



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evaluación de la eficacia biológica de *Bacillus velezensis* 83
contra *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O
P R E S E N T A:**

CLARA ITZEL GÓMEZ GUERRERO

DIRECTOR: M. en C. Balderas Ruíz Karina Alejandra

CODIRECTOR: Dr. Serrano Carreón Leobardo

CUERNAVACA, MORELOS

Agosto, 2021

One day you'll leave this
world behind,
"So, live a life you will
remember"

AVICII

*A mi mamá que hizo de esto
posible y a mi papá que me
acompaña desde el cielo*

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos 247473 y CB-251848, así como de la UNAM-DGAPA-PAPIIT proyectos IN206715 y IG200618.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Quiero agradecer principalmente al Dr. Galindo Fentanes, por permitirme formar parte de su grupo (Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis), por apoyarme en diversas situaciones, pero, sobre todo, gracias por confiar en mí y en lo que podría lograr a hacer.

A Karina Balderas, por tenerme la paciencia de enseñarme desde cero muchas cosas que no sabía, por aguantar mis buenos y malos ratos como alumna, por nunca perder la fe en mí, porque más que una asesora fue una buena amiga.

Quiero agradecer al Dr. Leobardo Serrano Carreón, por recibirme como su alumna, por las buenas enseñanzas, pero sobre todo por nunca perderme la paciencia cuando no entendía algo.

A todos mis compañeros del Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis de IBT UNAM, que hicieron muy amena mi estancia ahí.

A mi amiga, Cristina De Los Santos Ventura, porque estuvo en los momentos más difíciles, por siempre transmitirme su buena vibra, quiero darle las gracias por enseñarme que a veces salir de la zona de confort no es tan malo, que el salir y disfrutar de la vida es más importante.

A Yolanda Ramírez Nemecio, por ser esa amiga incondicional, el haberle hablado para pedirle un sacapuntas fue la mejor decisión que pude haber tomado en esos tiempos, gracias por siempre estar ahí: en los buenos y malos momentos de mi vida.

A Crisset Peña Carbajal, el tiempo que llevamos conociéndonos es muy corto y ya se ha convertido en una de mis mejores amigas, agradezco mucho a la vida por tu amistad, por los buenos momentos y porque siempre tienes algo que decirme cuando algo no va bien.

Alberto Hernández Orta, mi mejor amigo y consejero, el que convirtió mis días tristes en alegres. Gracias por estar siempre ahí para mí, por siempre recordarme que todo es pasajero, que tenemos que disfrutar del ahora y nuestra juventud.

José Daniel Ángeles Salazar, doy muchas gracias a la vida por ponerle como mi amigo, he aprendido tantas cosas de él, como el si la vida te da limones exprímelos y hazte una limonada con ellos, siempre he admirado la fuerza de voluntad con la que cuenta para levantarse de situaciones que pone la vida, siempre sonriendo, ante todo. Gracias por escucharme y los buenos consejos.

Quiero agradecer a mis amigos de la universidad:

Javier R., Crisset P., Alberto H., José A., Fernando A.: Quiero agradecer su amistad, por haber hecho la carrera universitaria más amena y feliz, por los largos ratos de risas y carcajadas, con ustedes aprendí que para divertirse no es necesario salir y tomar, que una buena plática y chistes de sarcasmo lo pueden ser todo para ser feliz, gracias por las pláticas profundas sobre la vida y nuestro existir. Gracias, sobre todo porque ustedes fueron mi balance después de que mi padre partiera de este mundo, siempre los llevaré conmigo y si es que un día ya no hablamos tanto, no tengan la menor duda que siempre estaré en sus momentos más felices y tristes de su vida apoyándolos.

Yolanda R., Álvaro A., Merari C., Leopoldo C. Gracias por su amistad incondicional, por ayudarme y soportarme en mis situaciones más críticas, gracias por enseñarme un mundo que no me atrevía a conocer y que no todo en la vida debe de ser tan monótono, que se tiene que vivir disfrutando cada instante que te ofrece la vida, porque gracias a ustedes aprendí que la vida sólo son cuatro días y que ya hemos vivido tres de ellos. Si pudiera describir nuestra amistad con una palabra esa sería: sincera. Siempre contarán conmigo para todo lo que necesiten.

Quiero agradecer sobre todo a mi madre que siempre dio todo de sí para que yo pudiera realizar mis estudios y convertirme en lo que ahora soy. Así mismo, quiero agradecer a mi padre que siempre creyó que iba lograr terminar mi carrera, sé que no alcanzó a verlo, pero sé que estaría orgulloso de ello. Quiero agradecer a mis hermanos que siempre me apoyaron y me aguantaron durante este proceso, a mi sobrino que es la alegría de mis días; en fin, quiero decirles que los amo y que gracias a ellos soy lo que soy ahora como persona.

ÍNDICE

RESUMEN	11
1.INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	14
2.2. <i>Botrytis cinerea</i>	14
2.3. Control biológico.....	16
2.4. Productos de control biológico de fitopatógenos a base de <i>Bacillus</i>	19
2.5. <i>Fungifree AB®</i> (<i>Bacillus velezensis</i> 83) como biofungicida.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	27
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
7. METODOLOGÍA	28
7.1. Estrategia experimental	28
7.2. Producción de polvos concentrados de <i>B. velezensis</i> 83	30
7.3. Preparación de formulados para realizar los ensayos de inhibición <i>in vitro</i> y ensayos en hojas y frutos de tomate.....	31
7.4. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	31
7.5. Germinación de semillas de tomate rojo	32
7.6. Establecimiento del método de infección en hojas y frutos de tomate con esporas de <i>B. cinerea</i> 05	33
7.6.1. Preparación de la suspensión de esporas de <i>B. cinerea</i> 05.....	33
7.6.2. Procedimiento de infección en hojas.....	34
7.6.3. Procedimiento de infección en frutos de tomate	35
7.6.4. Establecimiento del método de infección con esporas de <i>B. cinerea</i> 05 en tomates..	35
7.7. Ensayos <i>in vitro</i> con tratamientos en hojas y frutos de tomate	36
7.7.1. Ensayos <i>in vitro</i> en hojas de tomate	36
7.7.2. Ensayos <i>in vitro</i> en frutos de tomate	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	40
8.2. Infección de <i>B. cinerea</i> 05 en hojas de tomate.....	43
8.3. Infección de <i>B. cinerea</i> 05 en frutos de tomate.....	45

8.4. Ensayos <i>in vitro</i> en hojas de tomate	46
8.5. Ensayos <i>in vitro</i> en frutos de tomate	51
8.6. Duración de la protección de los tratamientos <i>Fungifree AB</i> ® contra <i>B. cinerea</i> 05 en tomates	54
9. CONCLUSIÓN	57
10. PERSPECTIVAS	57
11. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infección por <i>B. cinerea</i> 05 en planta.....	15
Figura 2. Factores de antagonismo presentes en <i>Fungifree AB®</i>	23
Figura 3. Estrategia experimental para evaluar la eficacia de <i>B. velezensis</i> 83 como agente de control biológico contra <i>B. cinerea</i> 05.	30
Figura 4. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de los diferentes factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83(células y metabolitos) contra <i>B. cinerea</i> 05	42
Figura 5. Infección de hojas de tomate con esporas de <i>B. cinerea</i> 05 suspendidas en diferentes medios (LB, PDB y agua)	43
Figura 6. Efecto de las diferentes concentraciones de esporas en las hojas de tomate para el desarrollo de infección de <i>B. cinerea</i> 05	44
Figura 7. Prueba de patogenicidad de <i>B. cinerea</i> 05 en frutos de tomates	45
Figura 8. Área infectada en función de la inoculación de diferentes concentraciones de esporas de <i>B. cinerea</i> 05	46
Figura 9. Porcentaje de inhibición de los factores de antagonismo (presentes en <i>Fungifree AB®</i>) contra <i>B. cinerea</i> 05 en hojas de tomate.....	50
Figura 10. Porcentaje de inhibición de los factores de antagonismo (presentes en <i>Fungifree AB®</i>) contra <i>B. cinerea</i> 05 en frutos de tomate.....	53
Figura 11. Duración de la eficacia biológica de los factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83 contra <i>B. cinerea</i> 05	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismos de antagonismo de los ACB (por contacto directo o indirecto)	17
Tabla 2. Control biológico de <i>Bacillus</i> contra <i>B. cinerea</i> 05.	18
Tabla 3. Concentraciones de los tratamientos utilizados para los ensayos <i>in vitro</i>	31
Tabla 4. Ejemplo del cálculo de área en tomates	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de <i>Fungifree AB®</i>	64
Anexo 2. Formulados comerciales con <i>Bacillus</i> como ingrediente activo.....	65
Anexo 3. Características y mecanismos de acción de <i>B. subtilis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> ...	67
Anexo 4. Procedimiento de perforación del Agar Papa Dextrosa (PDA)	68
Anexo 5. Ejemplo de mediciones para ensayos <i>in vitro</i> en caja Petri.....	69
Anexo 6. Composición de la solución nutritiva de Hoagland.....	69
Anexo 7. Procedimiento de infección en hojas con esporas de <i>B. cinerea</i> 05 resuspendidas en diferentes medios (LB, PDB y agua)	70
Anexo 8. Procedimiento de infección de tomates con esporas de <i>B cinerea</i> 05	71
Anexo 9. Ensayos <i>in vitro</i> en hojas y frutos de tomate: 1) preventivo y 2) simultáneo.....	72
Anexo 10. Procedimiento de infección en hojas con <i>B. cinerea</i> 05 y tratamientos de manera simultánea y preventiva	73
Anexo 11. Procedimiento de infección de <i>B. cinerea</i> 05 en tomates aplicando tratamientos de manera simultánea y preventiva	74
Anexo 12. Porcentaje de inhibición de los factores de antagonismo (presentes en <i>Fungifree AB®</i>) contra <i>B. cinerea</i> 05 en hojas de tomate a 29°C.....	75
Anexo 13. Infección en plantas de tomates	75

RESUMEN

En México, la cepa *Bacillus velezensis* 83 (*Fungifree AB*®) se comercializa como un biofungicida de aplicación foliar que es efectivo para el control biológico (CB) de cinco diferentes géneros de hongos fitopatógenos (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca*, *Leveillula*) en cultivos de importancia agrícola como mango, aguacate, papaya, cítricos, tomate, fresa, arándano, zarzamora, cucurbitáceas (Balderas-Ruiz *et al.*, 2020). *Botrytis cinerea* (moho gris) es la segunda especie de hongo fitopatógeno más importante a nivel mundial afectando a más de 200 especies de plantas (Dean *et al.*, 2012), incluyendo el tomate. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) el tomate (*Lycopersicon esculentum*) es la hortaliza más importante en producción a nivel mundial, siendo México el principal país exportador de este producto (FAOSTAT, 2021). *Fungifree AB*® cuenta con dos factores de antagonismo: 1) células de *B. velezensis* 83 y 2) los metabolitos producidos durante su cultivo. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue identificar el factor de antagonismo presente en *Fungifree AB*® con mayor contribución en la inhibición de *B. cinerea* en hojas y frutos de tomate. Para cumplir con el objetivo se realizaron ensayos de inhibición *in vitro*, los cuales mostraron claramente que las células presentaron un efecto mayor de inhibición en el crecimiento de *B. cinerea*, en comparación con los metabolitos y un producto químico (Clorotalonil). Se observaron diferentes resultados de eficacia de los tratamientos entre hojas y frutos. Con ensayos en hojas de manera *in vitro*, se observó que las células fueron el principal factor que contribuyó en la eficacia de *Bacillus velezensis* 83 vs *B. cinerea* (32-70%), asimismo, en ensayos de inhibición con frutos (89-97%). En ambos casos, los ensayos con metabolitos (<10%) fue el de menor eficacia. El tratamiento químico tuvo mayor control de la infección en hojas (>95%) que en frutos (58%). Asimismo, se observó que la mayor eficacia de *B. velezensis* 83 se obtuvo con la aplicación del tratamiento preventivo (incubando a 29 °C). En los ensayos con hojas de tomate, *Fungifree AB*® presentó una mayor eficacia en comparación con sus factores de antagonismo de manera individual. Una posible explicación a este hecho es que podría existir una interacción sinérgica entre metabolitos y células, cuando se encuentran juntos en el formulado. Por su parte, en los ensayos con frutos de tomate, se observó que las células son el principal factor de antagonismo que contribuye en la eficacia de *B. velezensis* 83. Asimismo, se observó que las células presentan una mayor eficacia, cuando son aplicados de manera preventiva, en comparación con el Clorotalonil.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate rojo es de gran importancia en México, debido a sus aportaciones culturales, económicas y de salud (SIAP, 2017). En los últimos años (2012-2021), se ha visto un incremento en la producción de tomate del 8.6 % a nivel mundial. En el 2017 México participó con 2,3 % de la producción total mundial, ocupando así el décimo lugar en producción y el primero en exportación de tomate a nivel mundial en términos de volumen y valor en ventas al exterior (FAOSTAT, 2021). Sin embargo, un problema que presenta el cultivo de tomate es la susceptibilidad a diversos fitopatógenos (virus, bacterias y hongos), los cuales son causantes de enfermedades que se traducen en pérdidas económicas (Blancard, 2000). En particular, los hongos como *Botrytis cinerea* (moho gris), *Alternaria solani* (tizón temprano), *Leveillula taurica* (cenicilla), *Phytophthora infestans* (tizón tardío) son los principales causantes de enfermedades en plantas de tomate (Martínez-Ruíz *et al.*, 2016). Entre éstos, *B. cinerea* es considerado la segunda especie de hongo fitopatógeno más importante a nivel mundial, ya que afecta a más de 200 especies de plantas; es un necrotrófico típico que atrapa las vías de muerte celular programada del huésped para lograr la infección (Dean *et al.*, 2012). Este hongo ataca diferentes órganos, en distintas etapas de desarrollo de la planta. La infección en frutos maduros se manifiesta durante la etapa postcosecha (Williamson *et al.*, 2007) afectando así su comercialización, tanto en el mercado nacional como en el extranjero. El control tradicional de *B. cinerea* se basa principalmente en la aplicación de fungicidas químicos (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017), sin embargo, el uso excesivo de éstos puede tener efectos negativos en el medio ambiente y/o provocar efectos adversos en la calidad del producto (necrosis tisular), puede causar daños a la salud de humanos y otras especies de animales (Ibarra *et al.*, 2006; Cook, 1993). Por otra parte, la eficacia de los fungicidas químicos puede ser de corta duración, ya que pueden tener el efecto de seleccionar poblaciones resistentes de *B. cinerea* y hacer más difícil su control (Williamson *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, el control biológico (uso de organismos o de metabolitos o subproductos antagonistas naturales de agentes infecciosos) es una alternativa para el control de plagas y/o fitopatógenos, ya que este no genera resistencia en el hongo, es amigable con el medio ambiente y con la salud humana. Especies de los géneros *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., y algunas especies no patógenas de *Fusarium* spp., son las que más han sido reportadas en la literatura como

agentes de control biológico (ACB) contra hongos fitopatógenos (Picard y Bosco, 2008). Los ACB inhiben el desarrollo de fitopatógenos a través de uno o varios mecanismos. Por ejemplo, las bacterias del género *Bacillus* producen metabolitos que son compuestos antibióticos (antibiosis), competencia por espacio y nutrientes y/o la Inducción de Resistencia Sistémica en la planta (**Tabla 1**) (Correa y Soria, 2010). Debido a su complejidad de modos de acción, al usar control biológico, el patógeno tendrá mayor dificultad para desarrollar resistencia (Serrano-Carreón y Galindo- Fentanes, 2007).

El Instituto de Biotecnología de la UNAM, en colaboración con el CIAD-Culiacán, desarrollaron un fungicida (*Fungifree AB®*) a base de células de *Bacillus subtilis* 83 (actualmente *Bacillus velezensis* 83, Balderas-Ruíz *et al.*, 2020) y sus metabolitos (producidos por la bacteria durante su cultivo industrial). De esta manera, ambos componentes (células y metabolitos) pueden ser considerados factores de antagonismo, es decir; elementos que son responsables de que el control biológico se lleve a cabo. Este producto comercial ha demostrado ser eficaz para el control de varias especies de hongos fitopatógenos (de los géneros *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Sphaerotheca* y *Botrytis*) (Galindo-Fentanes *et al.*, 2015) en aplicaciones foliares en diferentes cultivos de importancia económica como el mango, aguacate, papayo, tomate (**Anexo 1**). Venegas-Brito (2015) realizó ensayos con hojas de mango y determinó que las esporas presentes en *Fungifree AB®* fueron el factor de antagonismo con mayor contribución en la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* (hongo causante de antracnosis en mango). Por otra parte, Luna-Bulbarela *et al.*, (2018) han demostrado que el lipopéptido bacilomicina D, que produce la bacteria durante su cultivo industrial, ejerce un efecto de inhibición en la germinación de esporas y en el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides*.

Sin embargo, se desconoce si estos factores pueden ser antagonistas de *B. cinerea* en plantas de tomate (hojas y frutos). Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue evaluar la eficacia del control biológico de los factores de antagonismo (células y/o metabolitos) presentes en *Fungifree AB®* contra *B. cinerea*, mediante ensayos *in vitro*, así como en pruebas en hojas y en frutos de tomate.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate rojo forma parte de los cultivos más importantes en el planeta en términos de producción y exportación. En los años del 2012 al 2017 se registró un incremento de producción en el tomate rojo del 8.6% a nivel mundial, donde México fue principal exportador de tomate en términos de volumen y valor en ventas al exterior según datos registrados por la FAO (FAOSTAT, 2021). Sin embargo, los cultivos de tomate rojo presentan susceptibilidad a hongos fitopatógenos, como *B. cinerea*, el cual es considerado el segundo hongo fitopatógeno más importante a nivel mundial, que afecta a más de 200 especies de plantas (Dean *et al.*, 2012), causando pérdidas del 20% en los cultivos de tomate en el mundo. En 2013, las pérdidas económicas por *B. cinerea* fueron estimadas en 122 millones de dólares (Fuentes- López, 2013).

2.2. *Botrytis cinerea*

B. cinerea es un hongo patógeno causante del moho gris, considerado un polífago necrotrófico, que afecta a plantas hortícolas, tales como fresa, zarzamora, frambuesa, moras, kiwi y tomate, ocasionando pérdidas en pre y post-cosecha. Las pudriciones suaves, el colapso y la formación de agua en los tejidos del parénquima, así como la aparición de masas grises de conidios, son los síntomas más comunes en hojas y frutos (Williamson *et al.*, 2007). Su ciclo de infección puede llevarlo a cabo durante todo el año; sin embargo, debido a las condiciones climáticas presentes en verano, *B. cinerea* reduce su ciclo para la formación de conidióforos (**Figura 1**). La infección comienza con un conidio (espora asexual) que se esparce a través de corrientes de aire, que permiten que *B. cinerea* se establezca en la superficie de la planta. La penetración está mediada por enzimas (cutinasas, lipasas, superóxido dismutasas, pectinasas (endopoligalacturonasas), celulasas, β -1,4-xilanasas) (Williamson *et al.*, 2007), las cuales le permitirán hacer una colonización asintomática en los tejidos de la planta (para el desarrollo de la enfermedad), guiando a la planta hacia el suicidio por apoptosis (muerte celular), posteriormente se generarán los conidióforos (moho gris) sobre la superficie dañada, permitiendo así que el micelio y los esclerocios (micelio

compacto, que permite persistir a ambientes extremos) germinen para dar lugar a un nuevo conidióforo (estructura que produce de manera asexual los conidios), que a su vez liberará conidios, para reiniciar el ciclo de infección (Veloso y Van Kan, 2018).

