



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**



“Caracterización y evaluación de lipopéptidos y compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp. con actividad de biocontrol de hongos que afectan la calidad de frutos en poscosecha”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA:

QFB. Javier Ramírez Martínez

DIRIGIDO POR:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



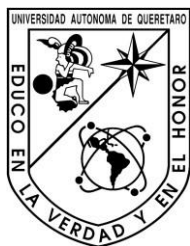
Caracterización y evaluación de lipopéptidos y
compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp. con
actividad de biocontrol de hongos que afectan la
calidad de frutos en poscosecha

por

Javier Ramírez Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309118



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Tesis
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:
QFB. Javier Ramírez Martínez
Dirigido por:
Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Con tema de tesis: **“Caracterización y evaluación de lipopéptidos y compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp. con actividad de biocontrol de hongos que afectan la calidad de frutos en poscosecha”**

Comité:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Director

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Secretario

Firma

Dr. Juan Campos Guillen
Vocal

Firma

Dra. Miriam Desirée Dávila Medina
Suplente

Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2023

Dedicatoria

Dedico este trabajo a toda aquella persona que a lo largo del posgrado se acercó a brindarme su ayuda o pedir la mía, a aquellas personas que me aconsejaron y me cobijaron cuando las cosas se tornaron difíciles, esos mismos con quienes pude disfrutar los momentos en los que relajarse era un lujo. Sin nombres y sin etiquetas dedico mi trabajo de tesis a toda persona que enriqueció mi conocimiento o reconfortó mi alma, a aquellos que en su mayoría ahora puedo llamar colegas, amigos o padres. Quienes sin mayor pago que un abrazo o un gracias no dudaron en brindarme su amor y comprensión.

Agradecimientos

Agradezco a CONAHCYT por brindarme una beca, la cual fue un apoyo indispensable para concluir este estudio de posgrado.

Agradezco a la UAQ por ser brindarme espacio de trabajo en el cual pude aprender tanto como me fue posible.

Agradezco a mis profesores, especialmente al Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, el cual fue en diferentes circunstancias asesor, tutor y colega. Quien me brindo de sus conocimientos científicos, me facilitó la socialización con personas que me apoyaron en el proceso y, además, fue un apoyo moral indiscutiblemente. Indudablemente sin su guía me hubiese sido imposible lograr la publicación científica de mi trabajo, mi ponencia en un congreso nacional o las visitas a empresas del ámbito alimenticio.

Agradezco a la Dra. Sofía María Arvizu Medrano, al Dr. Juan Campos Guillen, la Dra. Miriam Desirée Dávila Medina y al Dr. Aldo Amaro Reyes por su asesoría en los distintos temas de su experiencia haciendo posible este trabajo.

Por último, agradezco a mis amigos y seres queridos, que, a su vez, fueron un pilar importante en esta etapa de mi vida.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



QFB. Javier Ramírez Martínez

RESUMEN

Las enfermedades en frutos causadas por hongos representan una gran pérdida económica. Los fungicidas químicos utilizados para su control ocasionan efectos deletéreos sobre el ambiente además de generar resistencia en los patógenos. Los microorganismos antagonistas a estos patógenos se han propuesto como una solución con menor impacto ambiental, donde el género *Bacillus* ha demostrado una eficiente actividad de biocontrol. Se han reportado mecanismos basados en la producción de enzimas líticas, antibióticos, lipopéptidos y compuestos volátiles, estos dos últimos han cobrado relevancia en los últimos años con miras a la producción industrial de nuevas moléculas de biocontrol. En el presente trabajo se caracterizaron seis cepas de *Bacillus* (Q11, Q19, Q20, Q37, Q38 y Q39) para identificar su potencial antagonico contra hongos causantes de pérdidas poscosecha. Se destaca la capacidad inhibitoria contra *Alternaria alternata* y *Colletotricum gloesporoides* en ensayos duales con las cepas Q39, Q38 y Q20, las cuales inhibieron más del 50% del crecimiento. Ensayos bioquímicos y el análisis de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) muestran a los lipopéptidos como responsables de la actividad antifúngica. Los compuestos volátiles producidos por las cepas bacterianas evaluadas mediante ensayos de placas invertidas mostraron inhibiciones de crecimiento entre el 47-72% de *A. alternata* y *S. rolfsii* volátiles, excepto con Q20. En ensayos *in vivo*, sólo Q11 y Q39 redujeron la incidencia de la podredumbre del fruto de tomate causado por *A. alternata*, hasta en un 46% y el tamaño de lesión más del 50%. La identificación de volátiles por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a masas (SPME-GC-MS) mostró la presencia de 3-metil, 1-butanol, 3-hidroxi, 2-butanona, 2,3-butanediol, ácido 2-metil propanoico, ácido nonanoico como principales compuestos en los diferentes espectros. Por último, se demostró relación filogenética entre las cepas Q11, Q37, Q38 y Q39 con el género *Bacillus*. De esta manera, se pretende proponer cepas bacterianas capaces de actuar como agentes de biocontrol, que puedan ser escaladas a un producto de aplicación en campo. Es el caso de *Bacillus* Q39 ya que fue la única cepa bacteriana con capacidad antagonica en las dos pruebas *in vitro* y la prueba *in vivo*.

Palabras clave: Antagonismo microbiano, control biológico, SPME/GC-MS, biofumigantes, 16S ARNr.

ABSTRACT

Fruit diseases caused by fungi represent a great economic loss. Chemical fungicides used for their control cause deleterious effects on the environment and generate resistance in the pathogens. Microorganisms antagonistic to these pathogens have been proposed as a solution with less environmental impact, where the genus *Bacillus* has demonstrated efficient biocontrol activity. Mechanisms based on the production of lytic enzymes, antibiotics, lipopeptides and volatile compounds have been reported, the latter two have gained relevance in recent years with a view to the industrial production of new biocontrol molecules. In the present work, six *Bacillus* strains (Q11, Q19, Q20, Q37, Q38 and Q39) were characterized to identify their antagonistic potential against fungi causing postharvest losses. The inhibitory capacity against *Alternaria alternata* and *Colletotricum gloeosporoides* in dual trials with strains Q39, Q38 and Q20, which inhibited more than 50% of the growth, is highlighted. Biochemical assays and Fourier Transform Infrared (FT-IR) analysis show lipopeptides as responsible for the antifungal activity. Volatile compounds produced by the bacterial strains evaluated by inverted plate assays showed growth inhibitions between 47-72% of *A. alternata* and *S. rolfsii* volatiles, except with Q20. In *in vivo* assays, only Q11 and Q39 reduced the incidence of tomato fruit rot caused by *A. alternata* by up to 46% and lesion size by more than 50%. Identification of volatiles by solid-phase microextraction and gas chromatography coupled to mass (SPME-GC-MS) showed the presence of 3-methyl, 1-butanol, 3-hydroxy, 2-butanone, 2,3-butanediol, 2-methyl propanoic acid, nonanoic acid as the main compounds in the different spectra. Finally, phylogenetic relationship between strains Q11, Q37, Q38 and Q39 with the genus *Bacillus* was demonstrated. In this way, it is intended to propose bacterial strains capable of acting as biocontrol agents, which can be scaled up to a product for field application. This is the case of *Bacillus* Q39 since it was the only bacterial strain with antagonistic capacity in both *in vitro* and *in vivo* tests.

Keywords: Microbial antagonism, biological control, SPME/GC-MS, biofumigants, 16S rRNA.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	III
Agradecimientos	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 La producción agrícola en México	14
2.2 Pérdidas económicas por problemas fitosanitarios.....	18
2.3 Principales fitopatógenos relacionados con las enfermedades en poscosecha	18
2.3.1 <i>Sclerotium rolfsii</i>	20
2.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.3.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23
2.3.4 <i>Alternaria alternata</i>	25
2.3.5 <i>Phytophthora</i> spp	26
2.3.6 <i>Rhizoctonia solani</i>	28
2.4 Estrategias de control de enfermedades	30
2.4.1 Control químico	31
2.4.2 Control biológico.....	32
2.5 El género <i>Bacillus</i> y su potencial antagónico.....	34
2.5.1 Moléculas involucradas en el control biológico	36
2.5.2 <i>Bacillus subtilis</i> como promotor de crecimiento.....	46
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 General	47
3.2 Específicos.....	47
4. METODOLOGÍA	48
4.1 Material biológico	48
4.2 Caracterización <i>in vitro</i> del potencial antagonista de las cepas de <i>Bacillus</i>	48
4.2.1 Ensayos duales.....	48
4.2.2 Ensayos de confrontación de placas invertidas	49

