 95–105.
- Simionato AS, Navarro MOP, de Jesús MLA, Barazetti AR, da Silva CS, Simões GC, Balbi-Peña MI, de Mello JCP, Panagio LA, de Almeida RSC, Andrade G and de Oliveira AG. 2017. The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Front. Microbiol.* 8, 1-9.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50, 205-2021.
- Smith, W.L., Jr., H.E. Moline, K.S. Johnson. 1979. Studies with *Mucor* species causing postharvest decay of fresh produce. *Phytopathology*. 69, 865-869.
- Stocco, A.F., Diaz, M.E., Rodríguez-Romera, M.C., Mercado, L.A., Rivero, M.L., Ponsone, M.L., 2019. Biocontrol of postharvest *Alternaria* decay in table grapes from Mendoza province. *Biological Control*. 134, 114-122.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40, 1-10.
- Wang, X., Shi, J., Wang, R., 2018. Effect of Burkholderia contaminans on Postharvest Diseases and Induced Resistance of Strawberry Fruits. *Plant Pathol. J.* 34, 403-411.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27, 425–441.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., Crous, P.W., 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*. 75, 171–212.

Zhao, Y., Shao, X.F., Tu, K., Chen, J.K., 2007. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* B10 on the diseases of postharvest strawberry. *Journal of Fruit Science* 24, 339–343.

14.- Anexos: Publicaciones

Coautora del capítulo:

“Plant growth-promotion by ACC deaminase-producing Bacilli under salt stress conditions”, publicado en el libro Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol. Vol. 2. ISBN: 978-3-030-15174-4. Ed. Springer. (2019). DOI: 10.1007/978-3-030-15175-1.



© 2019

Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol

Volume 2

Editors: **Islam, M.T., Rahman, M.M., Pandey, P., Boehme, M.H., Haesaert, G.** (Eds.)