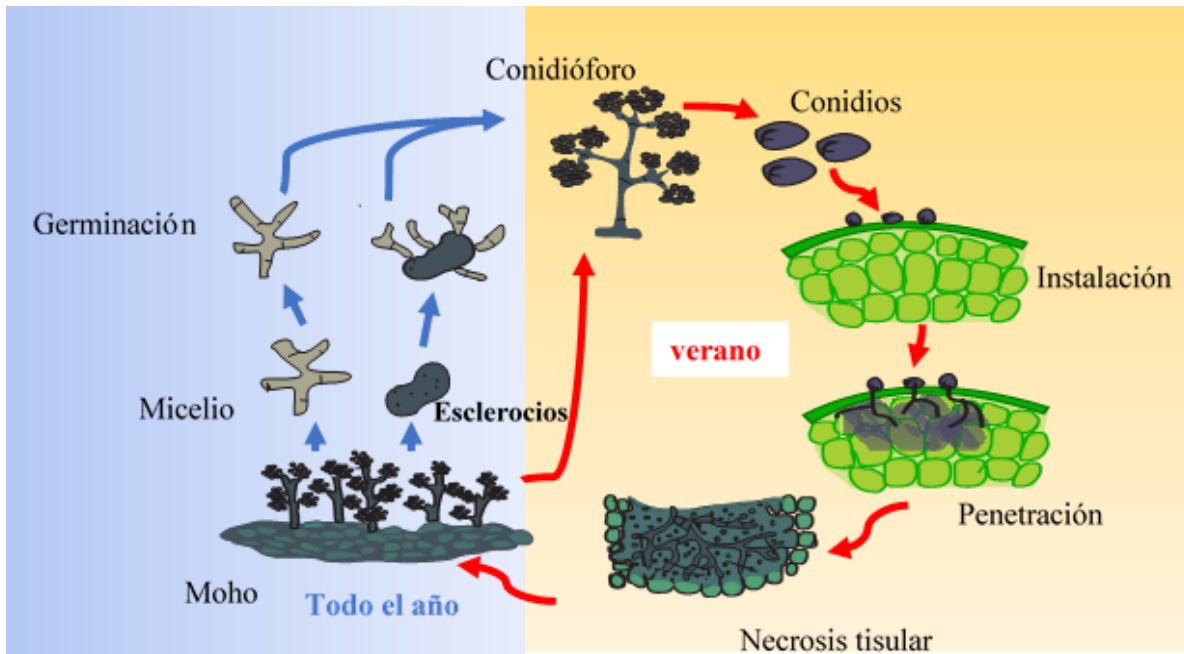


Figura 1. Ciclo de infección por *B. cinerea* en planta. Los conidios se instalan en la superficie del huésped, penetrando sin causar daño a la cutícula, causando necrosis tisular en los tejidos del huésped, generando así el moho gris, que dará lugar al micelio y los esclerocios. Los esclerocios y el micelio pueden permanecer en el suelo o vegetales en descomposición, esperando a que se den las condiciones adecuadas para su germinación y así formar un conidióforo, que permitirá realizar el proceso de infección nuevamente.

El desarrollo de la enfermedad por *B. cinerea* ocurre en flores (en precosecha) y frutos (en postcosecha), debido a que tiene una mayor preferencia hacia estos tejidos. Sin embargo, la enfermedad puede desarrollarse también en tallos, hojas y semillas. Para que la espora germine y pueda desarrollarse en la planta, su entorno debe ofrecer la humedad y los nutrientes necesarios. Estudios han demostrado que la humedad relativa (HR) de 90 al 93% y una Temperatura (T) de 10 a 25 °C favorecen la germinación e incidencia conidial de *B. cinerea* (Ciliberti *et al.*, 2015).

La enfermedad del moho gris en el tomate rojo es abundante debido a las condiciones óptimas de alta humedad y densidad foliar (Srivastava *et al.*, 2018). Ello le permite su desarrollo, causando necrosis tisular a los tejidos del tomate. Por lo tanto, la infección en el fruto de tomate se determinará como pérdida económica, ya que no se puede comercializar el producto. Por ello, el control de *B. cinerea* se vuelve un tema de relevante importancia.

Para evitar pérdidas causadas por *B. cinerea* en los cultivos, se utilizan mayormente fungicidas químicos, pero su uso excesivo tiene efectos negativos, ya que *B. cinerea* puede generar resistencia (Williamson *et al.*, 2007), aumenta los niveles de contaminación en el medio ambiente, puede haber una acumulación en los frutos si no se respetan las dosis y causa daños a la salud de los seres humanos y otras especies de animales (Ibarra *et al.*, 2006).

2.3. Control biológico

El control biológico es el uso de organismos (o microorganismos) o de sus metabolitos o subproductos, capaces de ejercer mecanismos de acción (antagonismo) sobre plagas o patógenos (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007). La ventaja sobre el control químico es que, debido a la complejidad de los modos de acción de los agentes de control biológico, el patógeno tendrá mayor dificultad para desarrollar resistencia hacia los productos (Serrano-Carreón y Galindo-Fentanes, 2007). Los microorganismos (hongos, levaduras, bacterias) que son utilizados como Agentes de Control Biológico (ACB) tienen cuatro principales mecanismos de antagonismo contra los fitopatógenos y son: a) competencia por espacio y nutrientes, b) antibiosis, c) micoparasitismo y d) la resistencia sistémica inducida (RSI) en la planta hospedera. Una breve descripción y algunos ejemplos de los mecanismos de los agentes de control biológico se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Mecanismos de antagonismo de los ACB (contacto directo e indirecto)

Mecanismo	Descripción	Ejemplo	Referencia
Directo: La bacteria se encuentra en contacto directo con el fitopatógeno			
Antibiosis	Producción de metabolitos secundarios (antibióticos) por otra parte del ACB que inhibe el crecimiento del patógeno.	La producción de compuestos orgánicos volátiles de <i>Bacillus subtilis</i> CF-3 controlan el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2019
Competencia por espacio y nutrientes	Se da cuando los microorganismos benéficos colonizan rápidamente las superficies de las plantas y hacen difícil el crecimiento de fitopatógenos.	La presencia de <i>Sphingomonas</i> sp. impidió que el patógeno bacteriano <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato creciera y provocara síntomas de infección.	Innerebner <i>et al.</i> , 2011
Parasitismo	Consiste en detectar al huésped, seguido de reconocimiento del huésped, instalación, penetración. El factor clave es la transferencia de nutrientes de un huésped al parásito.	El microparasitismo es el principal mecanismo de antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> SQR-T37 contra <i>Rhizoctonia solani</i> en jitomate	Huang <i>et al.</i> , 2011
Indirecto: La bacteria no está en contacto con el fitopatógeno			
Resistencia sistémica	Estado en el que se presenta un aumento en el nivel de resistencia basal de las plantas, desencadenada por inductores biológicos que le confieren una capacidad defensiva de amplio espectro a la planta entera.	Resistencia sistémica inducida (RSI): Provocada por microorganismos benéficos y asociada con el ácido jasmónico. Diferentes cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> provocaron la resistencia de la vid contra <i>B. cinerea</i>	Liu <i>et al.</i> , 2018 Gruau <i>et al.</i> , 2015

Bacillus es un género de bacterias Gram positivas, aerobias y formadoras de esporas. Se ha reportado que varias cepas de este género tienen potencial como ACB (Chęcinska *et al.*, 2015). Las esporas resisten calor, frío, radiación, desecación y a desinfectantes (Turnbull, 1996). Debido a que el género de *Bacillus* presenta una capacidad de formar esporas, lo convierte en un candidato ideal para desarrollar bioproductos, ya que se pueden generar formulaciones con una alta vida de anaquel y que no requieren refrigeración (Kumar *et al.*, 2011). Se ha documentado que, en campos agrícolas, algunas especies del género *Bacillus* estimulan el crecimiento de las plantas mediante la mejora en la adquisición de nutrientes. Por otro lado, las cepas de las especies de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*,

sintetizan metabolitos secundarios como: 1) enzimas líticas (quitinasas) las cuales están involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos, 2) sideróforos que actúan como secuestradores y quelantes de hierro, 3) lipopéptidos con actividad antibiótica (pertenecientes a las familias de la surfactina, iturina y fengicina) así como policétidos (sublacina, subtilina, subtilosina, macrolactina) (**Anexo 3**), compuestos orgánicos volátiles (COV), los cuales pueden suprimir la germinación y el crecimiento micelial de los hongos, contribuyendo así en la reducción de los niveles de enfermedades causadas por fitopatógenos (Zou *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008).

Existen varios estudios que han descrito el uso potencial de bacterias del género *Bacillus* en el biocontrol de *B. cinerea* (**Tabla 2**).

Tabla 2. Control Biológico a base de *Bacillus* contra *B. cinerea*.

ACB	Patógeno	Enfermedad	Planta	Referencia
<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. cinerea</i>	Moho gris	Manzano	Peighami-Ashnaei <i>et al.</i> , (2009).
<i>Bacillus</i> B27	<i>B. cinerea</i>	Moho gris	Uva	Maachia <i>et al.</i> , (2015).
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ch42	<i>B. cinerea</i>	Moho gris	Tomate	Zheng <i>et al.</i> , (2018).
<i>Bacillus subtilis</i> WXCDD105	<i>B. cinerea</i> y <i>Cladosporium fulvum</i>	Moho gris y moho de la hoja de tomate	Tomate	Wang-H <i>et al.</i> , (2018).

2.4. Productos de control biológico de fitopatógenos a base de *Bacillus*

Actualmente están disponibles en el mercado productos de control biológico (**Anexo 2**) a base de cepas de *Bacillus*, para el control de enfermedades en plantas (Villareal-Delgado *et al.*, 2018, Schisler *et al.*, 2004). En estos productos, el principal ingrediente activo son las esporas de *Bacillus*, ya que, debido a su versatilidad metabólica, les permite llevar a cabo el control biológico de fitopatógenos mediante diversos mecanismos (Villareal-Delgado *et al.*, 2018). Con formulados a base de esporas se logra una mayor vida de anaquel de los productos en comparación con productos líquidos (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Ongena y Jacques 2008). Sin embargo, algunos productos contienen también metabolitos antimicrobiales que también ejercen -por sí mismos- el control biológico. Los productos comerciales pueden contener uno o más factores de antagonismo que contribuyen a la eficacia del control biológico; además, cada factor de antagonismo puede participar con uno o más mecanismos para inhibir al fitopatógeno.

Por ejemplo, el uso de un producto comercial para aplicación en suelo, formulado con *B. subtilis* QST713 (nombre comercial: SERENADE) y sus componentes (células o metabolitos), se utilizó para entender cómo los factores de antagonismo contribuyen en el control del hongo *Plasmodiophora brassicae*, causante de “gallos” en la raíz de la canola. Con estos tratamientos (células y metabolitos), aplicados en suelo, se encontró que tanto las células como los metabolitos disminuyeron la severidad de la infección aproximadamente en un 60%. Por su parte, con el producto formulado, la disminución fue más del 90%, con respecto a un control. Esta es una evidencia de que la interacción entre los metabolitos y las células contenidas en el formulado da como resultado un mejor control biológico (Lahlali *et al.*, 2011). Posteriormente, a los ensayos llevados a cabo en el sustrato (Lahlali *et al.*, 2011) evaluaron el efecto del formulado en la RSI y en el control de *P. brassicae* en plantas de canola. Nuevamente, el tratamiento con el producto formulado fue más efectivo para reducir la incidencia de infección y la concentración del fitopatógeno en la raíz, que al utilizar los componentes de manera individual. Se detectó que las células de *B. subtilis* QST713 se establecieron en mayor concentración en la raíz cuando fueron aplicadas como parte del

formulado, que cuando fueron aplicadas como células aisladas, lo que indica que los metabolitos contenidos en el producto formulado favorecieron el establecimiento de *B. subtilis* QST713. Aunado a esto, la aplicación en raíz del producto formulado al momento de la siembra de la canola disminuyó la incidencia de infección por *Leptosphaeria maculans* y mantuvo su eficacia durante 12 días en los cotiledones de la canola, con respecto a plantas sin tratamiento biológico, indicando la elicitación de la RSI. Se comprobó la sobreexpresión de genes involucrados en la RSI, la sobreexpresión en raíz fue para etileno (BnACO), ácido jasmónico (BNOPR2), c-innaoil CoA reductasa (BnCCR) y fenilpropanoides (BnOPCL). En contraste, en hojas, la sobreexpresión fue sólo para fenilpropanoides (BnOPCL y BNCCR) (Lahlali *et al.*, 2011).

Varios autores sugieren que el CB de los fitopatógenos con cepas de *Bacillus* puede ser el resultado de la interacción de los diferentes mecanismos de antagonismo. Romero *et al.*, (2007) reportaron que los lipopéptidos que producen las cepas de *Bacillus* actúan no sólo como antibióticos, al inhibir la germinación y/o el crecimiento de diversos fitopatógenos, sino también como agentes de competencia, al facilitar la colonización de la raíz. También funcionan como inmuno-estimulantes, al inducir el mecanismo de resistencia sistémica en la planta huésped (Ongena *et al.*, 2008; Jourdan *et al.*, 2009; García-Gutiérrez *et al.*, 2013). De esta forma, el control biológico de los fitopatógenos con cepas de *Bacillus* puede ser el resultado de la interacción de los diferentes mecanismos de antagonismo: competencia, antibiosis y RSI.

A continuación, se describen los estudios que han evaluado cepas de bacterias contra *B. cinerea*.

Gao *et al.*, (2017) caracterizaron los COV (Compuestos Orgánicos Volátiles) producidos por *B. velezensis* ZSY-1 y probaron su actividad antifúngica contra hongos patógenos de plantas (*Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*). Los ensayos *in vitro* realizados demostraron que los COV (pirazina y benzotiazol) tuvieron una actividad antifúngica significativa contra *A. solani* y *B. cinerea*, de un 81.1% y 93.8% de inhibición, respectivamente. Con estos ensayos, Gao *et al.*, (2017) demostraron que los COV están involucrados en el control de las enfermedades fúngicas de plantas.

Toral *et al* (2018) demostraron que la bacilomicina y la fengicina producidos por *B. velezensis* (XT1) tuvieron actividad antifúngica contra *B. cinerea*, alterando la morfología de las esporeas e hifas del fitopatógeno. La actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por XT1 se probó mediante ensayos en uvas, fresas y tomates, los cuales mostraron una disminución de la enfermedad del 100, 12, y 50%, en comparación con el control positivo (frutos inoculados con *B. cinerea*) donde la incidencia de la enfermedad fue del 71% en uvas, 100% en fresas, y 100% en tomates. Con estos resultados, demostraron que los lipopéptidos producidos por XT1 están involucrados en el control biológico de *B. cinerea*.

Gao *et al.*, (2018) evaluaron el mecanismo de *Pseudomonas* (QBA5) involucrado en la inhibición de *B. cinerea*. Mediante ensayos *in vitro*, compararon cultivos líquidos y el sobrenadante libre de células de QBA5 sobre la germinación de conidios de *B. cinerea*. Observaron que el sobrenadante libre de células tiene casi el mismo efecto inhibitorio que las células de QBA5. Estos estudios demostraron que la antibiosis (a través de compuestos tipo lipopéptidos) es el principal mecanismo de control biológico de QBA5 sobre *B. cinerea*. Por otro lado, estos autores realizaron ensayos en hojas y en frutos de tomate contra *B. cinerea*, en los cuales observaron que existe un efecto de inhibición significativo cuando el sobrenadante libre de células era inoculado cuatro horas antes que *B. cinerea*, sugiriendo así que QBA5 desempeña sus funciones de control biológico contra el moho gris, de manera preventiva. Los resultados de la inoculación mostraron que la enfermedad del moho gris en frutos y hojas de tomate, fueron inhibidas significativamente por QBA5 (al igual que lo observado cuando se usó un fungicida químico), lo que indica que los ACB tienen un efecto similar a los fungicidas químicos.

Por otro lado, Salvatierra-Martínez *et al.*, (2018) demostraron mediante ensayos de inhibición *in vitro*, que *B. amyloliquefaciens* cepa BBC023 y *B. amyloliquefaciens* cepa BBC047 poseen actividades antagónicas contra *B. cinerea*, lo que fue atribuible a la producción de compuestos lipopeptídicos. Por otro lado, en sus ensayos con plantas de tomate, las cuales fueron inoculadas con las cepas BBC023 y BBC047, tanto en raíz (R) como en raíz y a nivel foliar (R/F) y que posteriormente fueron infectadas con *B. cinerea*, presentaron una disminución en la severidad de la infección fúngica. Sin embargo, en

aplicaciones foliares, observaron que la cepa BBC047 presentó un mayor control sobre *B. cinerea*, en comparación con la cepa BBC023. Esto fue atribuido a la capacidad de producir *biofilms* (biopelículas), debido a que la cepa BBC047 mantuvo una mayor densidad de población que la cepa BBC023 en las hojas. Adicionalmente, Salvatierra-Martínez *et al.*, (2018) demostraron que ambas cepas aplicadas en las raíces aumentaron significativamente el peso seco y la altura de las plantas de jitomate, en comparación con las plantas del control (sin inoculación de bacteria).

Los estudios descritos anteriormente demuestran que los factores de antagonismo presentes en algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de *B. cinerea*, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de diversos mecanismos de acción y que algunos de ellos pueden tener actividad antifúngica similar al de un fungicida químico.

2.5. *Fungifree AB*® (*Bacillus velezensis* 83) como biofungicida

Fungifree AB® es un biofungicida desarrollado en México (a base de la cepa *Bacillus velezensis* 83). Se ha demostrado que el producto es eficaz para el control de varios géneros de hongos fitopatógenos en diversos cultivos (Galindo-Fentanes *et al.*, 2015) mediante aplicaciones foliares (**Anexo 1**). Por su proceso de producción, *Fungifree AB*® contiene dos factores de antagonismo: 1) células: su principal modo de acción será a través de la competencia por espacio y nutrientes, así mismo, debido a su capacidad de realizar la síntesis de novo: resistencia sistémica inducida (RSI), antibiosis y/o como bacteria promotora de crecimiento vegetal (BPCV), 2) metabolitos: su modo de acción se llevará a cabo a través de la antibiosis y/o RSI (**Figura 2**).

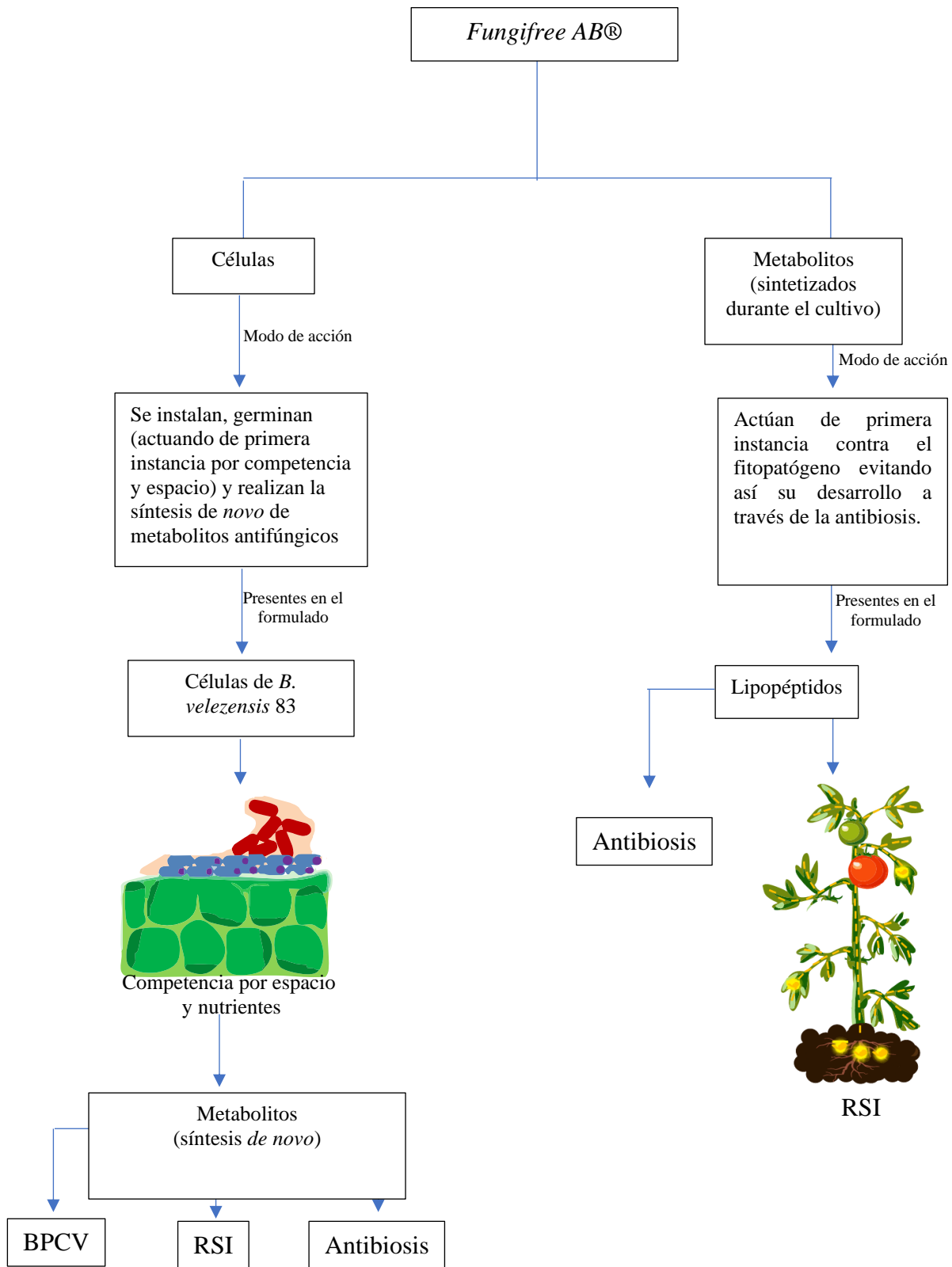


Figura 2. Factores de antagonismo presentes en *Fungifree AB®*.