4.3	Identificación molecular mediante el análisis de subunidad 16S ARNr...	51
4.4	Producción de lipopéptidos como antibióticos.....	52
4.4.1	Detección de capacidad de producción de lipopéptidos.....	52
4.4.2	Extracción de lipopéptidos y análisis por FT-IR	53
4.5	Identificación de volátiles por medio de SPME GC-MS.....	53
4.5.1	Microextracción en fase sólida (SPME).....	53
4.5.2	Análisis de COV bacterianos mediante cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS).....	54
4.6	Determinación de características de madurez comercial en frutos de tomate.....	55
4.6.1	pH del tomate	55
4.6.2	Acidez titulable (AT).....	55
4.6.3	Firmeza.....	55
4.6.4	Color.....	56
4.7	Ensayo de antagonismo <i>in vivo</i> por compuestos volátiles en fruto.....	56
4.8	Análisis estadístico.....	58
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
5.1	Ensayos duales.....	59
5.2	Ensayos de confrontación de placas invertidas.....	61
5.3	Identificación de las cepas de estudio mediante la secuenciación del gen 16S ribosomal	63
5.4	Detección de la producción de lipopéptidos	64
5.5	Extracción de lipopéptidos y análisis por FT-IR.....	65
5.6	Identificación del perfil de volátiles producidos por las cepas de <i>Bacillus subtilis</i> por medio de SPME GC-MS	66
5.7	Ensayo de antagonismo <i>in vivo</i> por compuestos volátiles en fruto.....	72
6	CONCLUSIONES	77
7	BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	No.
1. Producción de cultivos anuales 2018-2019.	15
2. Producción de cultivos perenne 2018-2019.	16
3. Síntomas de la pudrición del tallo del ajo (<i>Allium sativum</i>) causados por <i>S. rolfsii</i>	21
4. Síntomas de marchitamiento causados por <i>Fusarium oxysporum</i>	23
5. Lesiones de antracnosis por <i>C. gloesporoides</i> en mango cv Ataulfo (<i>Mangífera indica</i>).....	24
6. Podredumbre de tomate causada por <i>A. alternata</i>	26
7. Sintomatología asociada a la infección por <i>P. capsici</i>	28
8. Damping-off provocado por <i>R. solani</i> en tomate	29
9. Mecanismos de control biológico del género <i>Bacillus</i>	37
10. Estructura química de lipopéptidos sintetizados por <i>B. subtilis</i>	36
11. Estructura de sideróforos producidos por <i>Bacillus</i> sp	39
12. Estructuras de bacteriocinas producidas por <i>Bacillus</i>	41
13. Técnica de confrontación dual en placa	49
14. Esquema de ensayos de confrontación para evaluación de antagonismo por volátiles.	50
15. Condiciones para la amplificación genómica de 16S ARNr mediante PCR	52
16. Ensayo de antagonismo por compuestos volátiles en fruto	57
17. Ensayos duales de <i>Bacillus subtilis</i> contra <i>F. oxysporum</i> (A), <i>A. alternata</i> (B), <i>C. gloesporoides</i> (C), <i>R. solani</i> (D), <i>Phytophthora</i> spp. (E). y <i>S. rolfsii</i> (F).....	60
18. Ensayos de volátiles de <i>Bacillus subtilis</i> contra <i>F. oxysporum</i> (A), <i>A. alternata</i> (B), <i>C. gloesporoides</i> (C), <i>R. solani</i> (D), <i>Phytophthora</i> spp. (E). y <i>S. rolfsii</i> (F).....	62

19. Árbol filogenético mediante el método neighbor-joining basado en las secuencias correspondientes al gen de 16s ribosomal.....	64
20. Hemólisis en placas de agar sangre causado por las cepas Q39, Q38, Q37, Q20, Q19 y Q11 después de 48 horas de incubación a 37°C	65
21. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de del extracto metanolico la fracción lipopeptídica de las cepas <i>Bacillus</i> Q11, Q37, Q38 y Q39	66
22. Contenido relativo de especies químicas presentes en el perfil volátil de las cepas Q11, Q37 y Q38.....	69
23. Cromatogramas de COVs producidos por las cepas de <i>B. subtilis</i> Q11, Q37, Q38 y Q39 después de 24 horas de fermentación en CST. Los principales COVs se señalaron como (1) 3-metil, 1-butanol, (2) 3-hidroxi, 2-butanona, (3) 2,3-butanediol, (4) ácido 2-metil propanoico, (5) ácido nonanoico.....	70
24. Primer ensayo <i>in vivo</i> para la evaluación de COVs de diferentes cepas de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>A. alternata</i> inoculada en tomate	73
25. Segundo ensayo <i>in vivo</i> para la evaluación de COVs de diferentes cepas de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>A. alternata</i> inoculada en tomate	74
26. Tercer ensayo <i>in vivo</i> para la evaluación de COVs de las cepas Q11 y Q39 de <i>B. subtilis</i> contra <i>A. alternata</i>	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	No.
1. Superficie cosechada, volumen de producción y rendimiento de cultivos en México durante los últimos 35 años.....	17
2. Agentes de control químico con capacidad de inhibición micelial.....	32
3. Moléculas microbianas implicadas en la inhibición de fitopatógenos.....	33
4. COV producidos por <i>Bacillus subtilis</i> y su mecanismo de acción.....	44
5. Composición de la mezcla de reacción para PCR por muestra.....	51
6. Porcentajes de inhibición de micelio activo en ensayos duales.....	60
7. Porcentajes de inhibición del micelio activo en ensayos de volátiles de confrontación de placas invertidas	62
8. Contenido relativo de compuestos presentes en el perfil volátil de las diferentes cepas (Q11, Q37 y Q38) de <i>B. subtilis</i> a 24h en caldo soya tripticaseína.....	67
9. Valores correspondientes a las características de tomates en etapa de madurez comercial.....	73
10. Ensayo de antagonismo de <i>A. alternata</i> por compuestos volátiles en frutos de tomate	75

1. INTRODUCCIÓN

La producción agrícola en México ha ido en aumento desde los años 80 hasta la actualidad (Baldivia & Ibarra, 2017; SIAP, 2021). Sin embargo, el problema de los fitopatógenos siempre ha estado presente, de hecho, entre el 20 y 30% del producto anual proveniente de la agricultura es afectado por plagas y/o enfermedades, donde se ven involucrados hongos, bacterias, nemátodos, además de virus e insectos (Villarreal *et al.*, 2018). En la mayoría de los casos las enfermedades poscosecha constituyen el factor limitante en el almacenamiento de frutas y vegetales (Youssef *et al.*, 2022).

Las especies bacterianas y fúngicas son las responsables mayoritarias de las pérdidas de frutas y verduras en el periodo de poscosecha, debido a que el crecimiento del fitopatógeno en el fruto provoca podredumbre así como micotoxinas (Yahaya & Mardiyya, 2019).

El control de fitopatógenos convencionalmente se realiza usando fungicidas de amplio espectro, con el fin de erradicar un gran número de especies patógenas. En consecuencia, el uso indiscriminado de estos compuestos ha estado afectado negativamente los suelos, ecosistemas y la salud humana (Sułowicz & Piotrowska, 2016). Por lo que el uso de organismos vivos, o en su defecto, metabolitos para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas se ha ido implementando desde el siglo pasado con grandes resultados (Köhl *et al.*, 2019). Recientemente una abundante diversidad de microorganismos que forman parte de la rizósfera ha sido estudiada, tanto su efecto en el control de organismos fitopatógenos como su efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Bacillus es un género bacteriano que ha demostrado una gran capacidad antagónica de fitopatógenos y de promoción de crecimiento de plantas, dentro de las especies del género *Bacillus* con mayor relevancia en la agricultura se encuentran, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. pumilis*. Cabe resaltar que son consideradas no patógenas, de hecho, se ha documentado que especies como *B. subtilis* exhiben capacidad de producir compuestos antimicrobianos dentro de

los que destacan enzimas, antibióticos y lipopéptidos (Villarreal *et al.*, 2018). Además, se ha documentado la capacidad de promoción de crecimiento de plantas inducido por volátiles sintetizados por algunas especies del género *Bacillus* (Fincheira *et al.*, 2016) como *B. amyloliquefaciens* (Asari *et al.*, 2016; Poveda, 2021), *B. subtilis* (Poveda, 2021; M. Ryu *et al.*, 2003) y *B. mojavensis* (Poveda, 2021; Rath *et al.*, 2018).

Así mismo, se ha observado una capacidad inhibitoria micelial y de producción de esporas de hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp. por efecto de compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por *Bacillus* spp. (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2023a). De esta manera, Wang *et al.*, 2022, Caulier *et al.*, 2019 y Gao *et al.*, 2018 reportaron comportamientos de antagonismo de COV sintetizados por especies del género *Bacillus* sobre especies de fitopatógenos comunes pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Verticillium* y *Colletotricum*.

Además, se debe tener en cuenta de la gran diversidad metabólica existente entre cepas de una misma especie, de este modo la búsqueda de cepas con el fin de identificar nuevas moléculas capaces de antagonizar el crecimiento de fitopatógenos fúngicos que actualmente solo se controlan por métodos sintéticos se vuelve cada vez más relevante.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar e identificar la capacidad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de compuestos volátiles y lipopéptidos sintetizados por las cepas de Q11, Q19, Q20, Q37, Q38 y Q39 contra *A. alternata*, *C. gloesporoides*, *F. oxysporum*, *Phytophthora* spp., *S. rolfsii* y *R. solani*.

2. ANTECEDENTES

2.1 La producción agrícola en México

En los últimos 40 años la población mexicana ha reflejado un importante crecimiento, siendo que en 1980 la población oscilaba en 66.8 millones de habitantes, cifra que ascendió a 128.9 millones en 2020 según reportes del INEGI (INEGI, 2021). Sin embargo, respecto a la superficie agrícola se observó un crecimiento del 22% en el lapso de 1980-2015, donde las 17.99 millones de hectáreas sembradas en 1980 incrementaron hasta convertirse en 18.1 millones hectáreas en 2021 (Tabla 1) (Statista, 2022). Por otra parte, de 2019 a 2020 se reportó un aumento del 0.4% en el volumen de la producción agrícola nacional, mientras que en ese mismo año se proyectó un aumento del 0.8% en el volumen de producción agrícola nacional para el año 2021 (SIAP, 2021).