Solis-Arcos (2010) mediante ensayos en HPLC (*high performance liquid chromatography*, por sus siglas en inglés) logró la separación de tres diferentes compuestos termorresistentes (los lipopéptidos bacilomicina, surfactina e iturina) que son sintetizados en las condiciones de cultivo industrial para la producción de esporas de *B. velezensis* 83 y que presentaron actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. Posteriormente, mediante análisis de amplificación de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) y secuenciación de fragmentos cromosomales de *Bacillus* sp 83, Aragón-Gómez (2012) demostró que en el genoma de la bacteria se encuentran presentes los genes de *srfAA*, *bmyD* y *mlnA* (involucrados en la síntesis de los lipopéptidos surfactina, bacilomicina D y el policétido macrolactina A). Además, encontró una secuencia que tenía el 98% de similitud con el gen *baeN* de la cepa FZB42, gen involucrado con la síntesis del policétido bacilaeno.

Por otra parte, Venegas-Brito (2015) realizó ensayos *in vitro* y bioensayos en hojas de mango con aplicación de diferentes tratamientos (metabolitos, células, metabolitos más células y el producto *Fungifree AB*®) en pre y post-infección de *C. gloeosporioides*. Observó que, en tratamientos pre-infección (primero la bacteria y luego el hongo), el porcentaje de inhibición *in vitro* era mayor para todos los tratamientos en comparación con los de post-infección. Asimismo, demostró que las células eran el factor con mayor contribución en la inhibición del fitopatógeno. Por otra parte, realizó ensayos con hojas de mango donde evaluó los mismos tratamientos de manera *in vitro*, obteniendo que en los tratamientos post-infección (1° hongo, 2° bacteria) con células de *B. velezensis* 83, tuvieron un porcentaje de inhibición mayor al 80%, en comparación con los de pre-infección (1° bacteria, 2° hongo), los que causaron el 31% de inhibición, con respecto al control (sólo hongo). Sin embargo, en los bioensayos no existió una diferencia significativa entre la aplicación de los tratamientos, pre o post-infección. Por lo tanto, el trabajo de Venegas-Brito (2015) sugiere que el factor que mayormente contribuye a la inhibición de *C. gloeosporioides* son las células.

Luna-Bulbarela *et al.*, (2018) demostraron, en ensayos *in vitro*, que la bacilomicina D es el principal compuesto antifúngico de *B. amyloliquifaciens* 83 (actualmente *B. velezensis* 83, Balderas-Ruíz *et al.*, 2020) contra *C. gloeosporioides*, demostrando que el lipopéptido causa daños en las membranas celulares del micelio y las esporas del hongo, afectando su

viabilidad. En su estudio demostraron que cambios leves en la longitud de la cadena de ácidos grasos (hidrofobicidad) de los homólogos bacilomicina D, causan diferencias significativas en su actividad antifúngica contra las esporas, pero no contra el micelio de *C. gloeosporioides*.

Balderas-Ruíz *et al.*, (2020) realizaron el análisis de la secuencia completa del genoma de *B. velezensis* 83. Observaron que en el genoma se encuentran diez grupos de genes biosintéticos que codifican para metabolitos secundarios, cubriendo alrededor del 8.2% de su genoma. De los diez grupos de genes, observaron que cinco grupos son de sintetetasas peptídicas no ribosomales (NRPS), los cuales son lipopéptidos: surfactina (*srfA*), bacilomicina (*bmy*) y fengicina (*fen*), un sideróforo (*dhb*) y el dipéptido bacilisina (*bac*). Asimismo, identificaron tres grupos de sintetetasas de policétidos (PKS): macrolactina (*mln*), bacilano (*bae*) y dificidina (*dfn*). Además, encontraron un grupo de genes probablemente involucrados en la producción de la amilociclicina lantibiótica, y el grupo de genes *pur* para la síntesis de un compuesto nematocida. Los resultados del análisis genómico realizado por Balderas-Ruíz *et al.*, (2020) sugieren que *B. velezensis* 83 puede producir un amplio repertorio de metabolitos con propiedades de biocontrol (otros más de los ya mencionados: mesarcidina y bacilibactina)

Por otro lado, Balderas-Ruiz *et al.*, (2020) evaluaron características promotoras del crecimiento de las plantas de *B. velezensis* 83. Para ello, realizaron experimentos de co-cultivos *in vitro* de *B. velezensis* 83 con *Arabidopsis thaliana* y de inoculaciones de *B. velezensis* 83 en maíz cultivado en condiciones de invernadero. En los ensayos *in vitro* con *A. thaliana*, observaron que cuando la bacteria es aplicada cerca de la raíz, existe un efecto típico de cambio en la estructura de la raíz. Asimismo, encontraron que *B. velezensis* 83 promovió el desarrollo de raíces laterales y la formación de hojas más grandes de *A. thaliana*. En maíz, con aplicaciones al sustrato, Balderas-Ruíz *et al.*, (2020) reportaron que *B. velezensis* 83 aumentó un 12% la altura y un 45% la biomasa de la raíz de las plantas, con respecto al control. Sin embargo, no observaron efecto sobre la biomasa de los brotes de semilla de maíz. Por otro lado, cuando los tratamientos fueron aplicados a la semilla de maíz, fue evidente un aumento de un 38% en la altura y un 88% en la biomasa del brote de semilla

con respecto al control. Por otra parte, en aplicaciones de los tratamientos en raíz, se observó un aumento en la altura (12%) y en la biomasa radicular (45%), en comparación con las plántulas no inoculadas. Con estos estudios, Balderas-Ruiz *et al.*, (2020) demostraron la capacidad de *B. velezensis* 83 como promotora del crecimiento.

En conclusión, los estudios demuestran que algunas especies bacterianas son eficaces como agentes de control contra *B. cinerea*, debido a sus células capaces de realizar la síntesis de *nov*o de metabolitos antifúngicos.

3. JUSTIFICACIÓN

El tomate es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial y en México por sus altos niveles de producción y exportación. Sin embargo, *B. cinerea* es un fitopatógeno que afecta al tomate, causando pérdidas de hasta el 20% en los cultivos, tanto en pre como en postcosecha, evitando o limitando así la comercialización del producto. El principal método de control de *B. cinerea* es el uso de fungicidas químicos, no obstante, el uso excesivo de éstos causa daños en el medio ambiente y en la salud tanto humana como en especies no blanco. Además, estos agroquímicos generan resistencia en *B. cinerea* con relativa facilidad.

Por lo tanto, el control biológico se vuelve una alternativa viable y sustentable. Existen estudios que demuestran que cepas del género *Bacillus* son eficaces en el control de hongos fitopatógenos. Existen biofungicidas en el mercado, los cuales contienen en su formulado células de *Bacillus* y sus metabolitos (dos factores de antagonismo), lo que les confiere una mayor eficacia en el control de fitopatógenos. Se sabe que *Fungifree AB*® (*B. velezensis* 83) cuenta con dos factores de antagonismo (células y metabolitos) en su formulado, que ejercen un efecto de inhibición contra *C. gloeosporioides*; sin embargo, se desconoce si estos factores pueden ser antagonistas de *B. cinerea* en tomate.

4. HIPÓTESIS

Las células, debido a que realizan la síntesis de *novo* de metabolitos antifúngicos, son el principal factor de antagonismo que contribuye a la eficacia de *B. velezensis* 83 como agente de control biológico contra *B. cinerea* en hojas y frutos de tomate.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de los factores de antagonismo (células y/o metabolitos) presentes en *Fungifree AB®* contra *B. cinerea* 05 en hojas y frutos de tomate.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficacia de los factores de antagonismo (células y/o metabolitos de *Fungifree AB®*) contra *B. cinerea* 05, mediante ensayos de inhibición *in vitro* en medio de cultivo.
- Establecer las condiciones de infección de *B. cinerea* 05 sobre hojas y frutos de tomate post-cosecha mediante ensayos *in vitro*.
- Evaluar la eficacia de los factores de antagonismo (células y/o metabolitos) de *Fungifree AB®* contra *B. cinerea* 05 en ensayos *in vitro* llevados a cabo en hojas y en frutos de tomate en post-cosecha.

7. METODOLOGÍA

7.1. Estrategia experimental

Para lograr el objetivo general propuesto para el desarrollo de este proyecto de investigación, el trabajo experimental se dividió en 3 etapas (**Figura 3**):

1) Ensayos de inhibición *in vitro*

En esta primera etapa, mediante ensayos *in vitro* en cajas Petri (medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) se evaluó la eficacia de los factores de antagonismo presentes en *Fungifree AB*® (metabolitos, células), en comparación con un fungicida químico (Clorotalonil), para determinar cuál es el factor que ejerce un mayor efecto de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 05 (cepa proporcionada por Dr. Mario Serrano (CCG UNAM).

2) Establecer las condiciones de infección en hojas y en frutos de tomate (cualitativo)

En ensayos preliminares para determinar la patogenicidad de *B. cinerea* 05 sobre hojas de tomate, se observó que la infección sobre las hojas demoraba en desarrollarse (después de tres días post-inoculación); por consecuente, en ese tiempo las hojas empezaban a verse marchitas. Para ensayos posteriores, esto iba a presentar una dificultad para evaluar la severidad de la enfermedad. Por lo tanto, se probaron diferentes condiciones para mantener las hojas en buen estado durante un periodo más largo. Por consiguiente, se decidió colocar las hojas de tomate en cajas Petri con agar (13 g/L), para retardar la senescencia de estas. Asimismo, para favorecer el rápido desarrollo de la infección por *B. cinerea* 05 en las hojas, se resuspendieron esporas del hongo en diferentes medios: 1) Luria Bertani (LB), 2) Potato Dextrose Broth (PDB) al 25% (Haridon *et al.*, 2011), 3) agua destilada (control). Esto nos permitió saber cuál es la opción más favorable para poder llevar a cabo la infección. Una vez determinado el medio de cultivo con el que se llevaría a cabo la infección (un desarrollo de enfermedad mayor, en menos de tres días), se tuvo que establecer la cantidad de esporas a inocular para observar la infección, por lo tanto, se infectaron las hojas con diferentes concentraciones de esporas.

En frutos de tomate, en ensayos preliminares se observó que no era necesario resuspender las esporas de *B. cinerea* 05 en diferentes medios, debido a que el desarrollo del hongo fue más rápido que en hojas. Por ello, se decidió utilizar agua destilada. Posteriormente, fueron evaluadas las mismas concentraciones utilizadas en las hojas de tomate para observar los resultados en frutos.

La determinación de la concentración de esporas para la infección nos permitió tener una infección reproducible en hoja y en frutos de tomate, para, posteriormente, llevar a cabo los ensayos de inhibición en hojas y frutos de tomate.

3) Ensayos de inhibición en hojas y en frutos de tomate

Por último, en la tercera etapa, se realizaron ensayos con los tratamientos (metabolitos, células y *Fungifree AB*®) en hojas y frutos de tomate. Cada uno de los tratamientos se comparó con los resultados al aplicar el fungicida químico Clorotalonil. En hojas, los ensayos se llevaron a cabo de manera preventiva (primero el tratamiento y después de 48 h el patógeno) y de manera simultánea (tratamiento seguido (con tiempo de espera de dos horas) del patógeno). Al igual que en hojas, en frutos se llevaron a cabo aplicaciones en dos diferentes condiciones: 1) preventiva (el tratamiento se aplicó 12 h antes que el patógeno) y 2) simultánea (el tratamiento se aplicó dos horas antes que el patógeno). Con los ensayos de en hojas y frutos, se evaluó la eficacia biológica (efectividad como fungicida) (la fórmula utilizada se observa en la página 38) de *B. velezensis* 83 como agente de control biológico y, por otra parte, se determinó cuál es el principal factor de antagonismo que contribuye en la eficacia de *B. velezensis* 83 sobre *B. cinerea* 05, en hojas y en frutos de tomate.

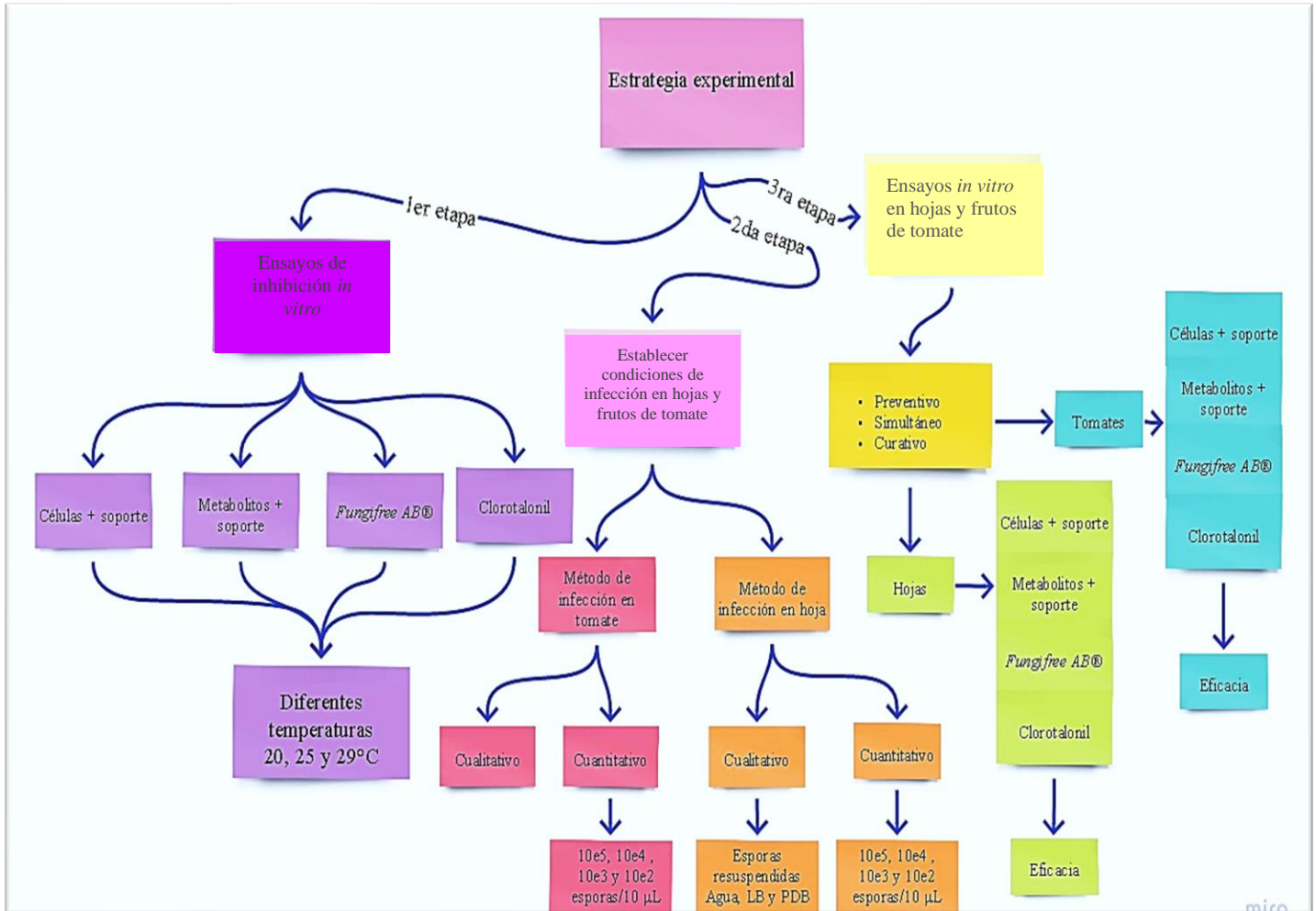


Figura 3. Estrategia experimental para evaluar la eficacia de *B. velezensis* 83 como agente de control biológico contra *B. cinerea* 05.

7.2. Producción de polvos concentrados de *B. velezensis* 83

El proceso de producción de los formulados se realizó con una muestra del cultivo industrial (proporcionado por Agro&Biotecnia S. de R.L de C.V.), el cual fue centrifugado para la separación y recuperación de la biomasa (células) de *B. velezensis* 83 y el sobrenadante (metabolitos). La separación fue realizada en una centrifuga Sharpless a 12,000 rpm. Las células fueron resuspendidas y mezcladas en solución salina (0.9% NaCl) para volverlas a centrifugar con el objetivo de retirar a los residuos de metabolitos. Los centrifugados fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta ser utilizados para preparar

mezclas de: células-soporte o metabolitos-soporte. Posteriormente, la mezcla células-soporte y metabolitos-soporte fue sometida a un proceso de secado por aspersión en condiciones de 120 mL/min, con 120 °C de temperatura de entrada y 60 °C como temperatura de salida. Finalmente, se obtuvieron los polvos concentrados de “células” y el de “metabolitos” que fueron utilizados posteriormente para la preparación de los formulados de *B. velezensis* 83.

7.3. Preparación de formulados para realizar los ensayos de inhibición *in vitro* y ensayos en hojas y frutos de tomate

El proceso de producción de los concentrados se realizó con una muestra de 180 L del cultivo industrial, el cual fue centrifugado para la separación y recuperación de la biomasa de *B. velezensis* 83 y el sobrenadante (no filtrado). Los productos (biomasa y sobrenadante) fueron preparados como polvos concentrados de células (biomasa + soporte) o metabolitos (sobrenadante + soporte) de tal forma que fueron diluidos (1:13) con el soporte, para tener un formulado de células que contuviera 1×10^9 UFC/g (como el formulado comercial) con un rendimiento de 100 kg, asimismo, un rendimiento 93 kg para metabolitos.

7.4. Ensayos de inhibición *in vitro*

En ensayos *in vitro* se evaluó el efecto de la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 05. Los tratamientos se prepararon en las concentraciones que se indican en la **Tabla 3**. Las suspensiones de los tratamientos con metabolitos o con células se prepararon de acuerdo con la proporción que se utiliza para la suspensión del tratamiento usando *Fungifree AB*®. Los metabolitos fueron filtrados (filtro de 0.20 µm) para poder evaluar el efecto de inhibición de los metabolitos sin interferencia de las células residuales.

Tabla 3. Concentraciones de los tratamientos utilizados para los ensayos *in vitro*.

Tratamientos	Concentración
Clorotalonil	3 g/L
“Metabolitos”	2 g/L
“Células”	2 g/L (1×10^9 UFC/g)
<i>Fungifree AB</i> ®	2 g/L (1×10^9 UFC/g)

Se llevaron a cabo tres ensayos de inhibición a diferentes temperaturas (20, 25 y 29 °C) con el fin de evaluar el efecto de inhibición que ejercen los diferentes tratamientos contra *B. cinerea* 05 en tales condiciones.

Para llevar a cabo los ensayos, se perforó el medio de Papa Dextrosa Agar (Potato Dextrose Agar, PDA por sus siglas en inglés) en cuatro puntos equidistantes (**Anexo 4**). En los orificios horizontales se colocaron 100 µL de los tratamientos. De igual manera, en los orificios verticales se colocaron 100 µL de agua destilada estéril (control), para posteriormente incubarlas durante 12 h a 29 °C. Posteriormente, en el centro de la caja Petri se colocó un explante de 6 mm de diámetro de *B. cinerea* 05 (con 9 días de crecimiento en PDA). Las cajas fueron incubadas en oscuridad durante 72 horas a 20, 25 y 29 °C (Incubadas en Lab Line, EVIRON CAB 680, Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH y cuarto de cultivo, respectivamente) con una humedad relativa del 90%.

Se utilizaron cinco cajas de PDA por tratamiento. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula (en el **Anexo 5** se muestra ejemplo de mediciones):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{crecimiento neto del control} - \text{crecimiento neto tratamiento}}{\text{crecimiento neto control}} \times 100$$

Crecimiento neto del control = diámetro de crecimiento del patógeno con respecto a los controles

Crecimiento neto del tratamiento = diámetro de crecimiento del patógeno con respecto a los tratamientos

Se realizó el análisis estadístico de los datos para comparar el efecto de los tratamientos aplicando ANOVA de una vía y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

7.5. Germinación de semillas de tomate rojo

Para llevar a cabo la germinación de semillas se utilizaron 270 g de sustrato Peat Moss (*Canadian sphagnum*) estéril (esterilizada en autoclave) al cual se le agregaron 300 mL de agua destilada estéril. Una vez que la tierra estaba totalmente humedecida, se colocó en una charola de germinación de treinta pozos. En cada pozo se agregó una semilla de tomate variedad Frodo (Hybrid Tomato (*Solanum lycopersicum*), marca ITSCO). Una vez terminada

la siembra, la charola fue guardada en el cuarto de cultivo a 25 °C durante 15 días. Después de este tiempo, las plántulas fueron trasplantadas a vasos desechables térmicos (con capacidad de 250 mL) con nuevo sustrato estéril. Las plantas fueron regadas cada tercer día con agua destilada estéril y solución nutritiva de Hoagland al 20% para complementar la nutrición de las plántulas (**Anexo 6**).

7.6. Establecimiento del método de infección

7.6.1. Preparación de la suspensión de esporas de *B. cinerea* 05

La cepa de *B. cinerea* 05 se creció en medio PDA durante nueve días a 25 °C. Existen estudios (Chassot *et al.*, 2007; Haridon *et al.*, 2011) donde utilizan esporas resuspendidas en medio PDB (Potato Dextrose Broth, por sus siglas en inglés) 25% para llevar a cabo la infección en hojas, favoreciendo así el desarrollo de *B. cinerea* 05. Por lo tanto, en este estudio se comparó el desarrollo de la enfermedad cuando las esporas de *B. cinerea* 05 fueron resuspendidas en diferentes medios de cultivo. Para llevar a cabo el ensayo se utilizó medio PDB y LB (Lysogeny broth, por sus siglas en inglés), en comparación con esporas resuspendidas en agua destilada.