Otro dato relevante es la existencia de 13 Tratados de Libre Comercio (TLC) con 50 países (Estados Unidos, Canadá, China, Japón, Corea del Sur, Alemania, Malaysia, Italia, Taiwán y España, entre otros), que se traduce en un mercado de 1,500 millones de personas. De esta manera la incentiva en la búsqueda de nuevas oportunidades y mejores condiciones para la venta de productos agrícolas, pecuarios y pesqueros de México en países extranjeros se vuelve un tema relevante. México representa un importante exportador de productos agroalimentarios; la variedad y calidad de estos productos son características que han convertido a México en potencia en cuanto a exportación se refiere. De hecho, en 2018 el comercio de productos agroalimentarios significó \$64,500 millones de dólares, en consecuencia, México pasó a ser parte del ranking de las 10 mayores economías exportadoras agroalimentarias, según a datos de la Organización Mundial del Comercio (OMC).

México a diferencia de otros países cuenta con una gran diversidad de condiciones edafoclimáticas a lo largo del país, característica que le permiten cultivar alrededor de 264 especies vegetales diferentes (SIAP, 2016). Como resultado de esto, la alimentación del pueblo mexicano se encuentra sostenida por productos de origen vegetal, donde los pilares de la dieta son el maíz, tomate, frijol y chile (Román *et al.*, 2013).

Debido a las tendencias de consumo propias del país, algunos alimentos provenientes de la industria agroalimentaria predominan en cuanto a su producción, tomando en cuenta también la demanda extranjera (Figura 1 y 2). Según el Servicio de información de Agroalimentación y Pesca (SIAP, 2016), los principales productos que exportó México durante 2018 fueron: cerveza, aguacate, frutos rojos, tomate, tequila, pimiento, carne de res, nueces, confitería, brócoli, col, coliflor, azúcar, galletas dulces, chocolate, limón, pepino, zumo de naranja, cebolla, mango, espárrago, café verde y camarón.

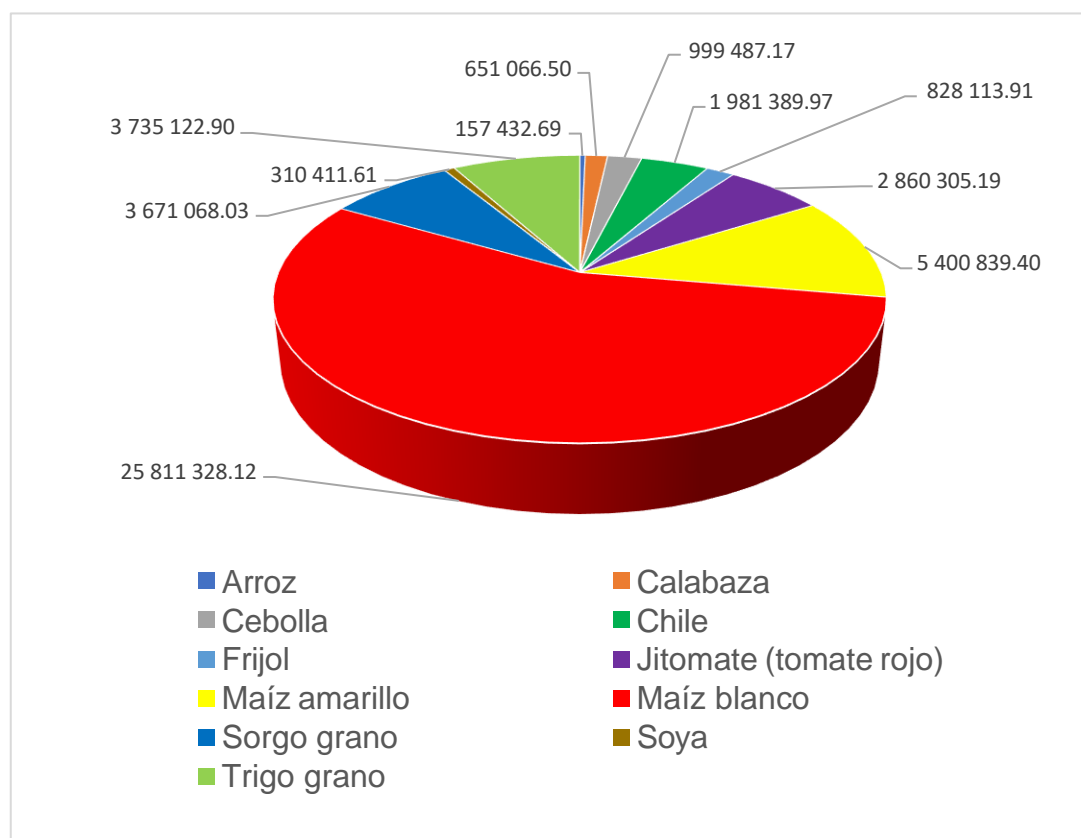


Figura 1. Producción en toneladas de cultivos anuales 2018-2019 (INEGI, 2019).

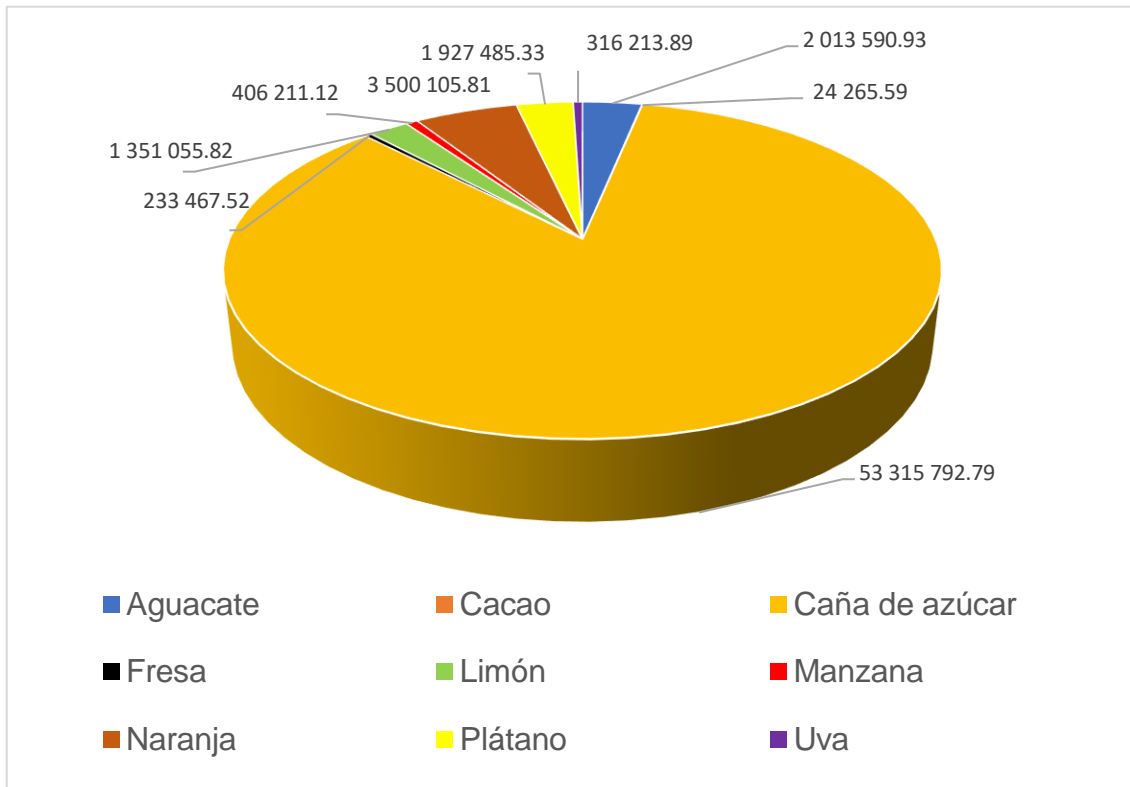


Figura 2. Producción en toneladas de cultivos perenne 2018-2019 (INEGI, 2019).

En la actualidad las nuevas demandas por parte de los consumidores exigen mayor calidad y garantía de inocuidad de los alimentos, por este motivo ha aumentado la relevancia de satisfacer las nuevas normativas (Haghiri, 2016). Además, el dinamismo del comercio agropecuario ha aumentado el enfoque en las medidas sanitarias y fitosanitarias, constituyendo barreras para la integración de los mercados. Desde esta perspectiva, nacen nuevos desafíos referentes a la mejora de trazabilidad y de buenas prácticas agrícolas que garanticen calidad del producto, la implementación de técnicas y/o estrategias que promuevan un mejor rendimiento de las hectáreas ya sembradas con las que cuenta el país (SADER, 2022).

Tabla 1. Volumen de producción, superficie cosechada y rendimiento de cultivos en México durante los últimos 35 años

Grupo	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	Incremento (%)
<i>Producción Millones ton/año</i>									
Cereales	15.713	20.282	19.087	22.225	21.438	22.77	34.25	27.34	74.04
Leguminosas	1.129	1.129	1.49	1.417	1.152	0.992	1.313	1.49	32
Oleaginosas	3.261	2.662	1.675	1.308	0.841	1.032	1.085	2.61	-19.9
Hortalizas	4.72	5.529	7.376	7.96	10.681	12.371	12.802	15.565	229.8
Frutales	8.633	10.8	10.427	12.764	15.314	15.308	17.584	18.743	117.1
Forrajes	32.486	37.639	42.934	49.621	71.228	98.941	103.3	70.47	117
Industriales	37.002	36.785	43.337	47.483	45.902	55.391	53.977	63.53	71.7
Especias	0.012	0.014	0.021	0.014	0.022	0.016	0.026	0.053	337.1
Total	102.96	114.84	126.35	142.79	166.58	206.83	224.34	199.82	94.1
<i>Área sembrada (millones ha/año)</i>									
Cereales	7.689	9.129	8.456	9.049	7.948	7.375	7.936	7.877	2.5
Leguminosas	1.699	1.95	2.249	2.154	1.674	1.389	1.746	1.825	8
Oleaginosas	1.471	1.559	1.098	0.87	0.645	0.609	0.702	0.981	-33.3
Hortalizas	0.387	0.426	0.516	0.498	0.623	0.659	0.604	0.667	72.3
Frutales	0.777	1.009	0.878	1.077	1.225	1.112	1.385	1.286	65.5
Forrajes	2.42	2.908	3.147	3.377	4.807	5.348	4.156	1.966	64.57
Industriales	1.54	1.445	1.53	1.662	1.731	1.8	1.778	1.955	26.9
Especias	0.016	0.019	0.023	0.023	0.031	0.024	0.031	0.026	61.1
Total	16.76	19.135	18.774	19.786	19.907	19.429	20.12	18.598	16.9
<i>Rendimiento (ton/ha)</i>									
Cereales	2.05	2.22	2.26	2.46	2.7	3.09	3.53	3.5	70.7
Leguminosas	0.67	0.58	0.66	0.66	0.69	0.71	0.75	0.82	22.4
Oleaginosas	2.22	1.88	1.53	1.5	1.3	1.69	1.54	2.66	19.8
Hortalizas	12.2	12.96	14.29	15.99	17.15	18.76	21.2	23.35	91.4
Frutales	11.11	10.7	11.87	11.85	12.51	13.76	12.7	14.58	31.2
Forrajes	13.43	12.94	13.64	14.69	14.82	18.5	24.86	17.7	31.8
Industriales	24.02	25.45	28.33	28.56	26.52	30.77	30.36	32.2	34.1
Esp. y Med.	0.75	0.73	0.95	0.62	0.72	0.66	0.85	2.03	170.7
Promedio	6.44	6.34	7.06	7.63	8.92	11.29	11.16	10.7	66.1

Fuente: (Baldivia & Ibarra, 2017)

2.2 Pérdidas económicas por problemas fitosanitarios

Si bien, la agricultura ha sido siempre una actividad determinante en el desarrollo económico, social y ambiental en todo el mundo, pues aporta aproximadamente el 80% de los alimentos que se consumen diariamente, no se encuentra exenta de problemas sanitarios. Anualmente, entre el 20 y 30% del producto proveniente de la agricultura es afectado por plagas y enfermedades donde se ven involucrados microorganismos como hongos, bacterias, nematodos, además de virus e insectos (Villarreal *et al.*, 2018).

En la mayoría de los casos las enfermedades poscosecha constituyen el factor limitante en el almacenamiento de frutas y vegetales, aunque los problemas relacionados a microorganismos son diferentes en cada región, tanto por el manejo, como por las condiciones ambientales y variedades de fruto (Azad *et al.*, 2019). En general, las frutas y verduras representan una gran fuente de macronutrientes y humedad, condiciones óptimas para el crecimiento de hongos, bacterias, levaduras y mohos. En su mayoría, las especies bacterianas y fúngicas son las responsables de las pérdidas de frutas y verduras en el periodo de poscosecha, debido a que a medida que crecen se esparcen por el fruto provocando podredumbre y producción de micotoxinas por parte de especies fúngicas (Yahaya & Mardiyya, 2019).

La aparición de nuevas variantes de patógenos, así como su expansión geográfica, puede causar una interrupción significativa en la producción de alimentos y suponer una carga para la economía mundial. Las pérdidas globales de rendimiento de importantes cultivos básicos a causa de patógenos y plagas pueden variar de aproximadamente el 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. Dichas pérdidas se reflejan en costos estimados para la economía mundial debido a la pérdida de producción de alimentos en cientos de miles de millones de dólares (Savary *et al.*, 2019).

2.3 Principales fitopatógenos relacionados con las enfermedades en poscosecha

Las enfermedades de las plantas causadas por microorganismos influyen en la disponibilidad y seguridad de las plantas para el consumo humano y animal,

reducen el rendimiento de los cultivos y afectan negativamente a la calidad del alimento (Strange & Scott, 2005).

En el caso de los hongos las especies más frecuentemente reportadas como patógenos de frutas y verduras son *Botrytis cinerea*, varias especies de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizopus* spp., *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis fimbriata*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y algunos mohos. Algunos de estos organismos tienen hospederos específicos, mientras que otros como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phytophthora* y *Rhizopus* spp., afectan a una amplia variedad de vegetales causando pérdidas importantes. En su mayoría, estos agentes ingresan al tejido vegetal mediante lesiones mecánicas, o después de que otros organismos rompen la capa superficial del fruto. En cuanto al deterioro de granos se ha observado mayormente causado por hongos filamentosos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* (Bist & Bist, 2020). Es imprescindible mencionar que el daño microbiano en granos provoca una reducción del valor nutritivo, mal olor, coloración anormal, deterioro de las propiedades de molienda y horneado (Schmidt *et al.*, 2018).

Al igual que en granos, las afecciones por microorganismos patógenos en cítricos producen una depreciación del producto, que en muchos casos se destina a desecho, especialmente cuando el patógeno se desarrolla y los signos y síntomas se hacen evidentes. Centrándonos en poscosecha, la amplia gama de microorganismos que ataca a cítricos engloba: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora citrophthora*, *Trichoderma viride*, *Trichotecium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotinium*, *Diplodia mutila* y *Phomopsis citri* (Li *et al.*, 2015; Arrebola *et al.*, 2010; W. Wang *et al.*, 2021).

El grado en que los hongos afectan el producto poscosecha se encuentra en su mayoría determinado por una serie de factores:

- Ambientales (humedad relativa y temperatura)
- Tejido vegetal (estado fenológico y/o presencia de daños en el tejido)
- Hongo (capacidad infectiva-intrínsecas y cantidad)
- Factor humano (manipulación en etapa de recolección, método de conservación, presencia de inóculo en almacén debido a cosechas anteriores, heridas provocadas en procesos de manipulación) (Fones *et al.*, 2020)

2.3.1 *Sclerotium rolfsii*

Sclerotium rolfsii, es un fitopatógeno que se transmite por el suelo y es comúnmente asociado a regiones cálidas. Su relevancia radica en el gran número de especies que es capaz de infectar, causando la pudrición de la raíz, tallo y semilla (Figura 3), además la sintomatología llamada tizón del sur y marchitez en 500 especies de plantas, entre los cuales se incluyen la gran mayoría de cultivos agrícolas y hortícolas, lo que resulta en pérdidas significativas de rendimiento (Rabinal & Bhat, 2020; Kwon, 2010).

Aunque los síntomas varían según el huésped afectado, la infección generalmente se limita a las partes de la planta en contacto con el suelo. Los primeros síntomas consisten en lesiones acuosas en la corona y en la parte inferior del tallo, por otro lado, la enfermedad generalmente se reconoce por el amarillamiento y marchitamiento del follaje, seguido de un colapso total de la planta (González, 2013). En tomates y pimientos, es posible observar lesiones oscuras empapadas de agua en la parte inferior del tallo en o cerca de la superficie del suelo y se desarrollan rápidamente para rodear completamente el tallo. La infección del melón y la sandía normalmente se limita a la fruta que está en contacto con el suelo y los estolones. En sandía, uno o más estolones pueden verse afectados y mostrar clorosis, sin embargo, los melones generalmente se ven afectados primero (González, 2013; Shirsole *et al.*, 2019).



Figura 3. Síntomas de la pudrición del tallo del ajo (*Allium sativum*) causados por *S. rolfsii*. A) Los síntomas en tallos y bulbos; B) capa de micelio y esclerocios formados sobre restos de plantas infectadas; C) cultivo cebo para aislamiento de *S. rolfsii*; D) micelio y esclerocios cultivados en PDA; E) morfología de *S. rolfsii* (Kwon, 2010).

Las frutas y otros órganos carnosos cerca de la superficie del suelo como tomates pueden infectarse con *S. rolfsii* desarrollando lesiones blandas, acuosas, hundidas, ligeramente amarillentas. Estas lesiones se propagan rápidamente por la mayor parte o la totalidad de la fruta, que eventualmente se ablandará y colapsará dentro de los 3 a 4 días posteriores a la infección. La piel de la fruta a menudo se agrieta, tanto el micelio blanco fino y esclerocios en desarrollo se extienden sobre la superficie y llenan rápidamente las cavidades de las lesiones (González, 2013;Kwon, 2010).