Se tomó una caja Petri de *B. cinerea* 05 por cada uno de los medios, se le hizo un lavado con 10 mL de LB al 25%, PDB al 25% o agua destilada. Posteriormente, se hizo un lavado de las esporas y fueron separadas del micelio a través de un filtro (0.45 µm). Éstas se colocaron en tubos Eppendorf de 1 mL y se dejaron reposar durante una hora (para asimilar el medio) Seguidamente se hizo un conteo en la cámara Neubauer para estimar la concentración de esporas por mL de cada caja.

Finalmente, se infectaron 6 hojas por cada medio (2 hojas/caja Petri). Las hojas fueron colocadas en 3 cajas Petri con agar. En la mitad de cada hoja se le colocaron 30 µL de una suspensión 1×10^8 esporas / mL.

El procedimiento se describe con detalle en el **Anexo 7**. Las cajas fueron selladas con Parafilm y forradas con papel de estraza (para evitar la filtración de luz), se guardaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) durante 3 días a 25 °C con una humedad relativa del 90%.

7.6.2. Procedimiento de infección en hojas

Para la infección en hojas se realizaron ensayos *in vitro* utilizando hojas provenientes de plántulas con 30-40 días de crecimiento en charola. Las hojas fueron colocadas en cajas Petri con agar (debido a que mantienen en mejor estado a la hoja), para posteriormente proceder a infectarlas con esporas de *B. cinerea* 05 con 9 días de incubación. Se probaron diferentes cantidades de esporas: 10^5 fue la condición inicial en la cual se observó el desarrollo de la infección en hojas y en frutos, posteriormente fueron evaluadas diferentes cantidades de esporas (10^6 , 10^5 y 10^4) resuspendidas en medio PDB (25%) para determinar la cantidad a inocular en posteriores ensayos de antagonismo en hojas.

Para cada condición a evaluar se utilizaron seis hojas, a las que se les colocaron 3 gotas de 10 µL de la suspensión de esporas correspondiente. Esto se llevó a cabo en una mitad de la hoja (tratamiento) sin tocar el nervio principal y en la otra mitad se colocó sólo agua destilada (control). Esto se llevó a cabo con cada una de las hojas. Las cajas fueron selladas y envueltas en papel de estraza para evitar la filtración de la luz (*B. cinerea* 05 se desarrolla mejor en oscuridad).

Finalmente, se colocaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) durante 3 días a 25 °C con una humedad relativa de 90%. El área de la infección sobre la hoja fue evaluada mediante el análisis de las imágenes con el *software* ImageProPlus. La severidad fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Severidad} = 1 - \frac{(\text{área de infección del control} - \text{área de infección con tratamiento})}{\text{área de infección del control}} \times 100$$

I = 100 % de desarrollo de la enfermedad sobre el tejido vegetal

7.6.3. Procedimiento de infección en frutos de tomate

Para poder llevar a cabo la infección de *B. cinerea* 05 en tomates, se utilizaron frutos de cuatro días postcosecha, los cuales fueron proporcionados por FIRA Tezoyuca, Morelos (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). Los tomates fueron esterilizados con cloro comercial (5 mL/L durante 15 min). Una vez esterilizados, fueron enjuagados con agua destilada estéril y dejados secar en campana de flujo laminar (GHFL A12). Posteriormente, cada fruto se perforo en dos puntos equidistantes, uno para aplicar el control y el otro para aplicar el tratamiento, la perforación (de 3 mm de profundidad) en tomates se realizó con un palillo estéril. Seguidamente, en un punto fueron inoculados 10 μ L de una concentración de esporas con 1×10^8 esporas/mL, en el otro punto (control) sólo fue inoculado con agua destilada estéril (**Anexo 8**). Finalmente, los tomates fueron guardados en vasos de precipitados (capacidad de 500 mL) los cuales fueron forrados con papel de estraza para evitar la filtración de la luz y se colocaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C durante 3 días a una humedad relativa de 90%.

7.6.4. Establecimiento del método de infección con esporas de *B. cinerea* 05 en tomates

Para determinar la cantidad de esporas de *B. cinerea* 05, con el fin de causar infección en frutos de tomates, se utilizaron frutos con cuatro días postcosecha, los cuales fueron esterilizados con una solución de cloro comercial (5 mL/ L durante 15 min). Una vez esterilizados, cada fruta fue herida con un palillo (3 mm de profundidad) en dos puntos equidistantes. Un punto fue inoculado con diferentes cantidades de esporas ($10^5, 10^4, 10^3$ y 10^2 esporas por punto de inoculación), el otro punto fue inoculado con agua destilada estéril. Para cada cantidad esporas a evaluar se utilizaron cinco tomates. Finalmente, éstos fueron guardados en vasos de precipitados (capacidad de 500 mL) y forrados con papel de estraza para evitar la filtración de la luz. Los vasos se colocaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C durante 3 días a una humedad relativa de 90%. El área de la infección fue calculada como se muestra en la **tabla 4** y las mediciones de diámetros se hicieron con una regla. La severidad fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Severidad} = \left(1 - \frac{(\text{área de infección del control} - \text{área de infección con tratamiento})}{\text{área de infección del control}} \right) \times 100$$

el área fue calculada con la siguiente formula:

$$\text{área infectada} = \frac{(\pi) (\text{diámetro de la infección horizontal}) (\text{diámetro de la infección vertical})}{4}$$

4 ya que $r = \frac{d}{2}$

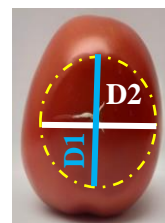


Tabla 4. Ejemplo del cálculo de área en tomates

D1	D2	D1*D2	*π	/4 = área
3 cm	3.7 cm	11.1 cm ²	34.87	8.71 cm ³
Que es =	D1+D2/4= r	r ²	*π = área	
	1.67 cm	2.80 cm ²	8.79 cm ³	

7.7. Ensayos *in vitro* con tratamientos en hojas y frutos de tomate

7.7.1. Ensayos *in vitro* en hojas de tomate

Se realizaron dos tipos de ensayos de control biológico: 1) preventivo y 2) simultáneo. (Anexo 9.)

1) **Preventivo:** los ensayos de control biológico de manera preventiva se llevaron a cabo utilizando hojas de plántulas con 30-40 días de crecimiento. Se colocaron tres hojas dentro de una caja Petri sólo con agar (para hacer un sistema que mantuviera alto %HR). Cada hoja fue dividida por la mitad (la nervadura de la hoja fue la división natural) y en cada mitad fueron aplicadas tres gotas de 10 µL del tratamiento correspondiente o del control (*B. cinerea* 05). Una vez secas las gotas aplicadas, las cajas fueron selladas con *Parafilm* y colocadas en una incubadora (Lab Line, EVIRON CAB 680) a 29 °C durante 48 h (considerando que en ese tiempo las esporas de *B. velezensis* 83 ya habían germinado sobre la hoja). Terminado el tiempo de incubación, se aplicaron tres gotas de 10 µL de una concentración con

1x10⁶ esporas/ mL de *B. cinerea* 05 en cada lado de la hoja, tratando de inocular en el mismo sitio de aplicación de los tratamientos preventivos. Una vez secas las gotas (aprox. 2 h), las cajas fueron otra vez selladas con *Parafilm* y envueltas con papel estraza para mantener la HR en la caja Petri y evitar la filtración de luz (esta condición favorece el desarrollo de infección del fitopatógeno). Finalmente, las cajas fueron guardadas en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C a una HR de 90% durante 72 h. Estas condiciones fueron utilizadas para favorecer el desarrollo de infección del hongo. En el **Anexo 10a** se ilustra el procedimiento completo para este tipo de ensayos. Para los ensayos de manera preventiva a 29 °C se realizó el mismo procedimiento, sólo cambió la temperatura a 29 °C durante la última incubación de 72 h.

2) **Simultáneo**. Los ensayos en hojas de manera simultánea se llevaron a cabo en hojas de plántulas con 30-40 días de desarrollo. Las hojas fueron colocadas en cajas Petri con agar. Se aplicaron 30 µL de los tratamientos: “células”, “metabolitos”, Clorotalonil y *Fungifree AB*® en tres puntos en cada hoja (un total de tres gotas de 10 µL cada una en una mitad de la hoja) y/o del control (esporas de *B. cinerea* 05). Se aplicaron en diez hojas por tratamiento. Una vez seca la gota del tratamiento (aprox. 2h), se aplicaron 10 µL de esporas de *B. cinerea* 05 sobre el tratamiento y en la otra mitad de la hoja como control positivo se aplicaron 3 gotas de agua destilada, seis gotas en total en cada hoja). Las cajas fueron selladas y envueltas con papel de estraza para evitar la filtración de luz y se guardaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C a una HR de 90% durante tres días. En el **Anexo 10b** se ilustra el procedimiento completo.

El área de infección en hojas fue medida a través de análisis de imágenes (Image-ProPlus), el método utilizado se basa en la identificación de contrastes de colores entre área infectada y no infectada de la hoja, esto nos permitió tener una mayor precisión al determinar la severidad de la enfermedad causada por *B. cinerea* 05.

La inhibición de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* 05 en hojas se calculó de acuerdo con la fórmula de Abbott (1925).

$$\left[\text{Eficacia} = \frac{(\text{diámetro de inhibición del daño} - \text{diámetro de inhibición del tratamiento})}{\text{diámetro de inhibición del control negativo}} \right] \times 100$$

Control negativo: se aplicaron solamente esporas de *B. cinerea* resuspendidas en medio PDA.

7.7.2. Ensayos *in vitro* en frutos de tomate

Para los tratamientos se prepararon suspensiones de Clorotalonil, “metabolitos”, “células” y *Fungifree AB*®. Para el inóculo de infección se preparó una suspensión de esporas de *B. cinerea* 05 a una concentración de 1×10^6 esporas/mL para realizar al igual que en hojas, los ensayos de control biológico: 1) preventivo y 2) simultáneo en frutos (**Anexo 9**).

Preventiva: La infección en frutos de tomate de manera preventiva se llevó a cabo en tomates maduros, con cuatro días postcosecha. Los tomates fueron esterilizados con cloro comercial (5 mL/L durante 15 min), una vez esterilizados, cada fruto fue herido con un palillo (3 mm de profundidad) en dos puntos equidistantes. Un punto fue inoculado con 10 µL de los tratamientos (“células”, “metabolitos” y *Fungifree AB*®) y se guardaron en la incubadora (Lab Line, EVIRON CAB 680) a 29 °C durante 12 h (permitiendo que las esporas de la bacteria germinen). Terminado el tiempo de incubación, en ambas heridas fueron inoculados 10 µL de concentración de esporas de *B. cinerea*. Los tomates fueron guardados en vasos de precipitados (capacidad de 5000 mL), los cuales fueron forrados con papel de estraza para evitar la filtración de la luz y se colocaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C durante 3 días a una HR 90%. Los ensayos de manera preventiva 29 °C se realizaron de igual manera, sólo cambiando la temperatura (a 29 °C) de la incubación final. En el **Anexo 11a** se ilustra el procedimiento de infección en tomates aplicando los tratamientos de manera preventiva.

Simultánea: Cada fruto de tomate fue herido con un palillo (3 mm de profundidad) en dos puntos equidistantes (simulando dos caras en el fruto), un punto fue inoculado con 10 µL

del tratamiento correspondiente (Clorotalonil, “células”, “metabolitos” y *Fungifree AB®*) o del control (esporas de *B. cinerea* 05). Después de 2 h, las heridas fueron inoculadas con 10 μL (1×10^6 esporas/ mL) de *B. cinerea* 05. Los tomates fueron guardados en vasos de precipitados (capacidad de 5000 mL) los cuales fueron forrados con papel de estraza para evitar la filtración de la luz y se colocaron en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C durante 3 días a una HR 90%. En el **Anexo 11b** se ilustra el procedimiento de infección en tomates aplicando los tratamientos de manera simultánea a 25 °C.

La efectividad de *B. velezensis* contra *B. cinerea* 05 en tomates se calculó de acuerdo con la fórmula de Abbott (1925). La fórmula para utilizar es la ya descrita en la sección 7.6.2.

$$\text{área infectada} = \frac{(\pi) (\text{diámetro de la infección horizontal}) (\text{diámetro de la infección vertical})}{4}$$

$$4 \text{ ya que } r = \frac{d}{2}$$

Análisis estadístico:

A todos los datos obtenidos en los ensayos, se les realizó un ANOVA y una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Ensayos de inhibición *in vitro*

Como se ilustra en la **Figura 4**, las células de *B. velezensis* 83 se establecieron y crecieron, ejerciendo un efecto de inhibición en el crecimiento de *B. cinerea*. Se observó que la temperatura influyó en el desarrollo del hongo, a 29 °C, *B. cinerea* 05 prácticamente no creció (**Anexo 12**), por lo tanto, estos experimentos en esta condición de temperatura fueron descartados.

Las células y *Fungifree AB*® en los ensayos a 20 °C tuvieron el mayor porcentaje de inhibición (30 y 28%, respectivamente), mostrando diferencias significativas en comparación con el tratamiento de “metabolitos” y “Clorotalonil”, los cuales presentaron un efecto del 2 y 3% de inhibición, respectivamente (**Figura 4a**). Igualmente, en los ensayos a 25 °C, los tratamientos que presentaron un mayor porcentaje en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* 05 fueron *Fungifree AB*® (23%) y las células (20%), mostrando diferencias significativas sobre los tratamientos “Clorotalonil” y “metabolitos” que tuvieron un efecto del 12 y 1% en la inhibición, respectivamente (**Figura 4b**).

Por lo tanto, los metabolitos producidos durante la fermentación no fueron suficientes para ejercer un efecto de inhibición contra *B. cinerea* 05 en ensayos *in vitro*. Resultados similares los reportó Venegas-Brito (2015) al utilizar el tratamiento de metabolitos contra *C. gloeosporioides*, argumentando que las células durante su proceso de fermentación no produjeron los metabolitos (o los produjeron en muy baja cantidad) para inhibir el crecimiento del patógeno, es decir que, para el control biológico, las células de *B. velezensis* 83 necesitan estar activas para llevar a cabo la producción de metabolitos necesarios e inhibir al patógeno.

Pese a que la bacteria no estuvo en condiciones óptimas de desarrollo y/o producción de metabolitos (*B. velezensis* 83 esporula a 29 °C), su efecto inhibitorio fue mayor al presentado por el fungicida químico, la presencia de halos inhibitorios nos sugiere que el principal modo de acción es la antibiosis; por supuesto, sin descartar la competencia por espacio y nutrientes.

Se concluyó que las “células” y/o *Fungifree AB*® a 20 °C y a 25 °C, ejercen una mayor inhibición de *B. cinerea* 05 en comparación de Clorotalonil, demostrando así ser de mejor eficacia que un fungicida químico en ensayos *in vitro*.

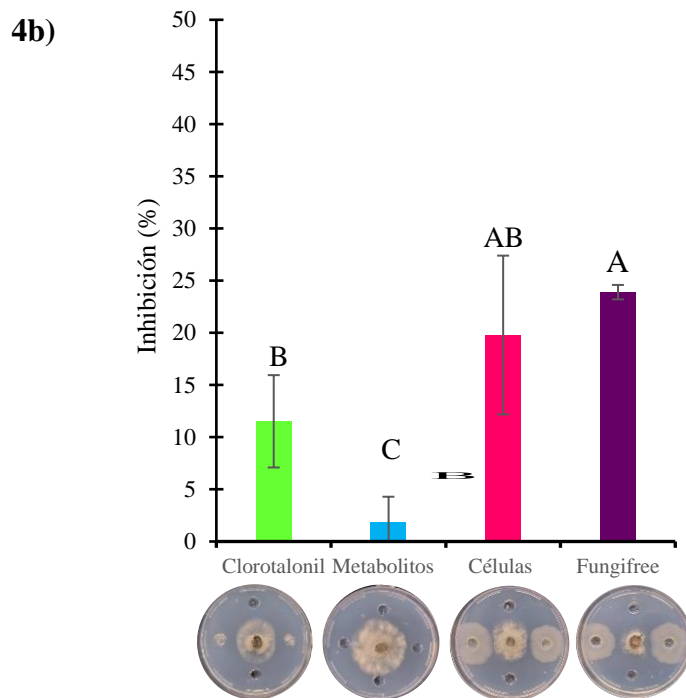
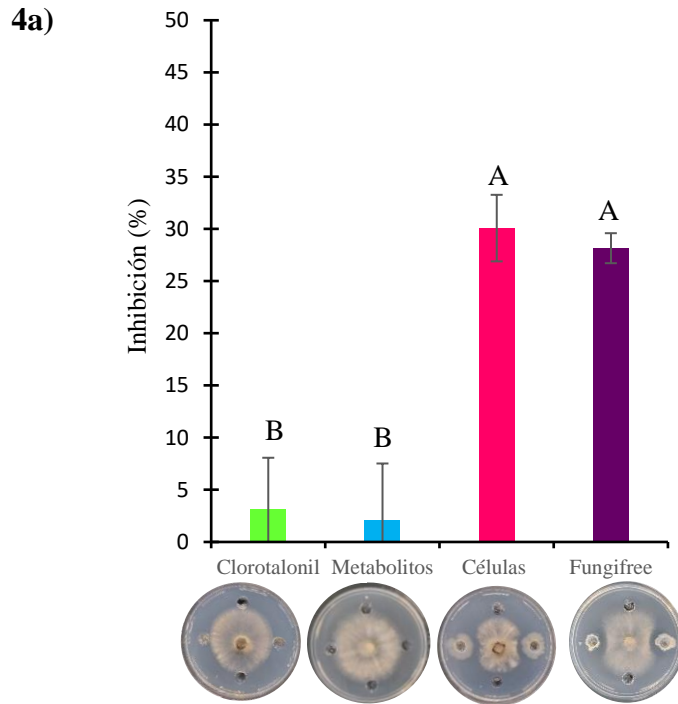


Figura 4. Porcentaje de inhibición *in vitro* de los diferentes factores de antagonismo de *B. velezensis* 83(células y metabolitos) contra *B. cinerea* 05 en comparación con un fungicida químico (Clorotalonil). Ensayos a (4a) 20 °C, (4b) 25 °C. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANOVA, Tukey ($p < 0.05$)). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

8.2. Infección de *B. cinerea* 05 en hojas de tomate

De primera instancia, se llevaron a cabo ensayos de infección en las hojas con esporas de *B. cinerea* 05 resuspendidas en tres medios diferentes (LB, PDB y agua), con el fin de observar cuál nos permitía un desarrollo de enfermedad reproducible en menor tiempo. Como se observa en la **Figura 5**, el medio PDB mostró infección por *B. cinerea* 05 en las hojas a 3 días de post-inoculación. En comparación, en ese mismo tiempo, las hojas inoculadas con esporas resuspendidas en los otros medios, no presentaron infección o ésta era muy ligera. Debido a esto, se optó por utilizar esporas suspendidas en el medio PDB para poder realizar posteriores ensayos de infección en hojas. En un siguiente experimento se utilizaron diferentes concentraciones de esporas para la inoculación de las hojas y así establecer la cantidad de esporas a utilizar para causar infección de forma reproducible en futuros ensayos. Se hicieron inoculaciones con 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 por mL (inoculando 30 μ L de la suspensión (**Anexo 7**)) para evaluar el desarrollo de infección en cada condición.

Como se ilustra en la **Figura 6**, la cantidad de esporas de 10^7 y 10^6 por mL fueron las que mostraron el mejor desarrollo de la enfermedad a las 72 h, empero, se decidió utilizar la cantidad 10^6 por mL de esporas debido a que sus valores de área fueron muy similares siempre. En la misma figura se puede observar el área de infección debida a la aplicación del hongo (lado izquierdo de la hoja) y el control (lado derecho de la hoja), donde no se observa infección evidente.

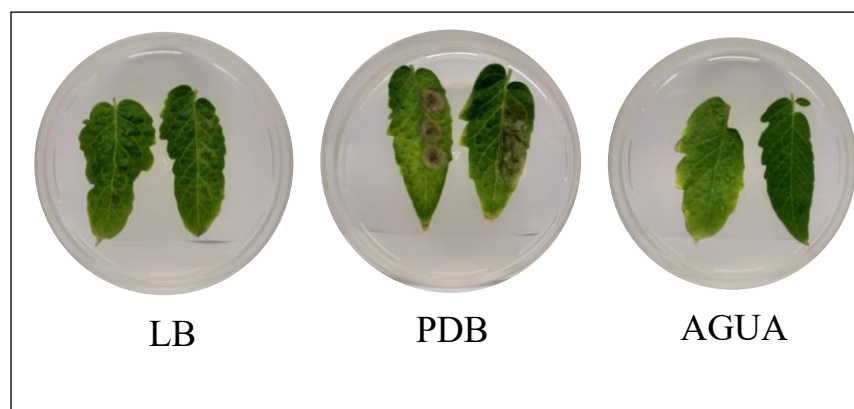


Figura 5. Infección de hojas de tomate con esporas de *B. cinerea* 05 suspendidas en diferentes medios.