Otro ejemplo es el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), donde se ha descrito que su infección se efectúa por semilla. Dentro de la sintomatología, se encuentra la aparición de damping-off y podredumbre de cuello en plántulas. En plantas maduras, es común ver clorosis y marchitez acompañados de pudriciones húmedas en el cuello y tallo, sin mencionar que en algunas ocasiones llegan a cubrirse de un moho blanco, el cual es el micelio activo del hongo (González, 2013). Del mismo modo, existe reportes donde se ha encontrado *S. rolsffi* en maíz (*Zea mays*), avena (*Avena sativa*), manzana (*Malus sylvestris*), lentejas

(*Lens culinaris*) y semillas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) (Yaqub & Shahzad, 2005).

1.3.2 *Fusarium oxysporum*

La marchitez causada por el hongo del suelo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una de las enfermedades más devastadoras del tomate. Afecta tanto a tomates cultivados en invernadero, como los cultivados en campo, principalmente en áreas cálidas de producción de hortalizas. En plantas enfermas es común la aparición de hojas amarillentas y plantas marchitas con un rendimiento de cultivo mínimo o nulo (Nirmaladevi *et al.*, 2016). El patógeno invade la epidermis de la raíz y se extiende al tejido vascular colonizando los vasos de la xilema, a la par que se extiende el micelio y conidios. Los síntomas característicos del marchitamiento aparecen como resultado de un estrés hídrico severo, principalmente debido a la obstrucción de los vasos capilares (Nirmaladevi *et al.*, 2016). Si bien, la infección principalmente afecta a la planta, el tratamiento de semillas de tomate puede reducir la infestación de patógenos y proteger las semillas durante la germinación, emergencia y desarrollo inicial de las plántulas (Gonçalves *et al.*, 2021; Menzies *et al.*, 1994).

En los últimos años, la pudrición por *Fusarium* se ha convertido en un grave problema en la producción de cebolla, afectando negativamente la cosecha en los campos y el almacenamiento. La podredumbre comienza desde las raíces y se extiende rápidamente a todo el bulbo (Figura 4) (Beyene *et al.*, 2015; Haapalainen *et al.*, 2016). Asimismo, se ha reportado su capacidad de infectar tanto planta como semilla y fruto de la calabaza, causando podredumbre y halos blanquecinos sobre la fruta. Cuando una semilla infestada por *Fusarium* es sembrada, su crecimiento se ve mermado afectando a la plántula en sus primeras fases de germinación y desarrollo, donde se es visible una marchitez del tallo y hoja (Wyenandt *et al.*, 2010).



Figura 4. Síntomas de marchitamiento en plantas de garbanzo causados por *Fusarium oxysporum* (Beyene *et al.*, 2015).

En el caso del marchitamiento por *Fusarium*, las semillas de frijol común (Ishizuka *et al.*, 2020), sandía (Petkar & Ji, 2017) y lechuga (Garibaldi *et al.*, 2004) son una fuente importante de inóculo y pueden transportar el patógeno de manera externa. La espora del patógeno se puede adherir al tegumento o bien, internamente, como un micelio latente (Ishizuka *et al.*, 2020), por lo que se recomienda cuidar la sanidad desde la semilla, mediante la adquisición de semilla certificada.

2.3.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides ha sido reportado como uno de los patógenos más importantes a nivel mundial que infecta al menos a 1,000 especies de plantas (Choub *et al.*, 2022). La pudrición de la fruta (antracnosis) a menudo se atribuye a *C. gloeosporioides* (Figura 5) y, en menor medida, a *C. acutatum*.

C. gloeosporioides es un patógeno de poscosecha, un ejemplo claro es el del aguacate, en cuyo caso infecta principalmente frutos pequeños en las primeras fases de crecimiento (Jenny *et al.*, 2019). El hongo produce un apresorio que mediante la degradación de la cutícula logra penetrar el fruto, e inocular una hifa subcuticular latente que permanece sin desarrollo hasta la maduración del fruto. De esta manera, los cambios fisiológicos en el fruto permiten que el patógeno quiescente se active (Freeman *et al.*, 1995; Beno &

Prusky, 2000). La antracnosis ocasiona pérdidas sustanciales por podredumbre de frutos posterior a la cosecha, específicamente durante el almacenaje y comercialización, cuando el fruto termina su maduración (Kong *et al.*, 2020). Visualmente es posible distinguir presencia de manchas circulares café oscuras en el pericarpio y pudrición de la pulpa o mesocarpio, acompañado de daños por ablandamiento (Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000).

De manera análoga, la antracnosis en el mango (*Mangifera indica* L.), originada por *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. (Figura 5), provoca problemas en las hojas, inflorescencias y frutos en las áreas donde se cultiva esta fruta. Sin embargo, los efectos más significativos se observan durante la etapa de poscosecha. (Kong *et al.*, 2020; Huerta *et al.*, 2009).



Figura 5. Lesiones de antracnosis por *C. gloeosporioides* en mango cv Ataulfo (*Mangifera indica*). A) Hojas maduras, B) inflorescencias, C) sépalos, D) pétalos, E) escurrimiento en fruto joven y, F) roña inducida por antracnosis en frutos pequeños (Huerta *et al.*, 2009).

También, se han reportado infecciones de *C. gloeosporioides* en:

- Aguacate (*Persea americana*) (Sharma *et al.*, 2017)

- Chile (*Capsicum annum*) (Saxena *et al.*, 2016)
- *Citrus* spp. (Wang *et al.*, 2021)
- Café (*Coffea arabica*) (Cristóbal & Jesús, 2016)
- Fruta del dragón (*Hylocereus undatus*) (Guo *et al.*, 2014)
- Guayava (*Psidium guajava*) (Raquel *et al.*, 2013)
- Mangostan (*Garcinia mangostana*) (Vitro *et al.*, 2020)
- Papaya (*Carica papaya*) (Tapia *et al.*, 2008)
- Fresa (*Fragria frageriae*) (Zhang *et al.*, 2016)

2.3.4 *Alternaria alternata*

A. alternata causa la mancha negra en frutas y verduras en todo el mundo. Es un hongo latente que se desarrolla durante el almacenamiento en frío de los frutos, haciéndose visible durante el período de comercialización provocando grandes pérdidas poscosecha. Dentro de la sintomatología son observables manchas en la superficie de la fruta caracterizadas por lesiones deprimidas, circulares u ovaladas, que eventualmente se vuelven negras como resultado de la esporulación masiva del patógeno (Figura 6). Sin embargo, las lesiones no penetran el fruto, se limitan a la superficie de la fruta y no causan una pudrición extensa de la pulpa. Cabe recalcar que las lesiones de múltiples sitios de infección en la fruta pueden fusionarse a medida que se expande el micelio activo, y eventualmente cubren toda la superficie de la fruta (Troncoso & Tiznado, 2014).

El mismo comportamiento es observable en una gran cantidad de frutos, por ejemplo:

- Causa podredumbre del melón (*Cucumis melo* var. *inodorus*) (Dnh *et al.*, 2004).
- Causa podredumbre del fruto de la granada (Perelló *et al.*, 2008).
- Responsable de lesiones negras hundidas en tomates (Morris *et al.*, 2000).
- Infecta al mango (*Mangifera indica* L.), causando podredumbre (J. Li *et al.*, 2018).
- Pudrición de manzanas (*Malus domestica* Borkh) (Kou, 2014).

- Pudrición del fruto de la higuera (Latinović *et al.*, 2014).

Por otro lado, *A. alternata* no solo afecta a fruto, sino que existen reportes donde se ha logrado aislar de sorgo, arroz, semillas de soja y trigo recién cosechado (Broggi *et al.*, 2007).

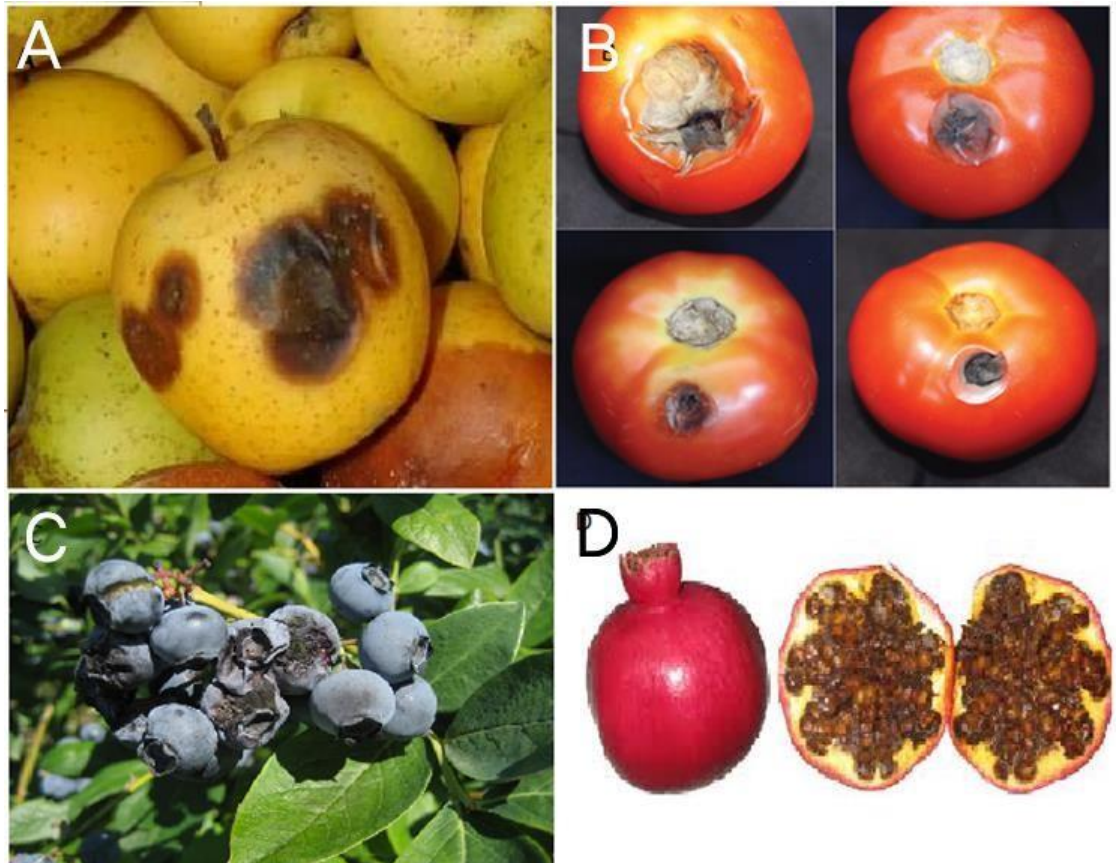


Figura 6. Podredumbre de A) manzana, B) tomate, C) mora azul y D) granada causada por *A. alternata* (Al-Maawali *et al.*, 2021).

2.3.5 *Phytophthora* spp.

La enfermedad causada por *Phytophthora* spp. es más frecuente en áreas tropicales y subtropicales e infecta tanto raíces, tallos, hojas y frutos, justificando su relevancia por ser una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial. En cuanto a raíz, *Phytophthora* causa pudrición, a su vez, son visibles lesiones negras en el tallo; circulares, impermeables y de color café grisáceo en las hojas, respecto al fruto, estos son cubiertos de esporangios blancos (Akilli Şimşek *et al.*, 2019). Las lesiones en tallos y hojas son comunes en ocasiones en las que el suelo inoculado entra en contacto con las partes inferiores de la planta (Ruffner *et al.*, 2019).

La enfermedad denominada pudrición basal del tallo o maya, provocada por *Phytophthora capsici* (Hyder *et al.*, 2018), restringe la producción de chile (*Capsicum annuum* L.). Además, *Phytophthora* spp. también es responsable de causar la pudrición en tomates y pimientos (Li *et al.*, 2023).

Los tipos de calabaza de verano (yellow crookneck, zucchini) e invierno (acorn, butternut,) son altamente susceptibles a *Phytophthora* causando tizón foliar y pudrición de fruta (Figura 7). Los primeros síntomas foliares incluyen lesiones acuosas, irregulares y de rápida expansión en las hojas. La muerte regresiva de las puntas de los brotes, el marchitamiento, la pudrición de los brotes y la muerte de la planta son eventualmente síntomas que aparecen rápidamente luego de la infección inicial. En las frutas infectadas aparecen áreas hundidas, oscuras y empapadas de agua y se cubren rápidamente con el crecimiento de hongos blancos en las calabazas amarillas de verano y los calabacines (Alzohairy *et al.*, 2020).

La sintomatología foliar del tizón *Phytophthora* en la sandía generalmente solo se manifiesta mediante manchas en las hojas empapadas de agua, que se secan y se vuelven marrones, y mueren. Por otro lado, la sandía es más susceptible sin importar la etapa de crecimiento o desarrollo en la que se encuentre. Cuando la fruta es infectada inicialmente aparecen lesiones marrones, irregulares y de rápida expansión que se vuelven redondas u ovaladas. En algunas ocasiones aparecen anillos concéntricos dentro de una lesión. Los centros de las áreas podridas están cubiertos con un crecimiento similar a un hongo grisáceo (Figura 7), mientras que los bordes exteriores de las lesiones son de pigmentación marrón y empapados de agua (Egel *et al.*, 2020).

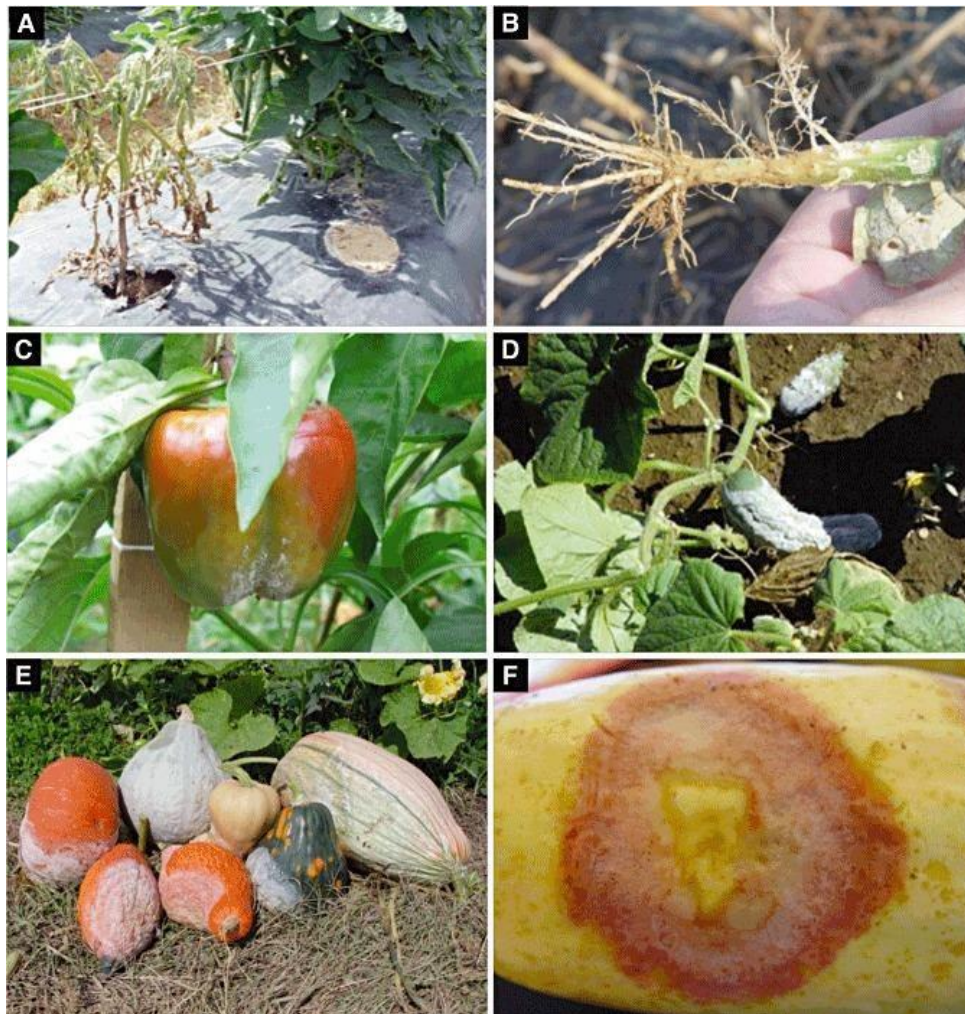


Figura 7. Sintomatología asociada a la infección por *P. capsici*. A) Podredumbre en raíz de planta de tomate causada por *P. capsici*. B) Planta de calabaza que muestra pérdida de raíz y pardeamiento causada por la infección. C) Superficie de pimiento infectada con esporas. D) Producción masiva de esporangios en superficie de pepino infectada. E) y F) Calabaza de invierno infectada con *P. capsici* (Lamour *et al.*, 2012).

2.3.6 *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia es un hongo fitopatógeno que ataca principalmente a tubérculos, tallos subterráneos y raíces. Está ampliamente distribuido en todo el mundo en prácticamente todos los suelos aptos para el crecimiento de las plantas. Los huéspedes vegetales más importantes, además de la tomate (Figura 8), papa, repollo, incluyen remolacha, frijoles, zanahoria, apio, berenjena, berro, pepino, guisante, cebolla, lechuga, pimiento, ruibarbo, espinaca y batata

(Ferrucho *et al.*, 2012; Marcou *et al.*, 2021; Strashnov *et al.*, 1985; Strausbaugh *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).



Figura 8. Damping-off provocado por *R. solani* en tomate (Kühn, 2008).

La fase de la enfermedad llamada caspa negra es común en tubérculos producidos comercialmente y en huertos familiares. Las masas duras irregulares, de color negro a marrón en la superficie del tubérculo son esclerocios, o cuerpos en reposo, del hongo. Aunque estas estructuras se adhieren fuertemente a la piel del tubérculo, son superficiales y no causan daños, incluso durante el almacenamiento (Betancourth *et al.*, 2021).

La caspa negra es el signo más notable de *Rhizoctonia* pero la fase más dañina de la enfermedad ocurre bajo tierra y, a menudo, pasa desapercibida. El hongo ataca los brotes subterráneos antes de que emerjan del suelo (Barreto *et al.*, 2020). El daño varía, la lesión fúngica, o cancro, puede limitarse a un área marrón superficial que no tiene un efecto perceptible en el crecimiento de la planta. Las lesiones graves son grandes y hundidas, además de necróticas. Interfieren con el funcionamiento normal de los tallos y estolones al trasladar el almidón de las hojas al almacenamiento en los tubérculos. Si la lesión fúngica se expande rápidamente, en relación con el crecimiento de la planta, el estolón o el

tallos se pueden ceñir y matar (Barreto *et al.*, 2020; Ferrucho *et al.*, 2012; Kanetis *et al.*, 2016).