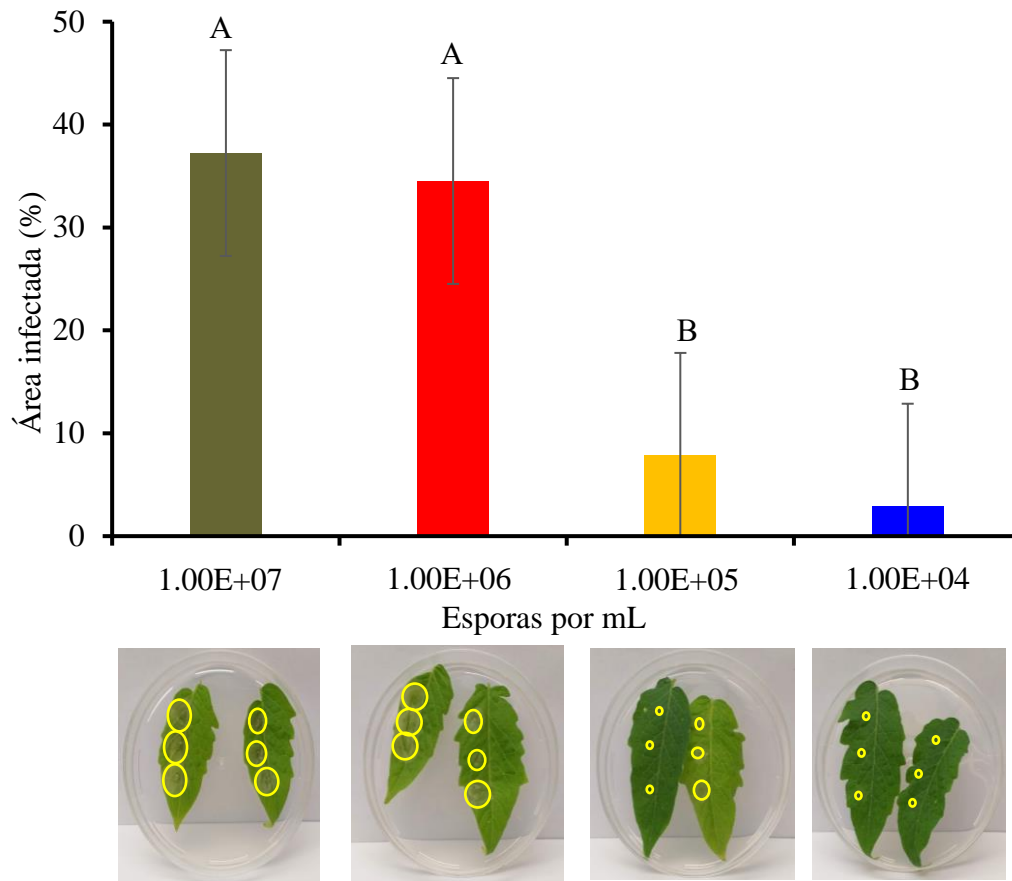


Figura 6. Efecto de las diferentes concentraciones de esporas en las hojas de tomates para el desarrollo de la enfermedad a los tres días de post-infección. Las líneas amarillas en las hojas ilustran el área y/o desarrollo de la enfermedad. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (anova y tukey $p < 0.05$). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

8.3. Infección de *B. cinerea* 05 en frutos de tomate

De primera instancia se realizaron ensayos de infección en tomates utilizando 1×10^8 esporas/mL (inoculando 10 μ L de la suspensión); sin embargo, el daño en los frutos fue muy severo (**Figura 7**). Por lo tanto, se evaluaron diferentes concentraciones de esporas (10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 /mL) para llevar a cabo la infección, evaluando el área de infección a los tres días post-inoculación. Los resultados, ilustrados en la **Figura 8**, mostraron que utilizando 10^6 /mL, la gravedad de la enfermedad se presenta igual que utilizar 10^7 esporas por mL. Por el contrario, las concentraciones de esporas de 10^5 y 10^4 por mL causaron daño mínimo y nulo, respectivamente (**Figura 8**). Por consiguiente, la concentración de 10^6 esporas por mL (en una suspensión de 10 μ L de volumen) fue seleccionada para infectar frutos en los ensayos posteriores.

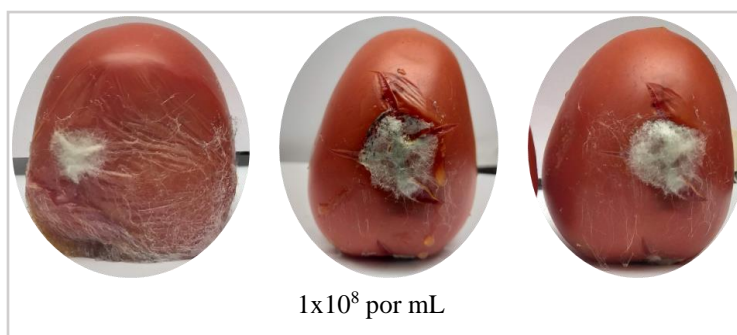


Figura 7. Pruebas de patogenicidad de *B. cinerea* 05 en tomates utilizando una suspensión con 1×10^8 esporas/mL (inoculando 10 μ L en cada herida)

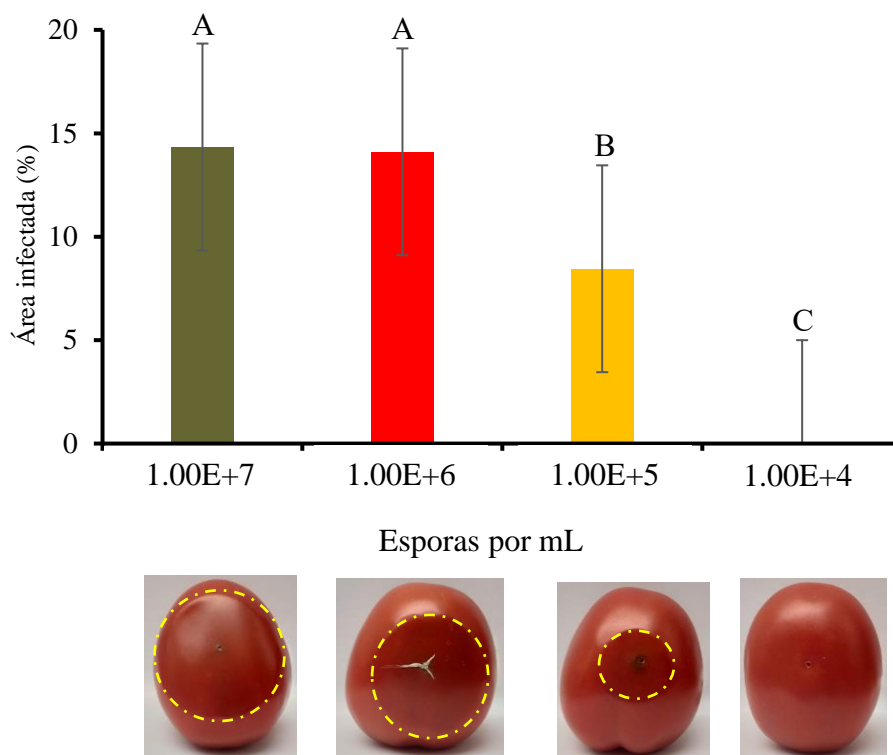


Figura 8. Área infectada en función de la inoculación de diferentes concentraciones de esporas de *B. cinerea* 05 a los tres días post-infección de frutos de tomates. Las líneas amarillas en los tomates ilustran el área de la enfermedad. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (anova y tukey $p < 0.05$). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

8.4. Ensayos *in vitro* en hojas de tomate

Tratamiento preventivo a 25 °C: en los ensayos llevados a cabo de manera preventiva a 25 °C (**Figura 9b**), el factor de antagonismo “metabolitos” presentó un efecto de inhibición del 11%. Por el contrario, el factor “células” mostró un efecto de inhibición del 23%; sin embargo, su efecto de inhibición fue menor al presentado cuando los dos factores están presentes en *Fungifree AB*® (53% de inhibición). En cambio, Clorotalonil presentó un efecto de inhibición del 99% contra *B. cinerea* 05

Tratamiento simultáneo a 25 °C: con ensayos *in vitro* llevados a cabo de manera simultánea a 25 °C en hojas de tomate (**Figura 9a**), se observó que el factor de antagonismo “metabolitos” inhibió en un 10% el desarrollo de *B. cinerea*. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos con los ensayos llevados a cabo de manera preventiva a 25 °C. Sin embargo, el factor “células” presentó una disminución en la inhibición de la infección, en comparación con los ensayos llevados a cabo de manera preventiva (donde mostró sólo un 10 % inhibición en el desarrollo de *B. cinerea* 05), en contraste, se observó que al estar juntos los dos factores de antagonismo (células y metabolitos) en *Fungifree AB*® existe un efecto de inhibición mayor (del 37%), no obstante, este es menor al presentado de manera preventiva a 25 °C. Clorotalonil que mantuvo el 98% de inhibición ya presentado en los ensayos a 25 °C.

Tratamiento preventivo a 29 °C: Por otra parte, en los ensayos de manera preventiva a 29 °C (**Figura 9c**), la condición “metabolitos” presentó un 10% de inhibición, mismo porcentaje ya antes observado en los ensayos de manera preventiva y simultánea a 25 °C. En cambio, las células inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* 05 en un 31%. La eficacia de los factores “células” y “metabolitos” presentaron un aumento en la inhibición (70%) de *B. cinerea* 05 cuando están juntos en *Fungifree AB*®. Clorotalonil continuó mostrando una eficacia del 98% de inhibición

En los ensayos de manera preventiva a 29 °C, *B. cinerea* se desarrolló sobre los tejidos de las hojas aprovechando la alta densidad foliar y/o que los tejidos se encuentran en senescencia para poder desarrollarse (Srivastava *et al.*, 2018), todo lo contrario a lo observado en ensayos *in vitro*, donde el patógeno no le fue posible crecer y/o desarrollarse. Asimismo, se observó un aumento en la eficacia de todos los tratamientos de manera preventiva a 29 °C en comparación con los ensayos de manera simultánea.

Las células de *B. velezensis* 83 en aplicaciones preventivas aumentaron su efecto inhibitorio, con respecto a los ensayos de manera simultánea, una posible explicación, podría ser que se permite la instalación y colonización *B. velezensis* 83 en los tejidos y la posterior síntesis de metabolitos antifúngicos que protegen a la hoja contra la infección de *B. cinerea*

05, dando como resultado una mayor eficacia. Estos resultados indican que la aplicación preventiva de *B. velezensis* 83 influyó considerablemente en su eficacia como agente de control biológico.

Una posible explicación a los bajos efectos de inhibición presentados por los factores “células” y “metabolitos” contra *B. cinerea*, es la falta de nutrientes en la hoja (Burrage, 1971; Hannusch y Boland, 1996). Las células y los metabolitos cuentan con un soporte el cual le permite adherirse a la hoja. Sin embargo, cuando las hojas están en senescencia empiezan la removilización de nutrientes y micronutrientes (Taiz *et al.*, 2015), por lo que, el patógeno se instala y aprovecha que la hoja está en senescencia para causar necrosis tisular de manera más rápida, por ello se podría observar una eficacia menor en el control de *B. cinerea* 05.

Es decir, la eficacia del biocontrol de la bacteria puede ser influida por la disponibilidad de nutrientes en la filósfera y por la interacción y competencia entre el ACB y patógeno (Burrage, 1971; Hannusch & Boland, 1996; Guetsky *et al.*, 2010).

Los resultados de los tres ensayos en hojas sugieren una posible interacción sinérgica entre el factor “células” y el de “metabolitos”, dando como resultado un mayor efecto de inhibición contra *B. cinerea* 05 cuando ambos están presentes en *Fungifree AB*®.

En el formulado de *Fungifree AB*® se encuentran los lipopéptidos surfactina y bacilomicina, no obstante, se podrían encontrar otros metabolitos como lo pueden ser: enzimas líticas, policétidos, péptido sintetasa no ribosomales y/o COV, entre otros metabolitos (el genoma de *B. velezensis* 83 alberga diez grupos de genes dedicados a la síntesis de biocontrol, lo que nos permite pensar que otros metabolitos también podrían ser los que están relacionados con la eficacia de *B. velezensis* 83) (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Los metabolitos sintetizados durante el cultivo industrial podrían estar interactuando con los metabolitos sintetizados por las células en un microambiente, dando lugar a un mejor resultado de inhibición (Lahlali *et al.*, 2011). En tal caso, los metabolitos no sólo actúan por

antibiosis al inhibir la germinación y/o desarrollo del patógeno, sino también como agentes de competencia al facilitar la colonización de las células de *B. velezensis* 83.

Dicho esto, la competencia por espacio y nutrientes podría desempeñar un papel importante en la inhibición de *B. cinerea*, aunque, evidentemente no se puede descartar la antibiosis. Es decir, la eficacia *B. velezensis* 83 en hojas de tomate es el resultado de las interacciones de los mecanismos de acción (competencia y antibiosis)

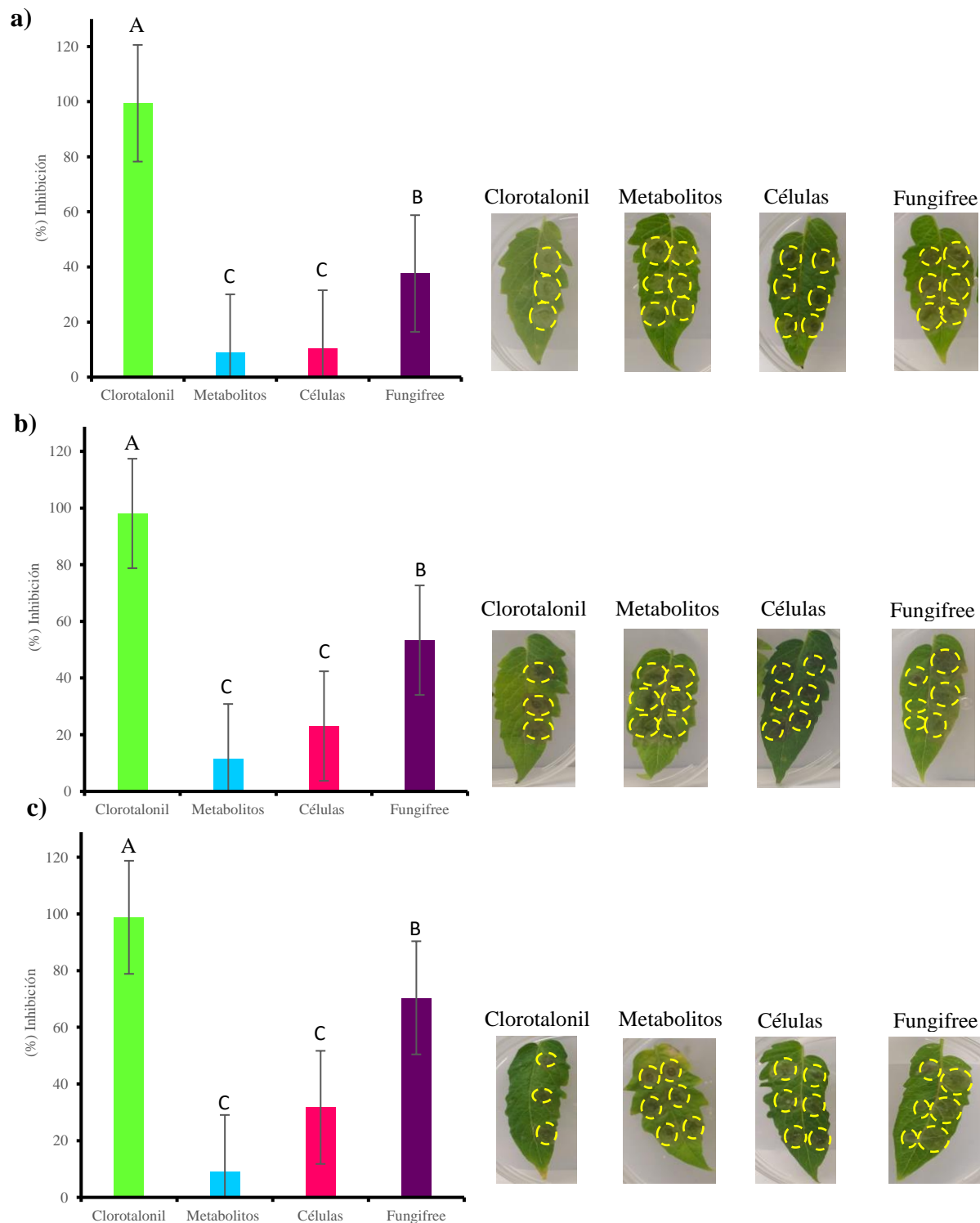


Figura 9. Porcentaje de inhibición de los factores de antagonismo (presentes en *Fungifree AB*®) observado a los tres días post-inoculación de *B. cinerea* 05. Aplicación simultánea a 25 °C (**Figura 9a**), preventiva a 25 °C (**Figura 9b**), y preventiva a 29 °C (**Figura 9c**) contra *B. cinerea* 05 en hojas de tomate. Las líneas amarillas en las hojas ilustran el área y/o desarrollo de la enfermedad. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (anova y tukey $p < 0.05$). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

8.5. Ensayos *in vitro* en frutos de tomate

En los ensayos de manera simultánea en frutos de tomate (**Figura 10a**), el factor “células” presentó un efecto de inhibición del 50%, similar estadísticamente con el de *Fungifree AB*® (57%) y el de Clorotalonil (63%). Los “metabolitos” presentaron un efecto inhibitorio mucho menor a comparación con el factor “células”.

Por otro lado, en los ensayos llevados a cabo de manera preventiva a 25 °C (**Figura 10b**), se observó cómo el factor “metabolitos” aumentó la inhibición del crecimiento contra *B. cinerea* 05 a 30%, igualando el efecto de Clorotalonil, no obstante, el efecto inhibitorio fue menor al presentado por células y *Fungifree AB*®, los cuales mostraron valores mayores al 80%.

En los ensayos de manera preventiva a 29 °C (**Figura 10c**), los metabolitos no presentaron ningún efecto inhibitorio contra *B. cinerea* 05. Por el contrario, las células aumentaron su efecto de inhibición en comparación con los ensayos llevados a cabo de manera simultánea, teniendo un 90% de inhibición. Asimismo, se observó que el efecto de inhibición fue similar al presentado por *Fungifree AB*® (97%). Cabe destacar que las células y *Fungifree AB*® presentaron un efecto inhibitorio mayor al de Clorotalonil, el cual presentó un 60% de inhibición.

Al igual que en los ensayos con hojas, se observó un efecto inhibitorio mayor cuando los tratamientos fueron aplicados de manera preventiva y a 29 °C. Como se ha planteado en la literatura (Budiharjo *et al.*, 2014), la competencia por espacio y nutrientes, la formación de biopelícula, la capacidad de colonización y posteriormente la síntesis de *novo* que da lugar a metabolitos secundarios antifúngicos (COV, enzimas líticas y lipopéptidos), pueden ser los principales modos de acción de las células contra *B. cinerea* 05 en frutos de tomate. La aplicación preventiva a una temperatura de 29 °C (temperatura óptima de crecimiento de la bacteria) aumenta la eficacia de la bacteria en la inhibición del patógeno.

El factor “células” a 25 °C de manera simultánea en tomates, aumentó su efecto inhibitorio, con respecto a los ensayos en hojas a 25 °C, mostrando ser de igual eficacia que *Fungifree AB*®. Por el contrario, el factor “metabolitos” (a 25 °C) tuvo una inhibición similar a la mostrada en los ensayos con hojas (**Figura 9a**). Se ha demostrado que las células presentan una mayor eficacia contra *B. cinerea*, en comparación con el sobrenadante libre de células (Zerouh *et al.*, 2014). Es decir, las células realizan la síntesis de metabolitos que puede ser estimulada en presencia del patógeno en un microambiente (condiciones controladas; temperatura y humedad) (Ongena *et al.*, 2005, Touré *et al.*, 2004) teniendo como resultado la disminución de la enfermedad. Por otra parte, Clorotalonil mostró un efecto inhibitorio similar al factor “células” (**Figura 10a**).

A diferencia de los resultados de los ensayos llevados a cabo en hojas, en frutos de tomate se observó un mayor efecto inhibitorio por parte de los factores “células”. Esto puede ser debido a que, en los frutos de tomate, hay una mayor cantidad de nutrientes (con respecto a los que hay en las hojas), lo que permite una colonización más rápida de las células de *B. velezensis* 83, dando como resultado un efecto inhibitorio similar al de *Fungifree AB*® (donde están presentes las células y los metabolitos). Asimismo, los “metabolitos aumentaron su efecto inhibitorio en comparación con los ensayos en hojas, el aumento de eficacia de los metabolitos puede ser el resultado de la interacción de los diferentes mecanismos de antagonismo en esas condiciones.