2.4 Estrategias de control de enfermedades

Dentro de las medidas inmediatas para el control de patógenos se encuentra el uso de diversos fungicidas de amplio espectro, con el fin de erradicar un gran número de especies patógenas ya que el uso de moléculas sintéticas actúa directa y eficazmente sobre los patógenos. Sin embargo, en la actualidad el éxito de aplicación de estos compuestos en el incremento de productividad agrícola a nivel mundial ha impactado negativamente los suelos, ecosistemas y vida humana (Villarreal *et al.*, 2018).

Por otro lado, la necesidad de producir alimentos de manera sustentable ha propiciado la búsqueda de técnicas desde culturales como la rotación de cultivo, eliminación de malezas, utilización de variedades resistentes, porta injertos hasta el uso de modificación genética y la edición del genoma para la producción de plantas transgénicas resistentes a enfermedades. Aunque, este tipo de estrategias se vuelven complicadas, ya que, para su uso en el campo, estas soluciones deben ser eficaces, y deben implementarse cuidadosamente pues tampoco deben introducir un potencial alérgico o toxina. Algunas de las modificaciones genómicas en plantas de cultivo implican intervenciones en el sistema de reconocimiento de patógenos, modificaciones dirigidas a rasgos recesivos y/o genes de susceptibilidad. Además, de intervención con péptidos antimicrobianos o a través de otros genes de resistencia de plantas dominantes como los correspondientes a la proteína similar a la ferredoxina vegetal (PFLP) y la proteína que ayuda a la respuesta hipersensible (HRAP) (Van Esse *et al.*, 2020).

De manera similar, las prácticas culturales como el sistema de siembra por parcelas separadas o la rotación de cultivo son capaces de minimizar la incidencia de plagas y enfermedades, aunque de manera un poco deficiente (Moura *et al.*, 2020; Tariq *et al.*, 2019). Es de este modo que el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) es opción indispensable para el desarrollo sustentable de la industria agrícola, que a su vez significa un gran apoyo para la

seguridad alimentaria global, ya que utiliza una mezcla de metodologías biológicas, culturales y químicas de forma compatible con la anterior premisa (Carmona Vivas, 2017). En el MIPE el uso de agentes de control biológico (ACB) ha funcionado gradualmente como un sustituyente más ecológicamente sustentable, pues exceptúa los efectos negativos en la capacidad productiva y la calidad de los cultivos agrícolas provocada por las distintas patogenicias, mediante la reducción de la contaminación de suelos y mantos acuíferos, sin mencionar la disminución de la resistencia de los organismos patógenos (Carmona Vivas, 2017).

Los ACB comenzaron a usarse a inicios del siglo XIX, formados por organismos vivos, o en su defecto, metabolitos para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas (Villarreal *et al.*, 2018). Recientemente una abundante diversidad de microorganismos que forman parte de la rizosfera ha sido estudiada, tanto su efecto en el control de organismos fitopatógenos como su efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Tomando en cuenta que la rizosfera representa la primera línea de defensa de la planta para combatir organismos fitopatógenos edáficos, se ha promovido el estudio de múltiples mecanismos en los que intervienen los ACB para controlar el crecimiento, desarrollo e infección de organismos fitopatógenos en cultivos agrícolas de importancia económica. Algunos mecanismos como: hiperparasitismo y predación, mecanismos indirectos como competencia de espacio y nutrientes, producción de compuestos de bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno; han sido observados en cepas microbianas ACB (Tabla 2).

2.4.1 Control químico

Por ejemplo, Prochloraz es un fungicida utilizado para controlar la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. (Mora *et al.*, 2021). Algunos otros fungicidas como Fudioxonil y Fenhexamid están registrados en EE.UU para su aplicación poscosecha a manera de controlar la podredumbre de las nectarinas y melocotones (Karabulut *et al.*, 2010). Productos como Benomyl son efectivos contra *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* debido a que

los fungicidas a base de benzimidazoles se transforman en metil benzimidazol carbamato en superficie de la planta, interfiriendo en la división nuclear de los hongos por mecanismos mutágenos (Amini & Dzhaililov, 2010; Shirsole *et al.*, 2019; Muzhinji *et al.*, 2018).

El uso de pesticidas o moléculas de síntesis química es el método más usual para el control de fitopatógenos (Tabla 2), sin embargo, son cada vez menos eficaces debido a la resistencia desarrollada por los patógenos, además de la contaminación causada al suelo por su uso frecuente de estos productos.

Tabla 2. Agentes de control químico con capacidad de inhibición micelial

Agente de control químico	Fitopatógeno
Carbendazim, fosfito de cobre y Tiabendazol	<i>Rhizoctonia solani</i>
Azoxystrobin, Carbendazim, fosfito de cobre, Tiabendazol y Clorotalonil	<i>Fusarium oxysporum</i>
Fosfito de cobre y Tiabendazol	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>
Carbendazim, Tiabendazol, y Azoxystrobim	<i>Penicillium spp.</i>

Fuente: Alburquerque Andrade, 2018

2.4.2 Control biológico

El control biológico puede ocurrir por diversos mecanismos (Tabla 3) donde el microorganismo antagoniza a los patógenos a través de varios mecanismos directos e indirectos. Por ejemplo, la antibiosis, el parasitismo, la inducción de resistencia sistémica, las enzimas líticas y la competencia por el espacio y los nutrientes. Los mecanismos indirectos inducen modificaciones morfológicas y bioquímicas en la planta huésped y son ampliamente reconocidos por aumentar la resistencia de la planta contra el estrés a través de la resistencia sistémica y aumentar el crecimiento de la raíz (Asad, 2022).

Para el uso de microorganismos antagonistas como una estrategia para reducir la incidencia de podredumbre, se han utilizado dos estrategias: (1) Uso de microorganismos propios de la rizosfera y de la superficie de frutos u hojas,

los cuales son aislados, multiplicados y reintroducidos de manera controlada (Vidal *et al.*, 2021). (2) Introducción exógena de microorganismos antagonistas de los patógenos (Mema *et al.*, 2020).

Para ser considerado un buen agente de control biológico, el potencial antagonista debe cumplir las siguientes características (Vidal *et al.*, 2021; Mema *et al.*, 2020):

- Estabilidad genética
- Efectivo en bajas concentraciones
- Nutricionalmente poco exigente
- Capaz de sobrevivir en condiciones poco favorables
- Incapaz de producir compuestos secundarios tóxicos
- Efectivo contra diversos patógenos
- Incapaz de producir toxicidad en frutos

Tabla 3. Moléculas microbianas implicadas en la inhibición de fitopatógenos

Molécula	Microorganismo	Tipo de compuesto / acción	Referencia
DAPG y piocianina, biosurfactantes	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibióticos y biosurfactantes	Pieterse <i>et al.</i> , 2014
Benzaldehído, nonal, benzotiazol, acetofenona, 2,3-butanodiol, acetoína, 2,4-di-terc-butilfenol, 1-octanol, benzotiazol, ácido benzoico, benzaldehido, 3-metilbutanal		Compuestos orgánicos volátiles	Gao <i>et al.</i> , 2018; Rajer <i>et al.</i> , 2017; Sánchez-López <i>et al.</i> , 2016
Iturina, surfactina y fengicina	<i>Bacillus</i>	Lipopéptidos	Shahid <i>et al.</i> , 2021
DAPG, pirrolnitrina y fenazina	<i>Pseudomonas spp.</i>	Antibióticos	Raaijmakers & Mazzola, 2012

Sideróforos	<i>Pseudomonas</i> spp.	Competencia de hierro mediada por sideróforos	Sass <i>et al.</i> , 2019
	<i>Trichoderma asperellum</i>		Go <i>et al.</i> , 2019
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		Yang <i>et al.</i> , 2021
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Hiperparasitismo	McNeely <i>et al.</i> , 2017
	<i>Alternaria alternata</i>		Zheng <i>et al.</i> , 2017
Quitinasas y proteasas	<i>Trichoderma</i> spp.	Enzimas líticas	Köhl <i>et al.</i> , 2019b
6-PAP, gliovirin, gliotoxin, viridin		Antibióticos	(Ghorbanpour <i>et al.</i> , 2018)

2.5 El género *Bacillus* y su potencial antagónico

El género *Bacillus* justifica su importancia con una serie de características relevantes para su aprovechamiento en la industria agrícola (Figura 9). Primeramente, es un bacilo Gram positivo, crece en condiciones anaerobias facultativas, además, su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, y aunque es versátil en cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, la mayoría de las especies crecen entre 30 y 45°C (mesófilas) (Villarreal *et al.*, 2018).

Debido a esto, el suelo suele ser el reservorio principal de *Bacillus*, y debido al carácter saprófito de la mayoría de las especies, una gran cantidad de moléculas en el suelo pueden servir de sustrato. Por lo cual, una gran diversidad de especies de *Bacillus* pueden desarrollarse en suelos. Suelen encontrarse recuentos en el intervalo de 3 log a 6 log por gramo de suelo (Q. Zhang *et al.*, 2021), principalmente en especies como *B. subtilis* y *B. cereus* (Vargas *et al.*, 2000).

Dentro de las especies con mayor relevancia en la agricultura se encuentran, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilis*. Cabe mencionar que *B. subtilis* se encuentra etiquetada como QPS (Presunción Cualificada de Seguridad) por la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (Koutsoumanis *et al.*, 2023).