Aun cuando *B. cinerea* 05 se ve favorecido de igual manera por los nutrientes, las células y metabolitos inhiben el crecimiento y/o desarrollo del hongo. Es decir, los efectos antagonistas de los factores se vieron influenciados por el hospedero (frutos de tomates). Se sabe que la efectividad de los factores de antagonismo dependerá de la interacción bacteria-planta-patógeno (Yáñez-Mendizabal *et al.*, 2011).

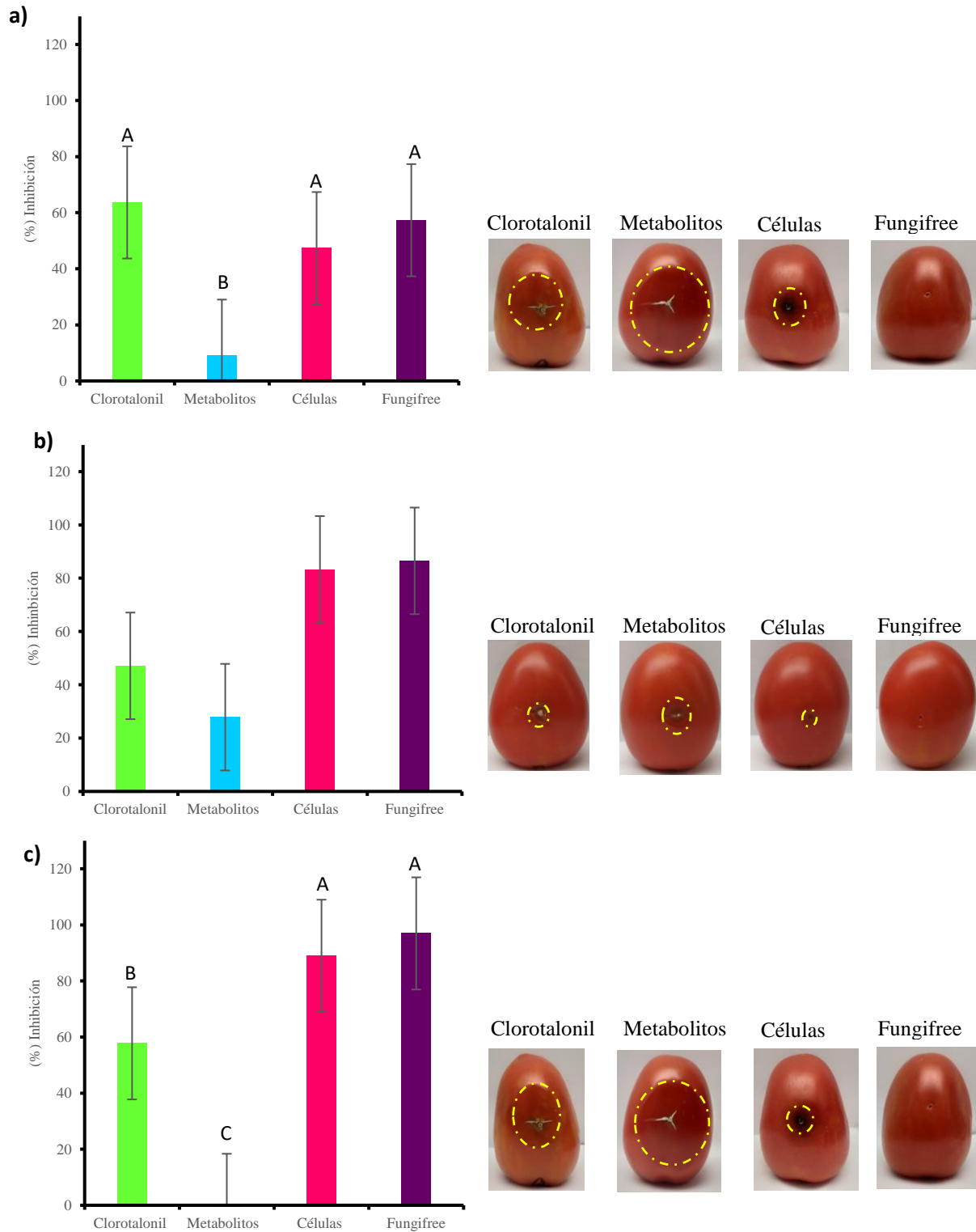


Figura 10. Porcentaje de inhibición de los factores de antagonismo (presentes en *Fungifree AB*®) a los tres días post-inoculación de manera simultánea a 25 °C (**Figura 10a**), preventiva 25 °C (**Figura 10b**, y preventiva a 29 °C (**Figura 10c**) contra *B. cinerea* 05 en frutos de tomate. Las líneas amarillas en las hojas ilustran el área y/o desarrollo de la enfermedad. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (anova y tukey $p < 0.05$). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

8.6. Duración de la protección de los tratamientos *Fungifree AB*® contra *B. cinerea* 05 en tomates

Finalmente, se decidió realizar un seguimiento en los frutos de tomate para conocer el tiempo de duración del efecto inhibitorio de los tratamientos contra *B. cinerea* 05.

Se observó que, cuando los tratamientos fueron aplicados de manera simultánea a 25 °C (**Figura 11a**), en el día tres, *Fungifree AB*® presentó una eficacia del 57%, las células presentaron un 47%, metabolitos presentaron una eficacia del 9%, mientras que Clorotalonil presentó una eficacia del 63%, en el día cinco, los tratamientos disminuyeron su eficacia en un 38, 82, 44 y 66% respectivamente. En el día siete, todos los tratamientos habían perdido su efectividad contra *B. cinerea* 05.

En los tratamientos aplicados de manera preventiva a 25 °C (**Figura 11b**) en tomates, se observa, en el día tres *Fungifree AB*®, células, metabolitos y Clorotalonil presentaron una eficacia del 86, 83, 28 y 47% respectivamente, en el día cinco, *Fungifree AB*® disminuyó su eficacia un 14%, las células disminuyeron un 15%, los metabolitos disminuyeron 17% mientras que Clorotalonil un 4%. En el día siete, los tratamientos redujeron su eficacia con respecto al día tres un 19, 21, 50 y 6% respectivamente. Cabe destacar que, aunque Clorotalonil disminuye ligeramente su eficacia a partir del día tres, esta es menor a la presentada por *Fungifree AB*® y las células.

En el día tres, con respecto a los tratamientos que fueron aplicados de manera preventiva a 29 °C (**Figura 11c**) mostraron: en *Fungifree AB*® una eficacia del 97%, las células un 89%, Clorotalonil un 58%, mientras que los metabolitos no mostraron eficacia contra *B. cinerea* 05.

En el día cinco, los tratamientos disminuyeron su eficacia en el control del patógeno en un 1, 0, 43% respectivamente. En el día siete, *Fungifree AB*® y las células disminuyeron su efecto inhibitorio en un 2 y 4% respectivamente, mientras que Clorotalonil disminuyó en un 50% su eficacia. Por ende, *Fungifree AB*® y las células presentaron una mayor eficacia y durabilidad en días, en comparación con Clorotalonil.

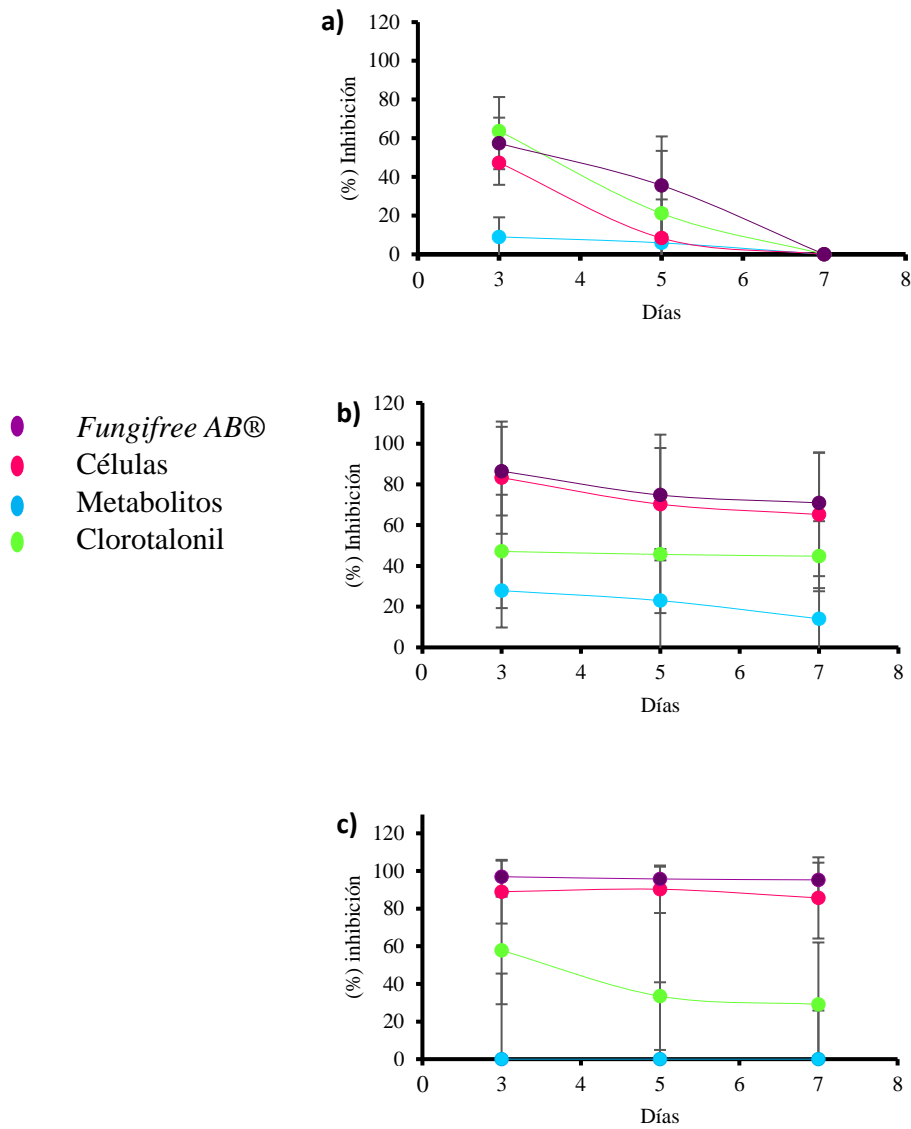


Figura 11. Duración de la eficacia biológica de los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* 05 en: tratamientos en frutos de tomate de en modo de control manera simultáneo (**Figura 11a**), preventivo a 25 °C (**Figura 11b**) y preventivo a 29 °C (**Figura 11c**). La desviación estándar indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la \bar{x} .

En el día cinco, los tratamientos disminuyeron su eficacia en el control del patógeno en un 1, 0, 43% respectivamente. En el día siete, *Fungifree AB*® y las células disminuyeron su efecto inhibitorio en un 2 y 4% respectivamente, mientras que Clorotalonil disminuyó en un 50% su eficacia. Por ende, *Fungifree AB*® y las células presentaron una mayor eficacia y durabilidad en días, en comparación con Clorotalonil.

Mari y Guizzardi (1996) reportaron que la durabilidad del efecto inhibitorio (de *Bacillus amyloliquefaciens* SPVB) esta dentro de un rango de 7 a 13 días y que este iba a ser de menor o mayor duración dependiendo de la temperatura de almacenamiento de los frutos de tomate. Por lo tanto, la temperatura y/o el modo (preventivo o simultáneo) de aplicación influyó en la duración del efecto inhibitorio de los tratamientos contra *B. cinerea* 05.

Los resultados de los ensayos llevados a cabo *in vitro* demostraron que las células (capaces de realizar la síntesis *de novo*) son el principal factor de antagonismo, atribuyendo esto a la producción y difusión de metabolitos que actúan de primera instancia por medio de la antibiosis. Por el contrario, los resultados en ensayos en hojas sugieren que la eficacia de *B. velezensis* 83 es el resultado de las interacciones de los mecanismos de acción (competencia y antibiosis) de las células y/o metabolitos.

En los ensayos en frutos de tomate, las células capaces de realizar la síntesis *de novo* fueron el principal factor de antagonismo, dando como resultado un efecto de inhibición igual al de *Fungifree AB*®. No se descarta una interacción entre las células y los metabolitos; sin embargo, las células en frutos de tomate ejercieron un efecto inhibitorio mayor al presentado en hojas de tomate. Asimismo, cabe destacar que la eficacia de las células fue igual y/o mayor a la presentada por Clorotalonil

Por lo tanto, la efectividad de los factores de antagonismo en hojas y frutos de tomates dependió de la interacción bacteria-planta (hojas, tomates)-patógeno.

9. CONCLUSIÓN

En este proyecto, se decidió trabajar con los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 (“células y/o metabolitos”) presentes en el formulado de *Fungifree AB*®) mediante ensayos de inhibición *in vitro* (en medio de cultivo (PDA)) e *in vitro* con hojas y frutos tomate, esto nos permitió observar:

En los ensayos de antagonismo (en caja Petri), las células capaces de realizar la síntesis *novo*, fueron el principal factor que contribuye en la inhibición de *B. cinerea* 05. Por el contrario, en los ensayos con hojas, se determina que la interacción sinérgica entre los factores (“células y metabolitos”) fue la principal para ejercer un efecto inhibitorio contra *B. cinerea* 05. En los ensayos con frutos de tomate el principal factor de antagonismo fueron las células (capaces de realizar la síntesis de *novo*). Por lo tanto, se concluye que la eficacia los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 es el resultado de la interacción de los mecanismos de acción (competencia y antibiosis), los cuales se verán influenciados por la interacción bacteria-planta (hojas, tomates)-patógeno. La alta durabilidad de la eficacia en frutos de tomate permitirá un almacenamiento del producto por un tiempo más prolongado.

10. PERSPECTIVAS

- Establecer las condiciones de infección con *B. cinerea* en plantas de jitomate para evaluar el control biológico con los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 e identificar cuál es el factor de antagonismo con mayor contribución en la eficacia del control biológico.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W. S. (1925). Method of computing the effectiveness of an insecticide. *JEE*. 18(2), 265–267. doi:10.1093/jee/18.2.265a
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., and Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS Genetics*. 7(8), e1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M., and Aquino-Martínez, J. (2017). In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.). *RMF*. 35, 170–185.
- Aragón-Gómez, W I. (2012). Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. *Tesis de Maestría*. Depto. de Ingeniería Celular y Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Balderas- Ruíz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S.A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, A., Galindo-Fentanes, E., and Serrano-Carreón, L. S. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express* 10(1): 163 <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>
- Blancard, D. (2000). Enfermedades del tomate. Madrid España. I.N.R.A *Estación de Patología Vegetal*, 154-159.
- Budiharjo, A., Chowdhury, S. P., Dietel, K., Beator, B., Dolgova, O., Fan, B., Bleiss, W., Ziegler, J., Schmid, M., Hartmann, A. and Borriss, R. (2014). Transposon mutagenesis of the plant associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 revealed that the *nfrA* and *RBAM17410* genes are involved in plant-microbe-interactions. *PLoS ONE*. 9: e98267.
- Burrage, S.W. (1971). The micro-climate at the leaf surface, in *Ecology of Leaf Surface Microorganisms* (Preece, T.E. & Dickinson, C.H., Eds). *Academic Press, London*, pp. 91-101.
- Chassot, C., Nawrath, C., & Métraux, J. P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal*. 49(6), 972–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x>
- Checinska, A., Paszczyński, A., and Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: Variations in responses and mechanisms for survival. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6(1), 351–369.

- Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., and Rossi, V. (2015). Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype. *EEJ*. 105(8), 1090-1096.
- Cook, R. J., (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* (31), 53–80.
- Correa, O.S., and Soria (2010). Potencial of *Bacillus* for control and it's exploitation in sustainable agriculture, (2010). Plant growth and health promoting bacteria. *Microbiology Monographs*. 18, 197-209.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., and Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 13(4), 414–430.
- FAOSTAT, 2021. Crops. Consulta en línea 26/05/2021. En: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fuentes-López, M. A., (2013). Estudio del crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. y del desarrollo de las podredumbres de frutos de tomate con el uso de aceites esenciales. *Tesis Licenciatura*. Depto. de producción vegetal. Escuela Superior de Ingeniería Agrónoma. Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, España.
- Galindo-Fentanes, E., Serrano-Carreón, L., and Gutiérrez, C. R., (2015). *Fungifree AB®* el primer fungicida desarrollado en México, con certificación orgánica y efectivo para el control de enfermedades fungales en 20 cultivos. *La Unión Morelos, Academia de Ciencias de Morelos*. Págs. 30-31. <http://www.acmor.org.mx/?q=content/fungifree-ab®-el-primer-biofungicida-desarrollado-en-méxico-con-certificación-orgánica>
- Gao, P., Qin, J., Li, D., and Zhou, S. (2018). Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE*, 13(1), 1–15.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., and Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control*. 105, 27–39.
- García-Gutiérrez, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., De Vicente, A. and Pérez-García, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plant against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb Biotechnol.* 6(3), 264–274. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
- Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Clément, C., Baillieul, F., and Aziz, A. (2015). *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response against *Botrytis cinerea* in grapevine. *MPMI*. 28(10), 1117–1129.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., and Dinooor, A. (2010). Improved biocontrol of *Botrytis cinerea* on detached strawberry leaves by adding nutritional supplements to a mixture of *Pichia*

guilermoidii and *Bacillus mycoides*. *Biocontrol Sci Technol.* 12: 5, 625-630. DOI: [10.1080 / 0958315021000016289](https://doi.org/10.1080/0958315021000016289)

- Hannusch, D.J. and Boland, G.J. (1996). Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mould of bean. *EUR. J. Plant Pathol.* 102, 133-142.
- Haridon, F. L., Binda, M., Serrano, M., Abou-mansour, E., Balet, F., Schoonbeek, H.J., León, J., Lamotte, O., and Metráux, J. P., (2011). A permeable cuticle is associated with the release of reactive oxygen species and induction of innate immunity. *PLoS Pathogens.* 7(7): 1-17 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002148>
- Huang, X., Chen, L., Ran, W., and Shen, Q. (2011). *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *AMB.* 741–755. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3259-6>
- Ibarra, J.E., Del- Rincón, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J.A., Pereyra, B., Alcázar, A., Luna, h., Galán, L., Pardo, L., Muñoz, C., Gómez, I., Soberón, M., y Bravo, A (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *RLAM.* 48 (2):113-120.
- Innerebner, G., Knief, C., and Vorholt, J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol.* 77(10) 3202–3210. <https://doi.org/10.1128/AEM.00133-11>
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P. and Ongena, M. (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *MPMI* 22, 456-468.
- Kai, M., Hausteiner, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., and Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *AMB.* 81(6), 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1760-3>
- Kumar, A., Prakash, A. and Johri, B. N. (2011) *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (Maheshwari DK, ed). *Springer Berlin Heidelberg pp.* 37-59.
- Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B. D., Hwang, S. F. and McDonald, M. (2011) Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. *Biocontrol Sci Technol.* 21, 1351-1362.
- Liu, S., Ziegler, J., Zeier, J., Birkenbihl, R. P., and Somssich, I. E. (2017). *Botrytis cinerea* B05.10 promotes disease development in *Arabidopsis* by suppressing WRKY33-mediated host immunity. *Plant, Cell & Environment,* 40(10), 2189–2206. <https://doi.org/10.1111/pce.13022>
- Liu, Y., Liu, Q., Tang, Y., and Ding, W. (2018). NtPR1a regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana tabacum* via activating the defense-related genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2), 1–6.

- Liu., Wei, M. U., Bing-yu, Z. H. U., You-chen, Du., and Feng, Liu. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens, *Agricultural Sciences in China*. 1104–1114. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60153-4)
- Luna-Bulbarela, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., and Serrano-Carreón, L. (2018). Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biol Control*. 127, 145–154.
- Maachia, B., Rafik, E., Chérif, M., Nandal, P., Mohapatra, T., and Bernard, P. (2015). Biological control of the grapevine diseases 'grey mold' and 'powdery mildew' by *Bacillus* B27 and B29 strains. *Indian J Exp Biol*. 53(2), 109–115.
- Mari, M., and Guizzardi, M. (1996). Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Prot*. 15(8), 699–705.
- Martínez-Ruíz, F. E., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Lizette, C., Toro, D., y Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la zona arida del noroeste de México: la Importancia de su diagnóstico. *Eur. Sci. J*. 12(18), 232–256.
- Mongkolthananruk, W. (2012) Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *JMB*. 22, 1597-1604.
- Ongena, M., and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*. 16:115-125.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., and Jabrane, A. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1940-3>
- Peighami-Ashnaei, S., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., and Behboudi, K. (2009). Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. *EUR. J. Plant Pathol*. 91(1), 65–70.
- Picard, C., and Bosco, M. (2008). Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots, *Naturwissenschaften*. 95 (1), 1–16.
- Romero, D., Vicente, A. De, Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J., Arrebola, E., and Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *MPMI*. 20(4), 430–440.
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., and Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *JPP*. 166(9), 601–612.

- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A., 2004. Formulation of *Bacillus spp.* for biological control of plant diseases. *Phytopathology* .94, 1267–1271.
- Serrano-Carreón, L., y Galindo-Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 58, 77–87.
- SIAP. (2017). Panorama Agroalimentario Tomate Rojo 2017. *Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA)*, 2-18. https://www.google.com/search?ei=uGoRXLiXHsbetQX077_QBA&q=panorama+agroalimentario+tomate+rojo+2017&oq=panorama+agroalimentario+to&gs_l=psy-ab.3.0.0I2.1800546.1810265..1811794...1.0..3.212.2673.2j17j1....2..0....1..gws-wiz.....6..0i71j0i67j35i39j0i22i30.G2QBbVITgHM
- Solis-Arcos, Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopéptidos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium spp.* Tesis de licenciatura. Cuernavaca, Morelos. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Srivastava, D. A., Yakubov, M., Feldbaum, R., Tish, N., Shoyhet, H., Manasherova, E., and Harel, A. (2018). Multiparametric analysis of diversity in *Botrytis cinerea* isolates from Israel. *Phytoparasitica*, 46(4), 569–581.
- Taiz, L., Zeiger, E., I Moller, I.M., and Angus Murphy. (2015). Plant Physiology and Development. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 6 th edition (32) 137-143.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., and Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Front Microbiol.* 9: 13-15. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., and Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.* 96(5), 1151–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Turnbull, P.C.B. (1996). *Bacillus*. In: Medical Microbiology, ed. S Baron, Ch. 15. Galveston, TX: Univ. Tex. Med. Branch. 4th edition, 150-200
- Veloso, J., and van Kan, J. A. L. (2018). Many shades of grey in *Botrytis* host-plant interactions. *Trends Plant Sci.* 23(7), 613–622.
- Venegas-Brito, M. (2015) Evaluación de los factores de antagonismo presentes de un fungicida comercial a base de *Bacillus sp* 83, contra la antracnosis del mango, Tesis de licenciatura. Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., and De los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *MJP.* 36(1) 95-130.

- Wang-H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., and Wang, A. (2018). A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* cooke and promote the growth of seedlings. *Int J. Mol Sci.* 19(5), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms19051371>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.* 8(5), 561–580.
- Yáñez-Mendizábal, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., and Teixido, N. (2011). Biocontrol science and technology potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Sci Technol.* 31 699-705. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>.
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., and Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ Microbiol.* 16(7) 2196–2211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.122>
- Zheng, Y., Wang, X., Liu, S., Zhang, K., Cai, Z., Chen, X., and Wang, A. (2018). The endochitinase of *Clonostachysrosea* expression in *Bacillus amyloliquefaciens* enhances the *Botrytis cinerea* resistance of tomato. *Int. J. Mol. Sci.* 19(8), 1-10. <https://doi.org/10.3390/ijms19082221>
- Zhou, M., Li, P., Wu, S., Zhao, P., and Gao, H. (2019). *Bacillus subtilis* CF-3 volatile organic compounds inhibit *Monilinia fructicola* growth in peach fruit. *Front Microbiol.* 10, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01804>
- Zou, C. S., Mo, M. H., Gu, Y. Q., Zhou, J. P., and Zhang, K. Q. (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soc Sci Med.* 39, 2371-2379. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.009>

ANEXOS

Anexo 1. Cultivos y enfermedades causadas por hongos foliares para las cuales está actualmente autorizado en México el fungicida a base de *B. velezensis* 83 (tomado de la ficha técnica de *Fungifree AB®*)

Uso	Cultivo	Enfermedad	Dosis	Observaciones
CAMPO ABIERTO	Mango (0)	Antracnosis <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	200 g/ 100 L agua	Realizar tres aspersiones al follaje a intervalos de 60 días.
	Aguacatero (0)	Antracnosis <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2.0 – 4.0 g/L de agua	Realizar 3 aplicaciones al follaje a intervalos de 30 días, para asegurar un control adecuado es necesario agregar a la mezcla un adherente a razón de 1 mL/L de agua y un bioestimulante hormonal a razón de 700 mL/ 2000 L de agua: volumen de aplicación 1675 – 1775 L de agua/ha.
	Papayo (0)	Antracnosis <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2.0 – 4.0 g/L de agua	Realizar cuatro aplicaciones al follaje, a intervalos de 7 días: volumen de aplicación 500 – 600 L de agua/ha.
	Lima Limonero Mandarino Naranja Toronjo (0)	Antracnosis <i>Colletotrichum acutatum</i>	2.0 - 4.0 kg/ha	Realizar cuatro aplicaciones al follaje, a intervalo de 10 días; agregar a la mezcla un coadyuvante; volumen de aplicación 1950-2050 L de agua/ha.
	Berenjena Chile Chile Bell Jitomate Tomate de cáscara (0)	Cenicilla <i>Leveillula taurica</i>	2.0-2.5 kg/ha	Realizar cuatro aplicaciones al follaje, a intervalo de 7 días; volumen de aplicación 750-850 L de agua/ha
AGRICULTURA PROTEGIDA	Calabaza Calabacita Chayote Melón Pepino Sandía (0)	Cenicilla <i>Erysiphe cichoracearum</i>	1.5 -2.5 kg/ha	Realizar cuatro aplicaciones, a intervalo de 7 días, volumen de aplicación de 350 – 450 L de agua/ha.

AGRICULTURA PROTEGIDA	Fresa (0)	Antracnosis <i>Colletotrichum fragariae</i> Moho gris <i>Botrytis cinerea</i> Cenicilla <i>Sphaerotheca macularis</i>	1.5 – 2.5 kg/ha 2.0 – 2.5 kg/ ha 2.0 – 2.5 kg/ ha	En el caso de Antracnosis y Moho gris realizar cuatro aplicaciones al follaje, volumen de aplicación de 350-450 L de agua/h. En el caso de cenicilla realizar tres aplicaciones al follaje, volumen de aplicación de 550-650 L de agua/ha. Intervalo de 7 días entre cada aplicación.
----------------------------------	--------------	---	---	---

Anexo 2. *Bacillus* como ingrediente activo en formulaciones de uso comercial. Villarreal-Delgado *et al.*, (2018) AgraQuest, 2007; Bayer CropScience, 2016; Galindo-Fentanes *et al.*, 2015; ISAGRO, 2017; EPA, 2014; Novozymes, 2017; EPA, 2013; Valent BioSciences, 2017; EPA, 2007, Schisler *et al.*, 2004.

Nombre del producto	Compañía	Cepa de <i>Bacillus</i> empleada	Propiedades conocidas
Kodiak	Bayer Crop Science (antes Gutafsson LLC)	<i>B. subtilis</i> GB03	Fungicida para el tratamiento biológico de plantas y semillas
Companion	Grow Products Ltd.	<i>B. subtilis</i> GB03	Previene y controla enfermedades en plantas. Produce Iturina. Interrumpe la formación de la pared celular de los patógenos y desencadena la RSI en plantas
Yield Shield	Bayer Crop Science (antes Gustafsson)	<i>B. pumilus</i> GB34 (=INR7)	Control de enfermedades de la raíz causadas por <i>Rhizoctonia</i> y <i>Fusarium</i>
BioYield	Bayer Crop Science (antes Gustafsson)	<i>B. amyloliquefaciens</i> GB99M+ <i>B. subtilis</i> GB122	La combinación de una fuerte actividad RSI (GB99) con fitoestimulación (GB122)
Subtilex®, INTEGRAL®	Becker Underwood, Saskatoon, Canada (adquirido por BASF)	<i>B. subtilis</i> MBI600	Proporciona protección contra los patógenos del suelo como <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. para ayudar a prevenir el marchitamiento fúngico y otras enfermedades de la raíz.
Vault®	Becker Underwood	<i>B. subtilis</i> MBI600	Producido por la tecnología “BioStacked®”. Fomenta el crecimiento de la soya y cacahuates.
SERENADE SOIL®	Bayer Crop Science (antes AgraQuest)	<i>B. subtilis</i> QST713	Biofungicida para cultivos alimentarios.

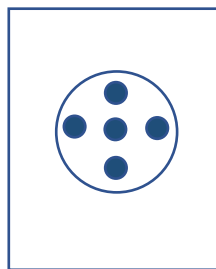
SERENADE Optimun®	Bayer Crop Science (antes AgraQuest)	<i>B. subtilis</i> QST713	Detiene la germinación de esporas, altera la membrana celular y la inhibición de la unión de patógeno a las hojas. Para su uso en verduras frondosas, fresas y patatas. Activos contra hongos (<i>Botrytis</i> y <i>Sclerotinia</i>) y patógenos bacterianos (<i>Xanthomonas</i> y <i>Erwinia</i>)
CEASE®	BioWorks, Inc.	<i>B. subtilis</i> QST713	Recomendado para verduras frondosas, hiervas, especias y plantas ornamentales.
SONATA®	Bayer Crop Science (antes AgraQuest)	<i>B. pumilus</i> QST2808.	Control de oídio.
Ballad Plus	AgraQuest	<i>B. pumilus</i> QST2808 ^q	Control de <i>Erysiphe</i> sp., <i>Puccinia</i> spp., <i>Pyricularia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Tilletia</i> sp., <i>Xanthomonas</i> spp, entre otros, en cultivos de gramíneas, oleaginosas, entre otros.
Serenade ASO	Bayer CropScience	<i>B. subtilis</i> QST713 ^{r, s}	Control de <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Phytophthora</i> sp., entre otros. En cultivos frutales, hortalizas, entre otros.
Fungifree AB®	Agro&biotecnia	<i>B. subtilis</i> 83	Control de <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Leveillula</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros, en cultivos Frutales, y hortalizas.
Taegro 2	ISAGRO	<i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i>	Control de <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros en cultivos de diversas frutas, plantas ornamentales, entre otros.
EcoGuard-GN	Novozymes	<i>B. lincheniformis</i> SB3086 ^{w, x}	Control de <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Sclerotinia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., entre otros. En cultivos de plantas ornamentales, entre otros.
DiPel WG	Valent BioSciences	<i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstakiy</i>	Control de <i>Cydia</i> sp., <i>Otiorychus</i> sp., <i>Spodoptera</i> sp, entre otros, en cultivos frutales, hortalizas, entre otros.

Anexo 3. Características y mecanismos de acción de los lipopéptidos y policétidos de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Ongena *et al.*, 2008; Mongkolthanaruk, W. (2012)).

Familia	Genes	Compuestos	Características	Actividad	Mecanismo
Surfactinas	<i>Srf</i> (<i>srfA-A</i> , <i>srfA-B</i> , <i>srfA-C</i> , <i>srfA-D</i>) <i>ycx</i> , <i>aat</i> , <i>sfp</i>	Surfactina	Heptapéptidos ligados a cadenas de β -hidroxiácidos grasos (C12-C16) saturados, formando anillos de lactona.	Antibacterial, formación de biofilm, Inductores de Resistencia Sistémica	Desestabilización de la membrana celular por formación de micelas
Iturinas	<i>itu</i> (<i>ituD</i> , <i>ituA</i> , <i>ituB</i> , <i>itu-C</i>) <i>Ipa</i> , <i>bmyD</i>	Iturina Bacilomicina (A, C, D, E)	Heptapéptidos ligados a α - β -hidroxiácido graso (C ₁₄ -C ₁₇) saturados	Antifúngica	Formación de poros en la membrana celular
Fengicinas	<i>fen</i> (<i>fenA</i> , <i>fenB</i> , <i>fen-C</i> , <i>fen-D</i> , <i>fen-E</i>)	Fengicina	Lipodecapéptidos con anillo de lactona en la parte peptídica ligados a β -grasos (C ₁₆ -C ₁₉) algunos monoinsaturados	Antifúngica	Formación de poros en la membrana celular
	<i>spa</i>	Subtilina	Péptido pentacíclico con puentes tioéter	Antimicrobial	Lantibiótico
	<i>sbo</i> , <i>alb</i>	Subtilosina A	Péptido cíclico sencillo con puentes tioéter	Antibacterial	Lantibiótico
	<i>tas</i>	Tas A	Proteína	Antibacterial	Formación de biofilm

Policétidos	<i>sun, bdb</i>	Sublacina	Péptido cíclico sencillo con puentes tioéter con S-glicopéptidos	Antimicrobial	Lantibiótico
	<i>mln</i>	Macrolactina		Antibacterial (Gram +)	
	<i>bae, pksX</i>	Bacilaeno	Péptido lineal unido a un hexano	Antibacterial	Inhibidor de biosíntesis de proteínas de procariontas
	<i>dif</i>	Dificidina	Macrolino de 22 miembros y un grupo fosfato	Antibacterial	
	<i>mrs</i>	Mersacidina		Antibacterial (Gram +)	Inhibidor de biosíntesis de proteínas de pared celular

Anexo 4. Procedimiento de perforación del Potato Dextrose Agar (PDA)

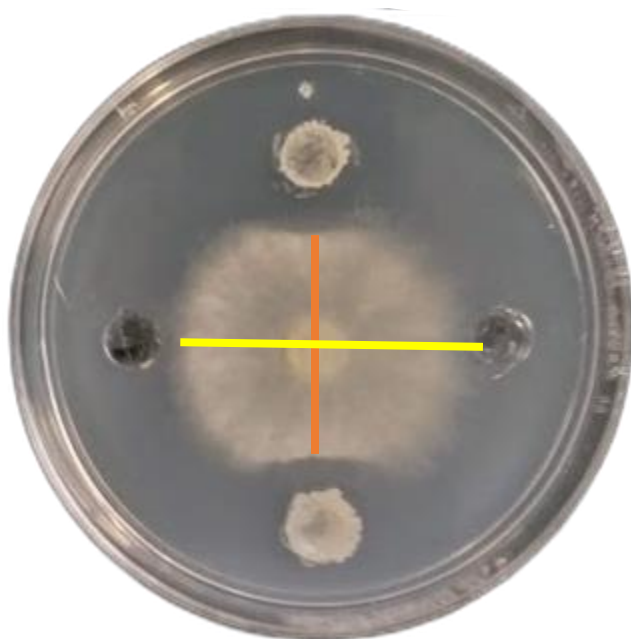


Se creó un molde en Word para realizar las perforaciones en el medio PDA (este fue impreso)



Con una punta azul de 1000 µL se realizaron las perforaciones marcadas en el molde

Anexo 5. Ejemplo de mediciones para ensayos *in vitro* en caja Petri



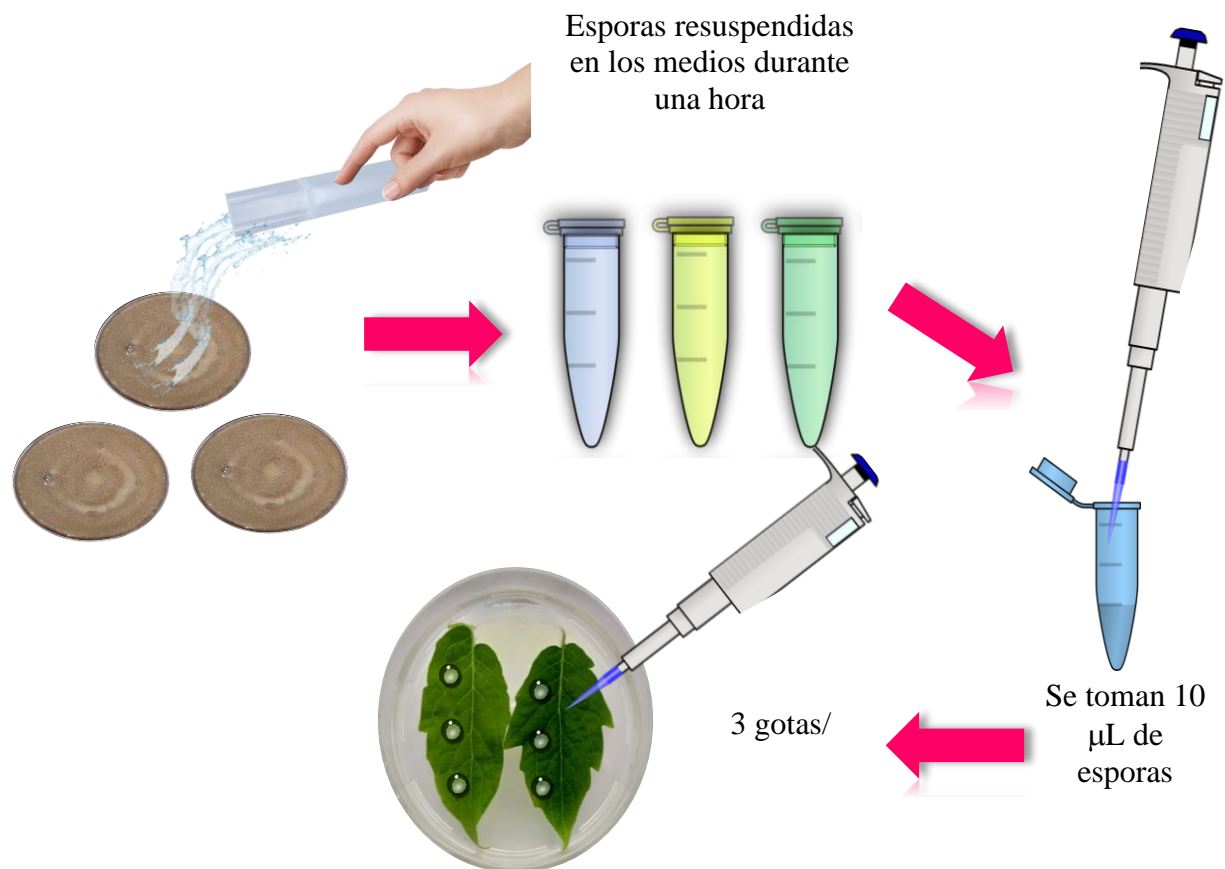
■ *Crecimiento neto del control = diámetro de crecimiento del patógeno con respecto a los controles*

■ *Crecimiento neto del tratamiento = diámetro de crecimiento del patógeno con respecto a los tratamientos*

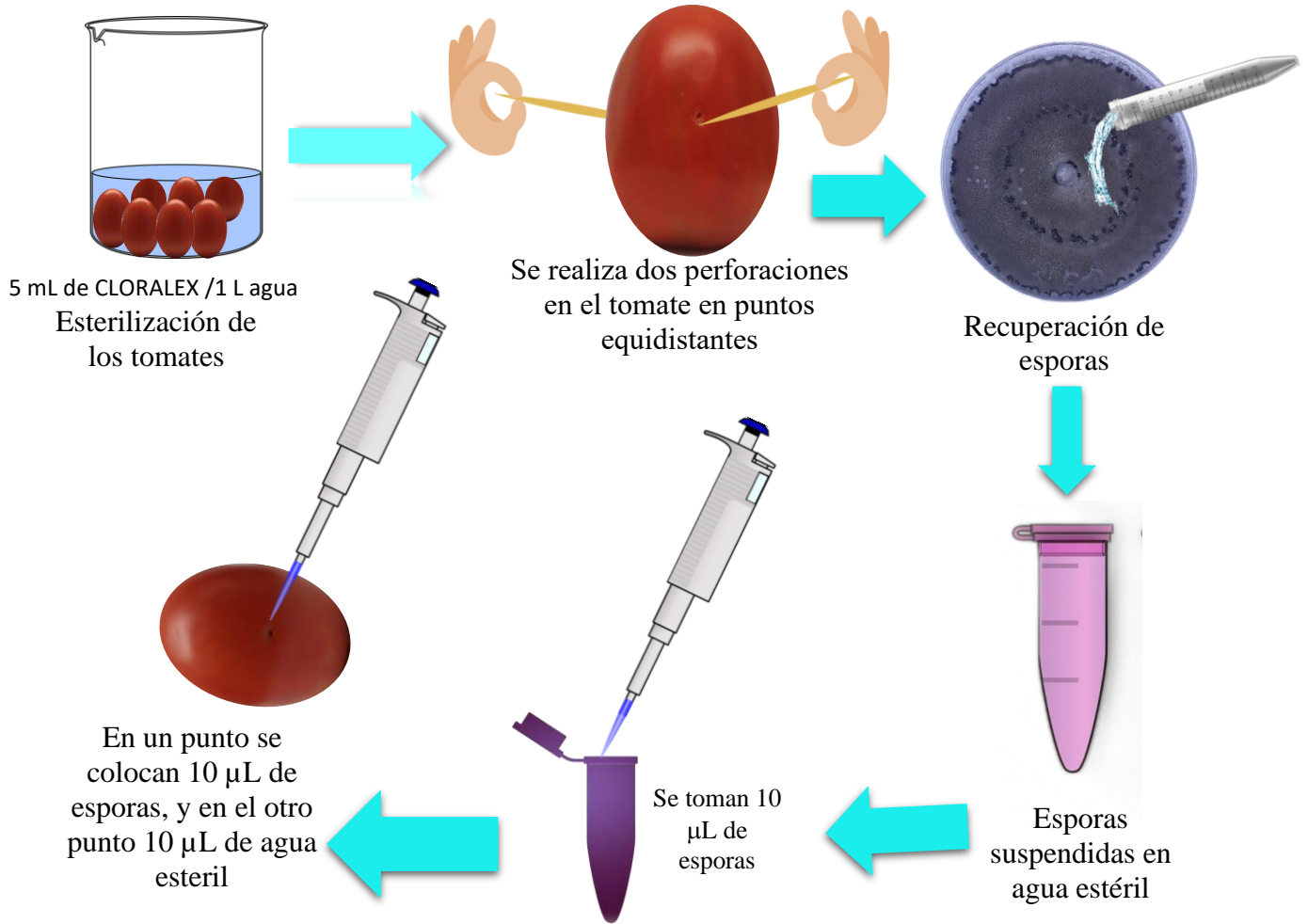
Anexo 6. Componentes de la solución nutritiva de Hoagland

Macronutrientes	g/L
Nitrato de potasio	0.505
Nitrato de calcio	1.15
Fosfato Monobásico	0.68
Sulfato de magnesio	1.23
Quelato de Fe	5.0
Micronutrientes	
Ácido bórico	0.0143
Cloruro de manganeso	0.00905
Sulfato de zinc	0.0011
Sulfato de cobre	0.0004
Ácido molibdico	0.0001

Anexo 7. Procedimiento de infección de hojas con esporas de *B. cinerea* 05 resuspendidas en diferentes medios (LB, PDB y agua).



Anexo 8. Procedimiento de infección de tomates con esporas de *B cinerea* 05

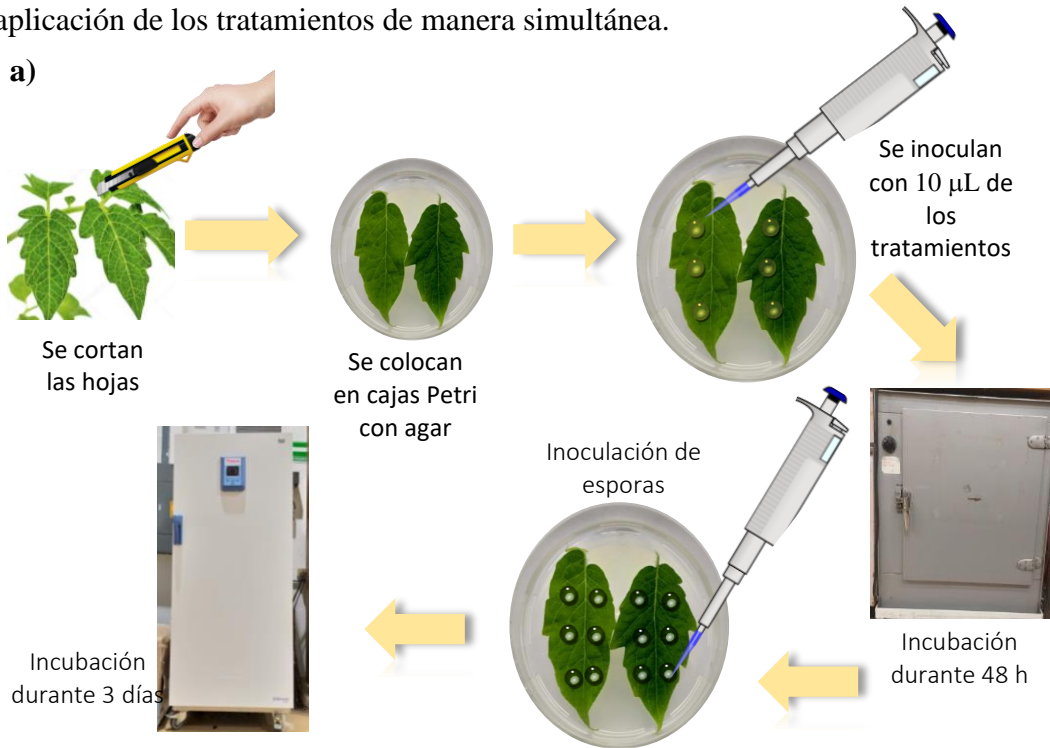


Anexo 9. Ensayos de control biológico: 1) preventivo y 2) simultáneo

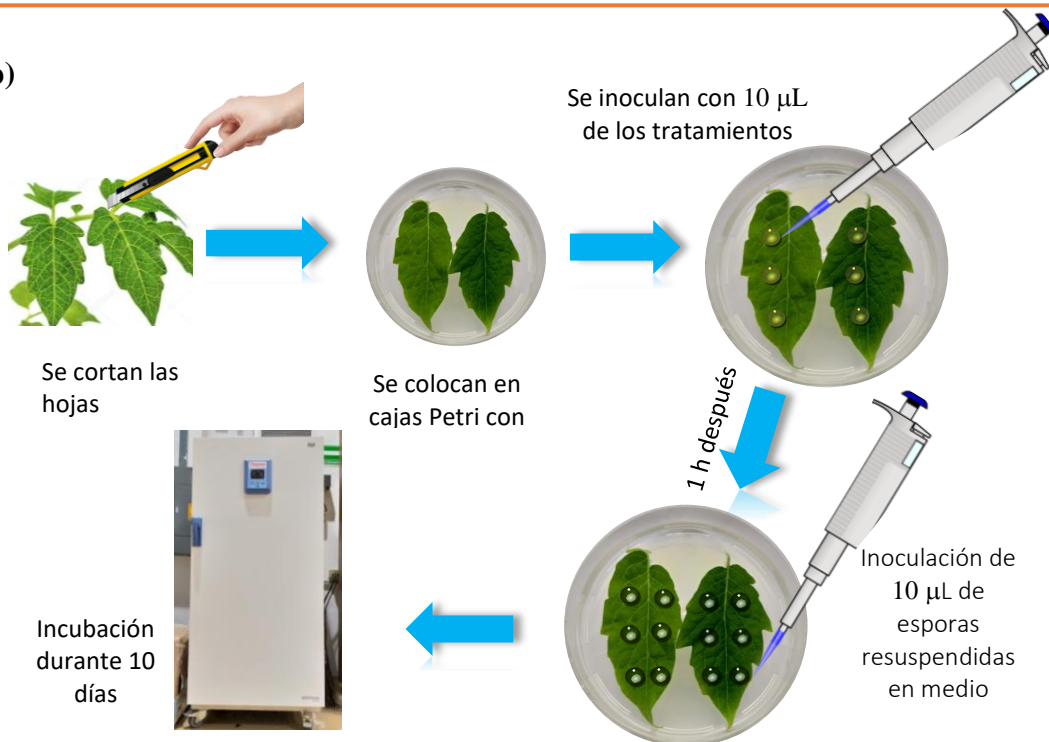
Tratamiento en hojas y frutos	temperatura	ACB	Tiempo de incubación Previo a la aplicación del patógeno	Incubación post-infección del patógeno
Preventivo hojas	25 °C	Aplicado antes que el patógeno	48 h	3 días
Preventivo hojas	29 °C	Aplicado antes que el patógeno	48 h	3 días
Simultáneo hojas	25 °C	Aplicado casi al mismo tiempo que el patógeno	No aplica	3 días
Preventivo Frutos	25 °C	Aplicado antes que el patógeno	12 h	3 días
Preventivo frutos	29 °C	Aplicado antes que el patógeno	12 h	3 días
Simultáneo frutos	25 °C	Aplicado casi al mismo tiempo que el patógeno	No aplica	3 días

Anexo 10. Proceso de infección en hojas con *B. cinerea* 05 y tratamientos de manera simultáneo y preventivo. **10a)** aplicación de tratamientos de manera preventiva. **10b)** aplicación de los tratamientos de manera simultánea.

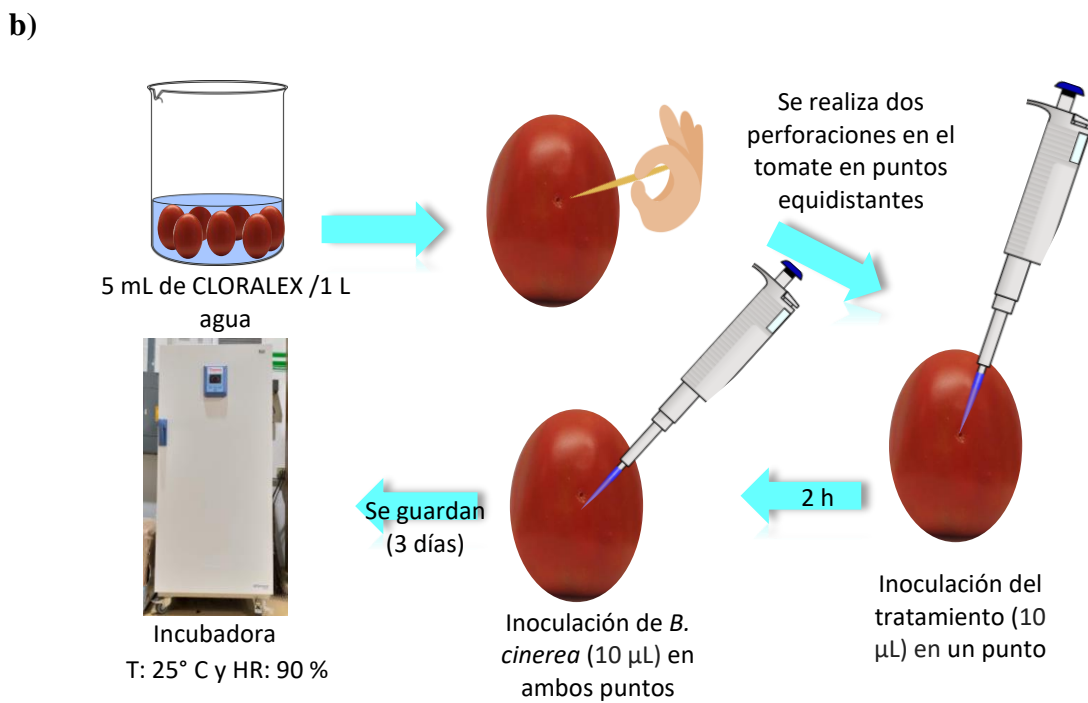
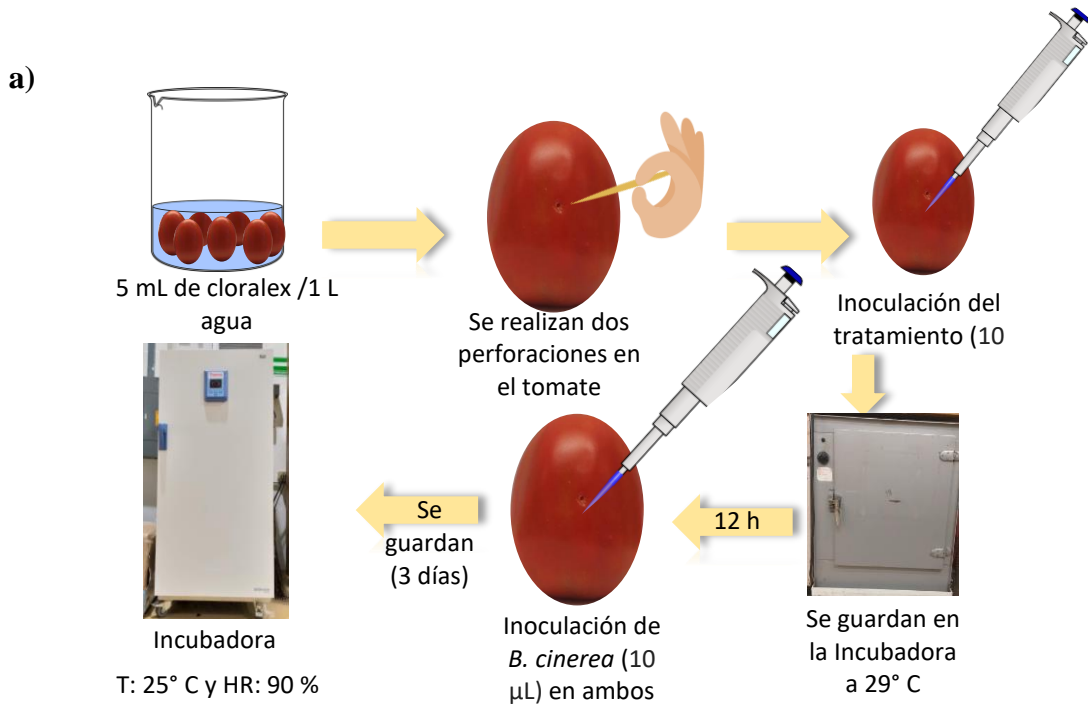
a)

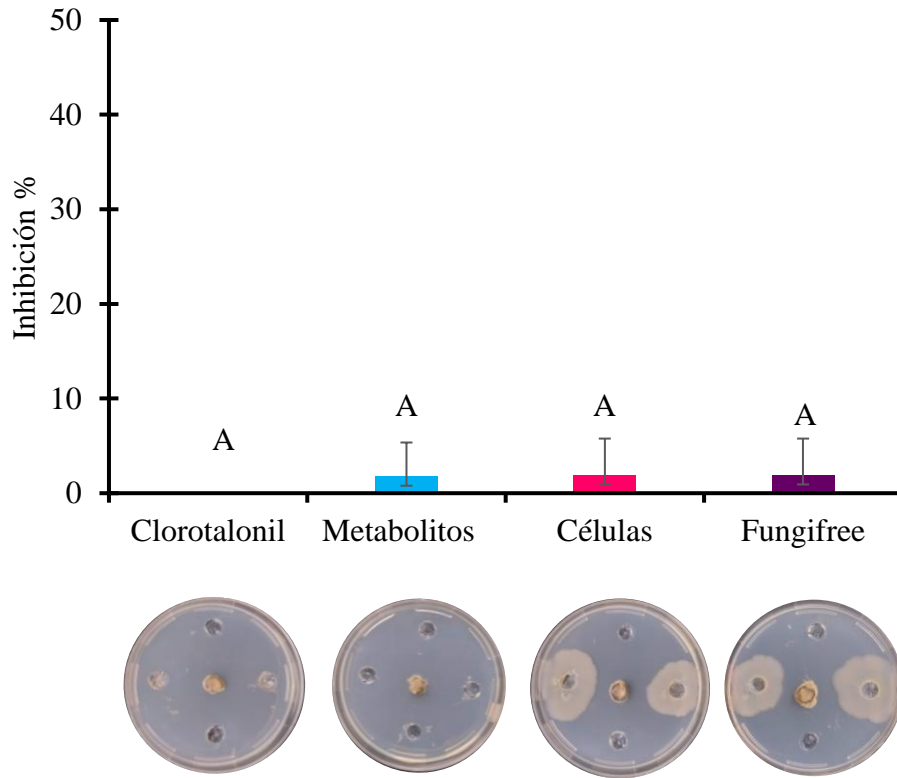


b)

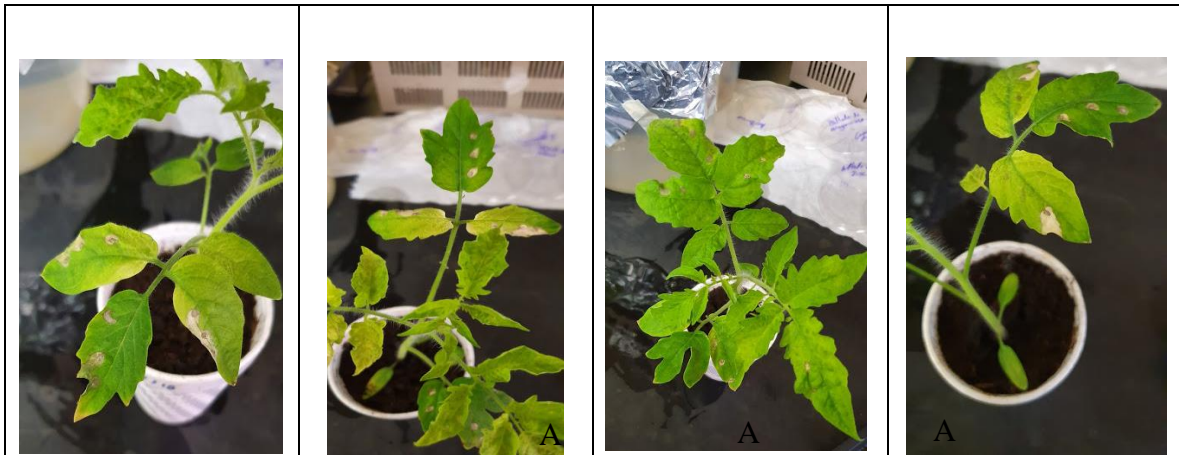


Anexo 11. Proceso de infección de *B. cinerea* 05 en tomates aplicando los tratamientos de manera simultánea y preventiva. **11a)** proceso de infección en tomates de manera preventiva. **11b)** proceso de infección aplicando los tratamientos de manera simultánea.





Anexo 12: Porcentaje de inhibición *in vitro* de los diferentes factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 (células y metabolitos) contra *B. cinerea* 05 en comparación con un fungicida químico (Clorotalonil). Ensayos a 29°C. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANOVA, Tukey (p) <0.05).



Anexo 13. Infección en plantas de tomates. Las plantas fueron infectadas con esporas de *B. cinerea* 05 en una concentración de 10^8 esporas/mL, colocando gotas de 10 μ L en varias partes de las hojas, sin embargo, las condiciones experimentales no permitieron observar un desarrollo de enfermedad en las plantas.

Cuernavaca, Morelos a 15 de mayo de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **CLARA ITZEL GÓMEZ GUERRERO**, con el título del trabajo: **Evaluación de la eficacia biológica de *Bacillus velezensis* 83 contra *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación **por Tesis** como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

SECRETARIO: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

VOCAL: M. EN C. KARINA ALEJANDRA BALDERAS RUIZ

SUPLENTE: DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA

SUPLENTE: DR. ENRIQUE GALINDO FENTANES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2021-08-24 13:14:44 | Firmante

cZGxn8Woqgv1xcVOW2le7RiUzZkjmJc4F7bTnJ4UQEsJlZgldleby3tp9yb9uUFYsQ47cGlx24YbOtl+cSyi41vIkNyB8v0ANqE1oAuOjZCizcj9BK5kaQPHuMVgN5DRb3G8ziwaP2S1PwZCpR8Ctg1vmOhKAd8W7P8jT8zzfYpQ2JHx4b8xRJzm7gsswEmcY7iLtRTNE2JiqFut4Z/G6d0UGvhQ6gbv3Nmdltkyw3+kGIZ2FZhAFaAy/nf5CjCg58HzlakkyhR0WTUUMzjc7FAXP0nqiiik3lseoOumD0gdVB8P1+pCYsaJ1A+7ydkl27dnxOEB7zDEC2VnALAg==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-08-24 13:53:52 | Firmante

ZefWSMlzVatOrphBvgAmnEBqFa74fwFpievRSav0ZHcuoQvU7pBh7cZaZap8AzUtlf3xcwMtqOJh/fVWUO8sQWi6JY/szpTxaPQfwfAxxG/6GUDtJq1iLVwXmWnif1nunJxzyI+QMz1d/s+eEdTRHcU3sveZ8ukNi9438sCsb7bpPJhfwZP5QY0mh/eXq2k+ejQhs1tLAKG6Mia5bOYFE1Y+qjXTFVnKRNGL5OfL/cCluMUjmq8Ebl9MTe7lvU8SwWWz/wg55McKzak3d4XO/GzVaLpBzQCvhtDpiULRqwmGqCHumr8p2tujXL1nT94SI49bTscSzpUx2Dcd523fg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2021-08-25 08:19:55 | Firmante

iQDnmTecGDREvz8SdZkLk7BHHb+AQXV+4pwNoTOYsJ+NZPGCwYcT1X0oLGs/Fh4ndH1xHX9QpTA/Soj5d+K/umxRShmmeIRDWPjfgHE9pj7eG+b1UN5eQ6JWDivPeqKOsvt+n7h0rGnfudNogD0NC7mQnJ3Q57fDkjYPganRJRFINJOfCojstJBzKxaQhVbY2IouiNlsYO1EU73wV5PQt5keDF98N7naNRCS3xVVdO1UiD53n+dTD+nHmu0J5lRzh6AEL2ZcG6O5esKYldzL+x6sSKZpyYaS1/AYL6XG6NBFkkHxG7+2eio8p7xr+GGOqNICHEx3DycCt+GC4YTFQ==

KARINA ALEJANDRA BALDERAS RUÍZ | Fecha:2021-08-25 09:56:15 | Firmante

qOLCHRaiG3JHEGDJ2eibCNMCOu7ABYJfRK/OhxTZT9O/xabsJVqWSGipgZzNYyXavh3hVxON1sSeQ4Sg6u3FLt/1ryvklb8747VS6PeFq0MqSE9KPoPX00PPuGIFoVERT0IUBJl7cBroS+qn6kdk0uOkTjnpMgrKbHjM1NZg1ZJn1WxniQ4blrACXOw2GFZVbJBG2lRND/R5gWXXK3CwcP/zwBSRqaJRMBPxaWDP3fwLUD3QBZSeXRatEaiE7vPy6rceLLZTykH8tJgN/NZC7cAGaHQRptfIGQM+k5ublda2pFSjgHvfGKIUXMIQnpk4QBomimCmtXRlkrG56xSocKQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



riDovW

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RhvA5cZJuvC1XJo5z6xoliegDiLj1PWL>