Otra de las características relevantes acerca de *Bacillus* es la capacidad de formar endosporas resistentes al calor y a la desecación, lo que le provee de una fácil diseminación y habilidad de prevalecer en cualquier ecosistema. Las esporas se forman cuando *Bacillus* se encuentra en su segunda fase del ciclo de vida, la fase de esporulación. La cubierta de endosporas es una capa compuesta por docenas de proteínas, además de varias capas que protege el genoma bacteriano durante condiciones de estrés. La endospora es capaz de permanecer viable hasta que las condiciones del ambiente sean favorables para los procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Villarreal *et al.*, 2018). Se desconoce el mecanismo exacto de la persistencia de las esporas, pero además de ser resistentes a la radiación ultravioleta (UV), los productos químicos (como el peróxido y el hipoclorito), el calor extremo y otros factores de estrés, las esporas están metabólicamente inactivas y parcialmente deshidratadas, lo que probablemente permita su supervivencia en ambientes hostiles y libres de nutrientes.

Para que la latencia garantice la supervivencia, las esporas deben poder germinar rápidamente cuando los nutrientes vuelvan a estar disponibles. Las esporas constantemente interactúan con sustratos en el exterior utilizando una serie de receptores de germinación incrustados en la membrana interna de la espora. Por ejemplo, las moléculas que promueven la germinación en *B. subtilis* incluyen algunos macronutrientes como azúcares, aminoácidos, fragmentos de peptidoglicano y algunos iones. Dichas moléculas interactúan con los receptores atravesando la cubierta y la corteza de las esporas, la cubierta debe ser, en última instancia, protectora y permeable (Wang *et al.*, 2020). La cubierta se describe como un tamiz molecular que excluye moléculas grandes, como la lisozima, mientras permite el paso de moléculas más pequeñas que promueven la germinación de la espora (Mckenney *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020).

2.5.1 Moléculas involucradas en el control biológico

Entre los microorganismos de control biológico más comunes se encuentra *Bacillus subtilis*, es de hecho usado ampliamente en aplicaciones cuyo fin es el control de enfermedades (Bouchard-Rochette *et al.*, 2022) y la promoción de crecimiento de cultivos (Yu *et al.*, 2011). Existen reportes que señalan la competencia de *B. subtilis* para inhibir el crecimiento micelial de hongos patógenos como, *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinérea* (Villarreal *et al.*, 2018), *Colletotrichum gloeosporioides* (Gao *et al.*, 2018) y *Fusarium solani* (Rodríguez *et al.*, 2019).

De la misma forma, se sabe que *B. subtilis* es capaz de competir mediante otro tipo de compuestos antimicrobianos (AMC) entre los que destacan enzimas, antibióticos y péptidos (Figura 9). Se reporta que al menos el 4-5% de su genoma se encuentra dedicado a la producción de compuestos antimicrobianos, destacando la producción de péptidos (Shahid *et al.*, 2021).

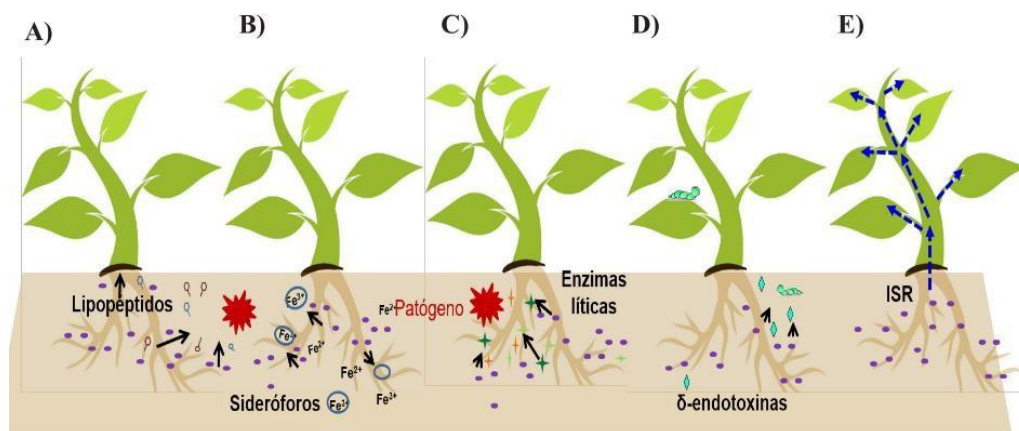


Figura 9. Mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopeptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica (Villarreal *et al.*, 2018).

2.5.1.1 Péptidos no ribosomales en *Bacillus subtilis*: lipopeptidos

La composición en los lipopeptidos resulta indispensable para sus funciones, un resto peptídico se une a una cola lipídica, lo que le confiere una propiedad anfifílica. Gracias a esta naturaleza exhiben propiedades

tensoactivas, característica imprescindible en sus funciones biológicas y propiedades antimicrobianas. De hecho, los lipopéptidos son capaces de afectar la membrana plasmática de especies patógenas, formando poros que conducen a la muerte celular (Jiang *et al.*, 2019).

Los lipopéptidos (LP) generalmente se sintetizan a través de una adición secuencial de péptidos no ribosómicos. Dado que las rutas biosintéticas de LP son muy flexibles, la gama de LP producidos es extremadamente heterogénea. Entre las LP producidas por *B. subtilis*, se han distinguido cuatro familias principales: bacilomicina, surfactinas, iturinas y fengicinas (Figura 10) (Caulier *et al.*, 2019). Para cada familia de LP, la producción de compuestos está regulada principalmente por factores ambientales como fuentes de carbono, disponibilidad de oxígeno, pH y temperaturas (Caulier *et al.*, 2019). La temperatura cálida (≥ 37 °C) y las condiciones anaeróbicas aumentan la producción de surfactinas, mientras que, las temperaturas más bajas (25–37 °C) y los biorreactores aireados favorecen los metabolitos de la familia de las fengicinas y las iturinas (Jacques, 2011).

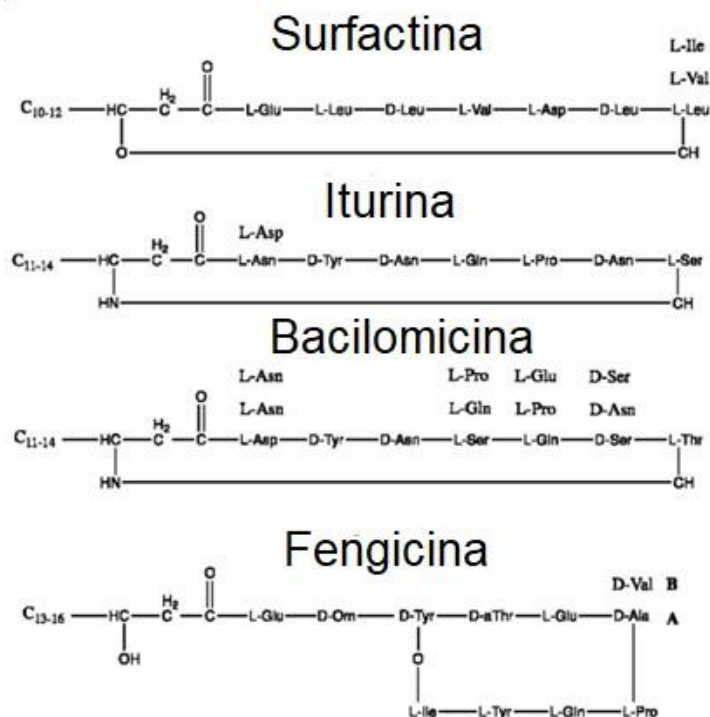


Figura 10. Estructura de lipopéptidos sintetizados por *B. subtilis*. Estructura lipídica hidrocarbonada abreviada y peptídica formada por el anillo lactona (Caulier *et al.*, 2019).

Las surfactinas desencadenan cascadas de señalización que regulan procesos dependientes de la densidad celular, la esporulación y la competencia, mientras que las iturinas y fengicinas son conocidas por su fuerte actividad antifúngica contra algunas especies de hongos patógenos de plantas. En contraste con las iturinas y las fengicinas, las surfactinas muestran actividades antivirales y antibacterianas (Yuan *et al.*, 2019), inhibiendo bacterias patógenas como *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *R. solanacearum* o *X. oryzae* (Caulier *et al.*, 2019). Por otra parte, algunas surfactinas pueden afectar importantes hongos patógenos de plantas como *Botrytis cinérea* (Bouchard-Rochette *et al.*, 2022), *F. oxysporum* (Sarwar, Hassan, *et al.*, 2018) o *Rhizoctonia solani* (Jamali *et al.*, 2020).

2.5.1.2 Sideróforos

Son compuestos que son secretados por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro (Figura 11), de manera que estas moléculas secuestren el hierro del entorno (Sass *et al.*, 2019). Considerando que el hierro es un elemento imprescindible, principalmente para síntesis de ADN, respiración y eliminación de radicales libres. En el ambiente se encuentra en su catión Fe^{3+} formando parte de sales e hidróxidos de escasa solubilidad, formas químicas que imposibilitan su uso por algunos seres vivos. La disponibilidad del hierro es fundamental en el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos para colonizar un organismo o invadir un ambiente (Page, 2019).

El ácido itoico (DHBG) es el conjugado de glicina del 2,3-dihidroxibenzoato (DHB) y es utilizado como precursor para producir bacillibactina que se obtiene tras una reacción de condensación de tres unidades de DHB-glicina-treonina (Pi & Helmann, 2018).

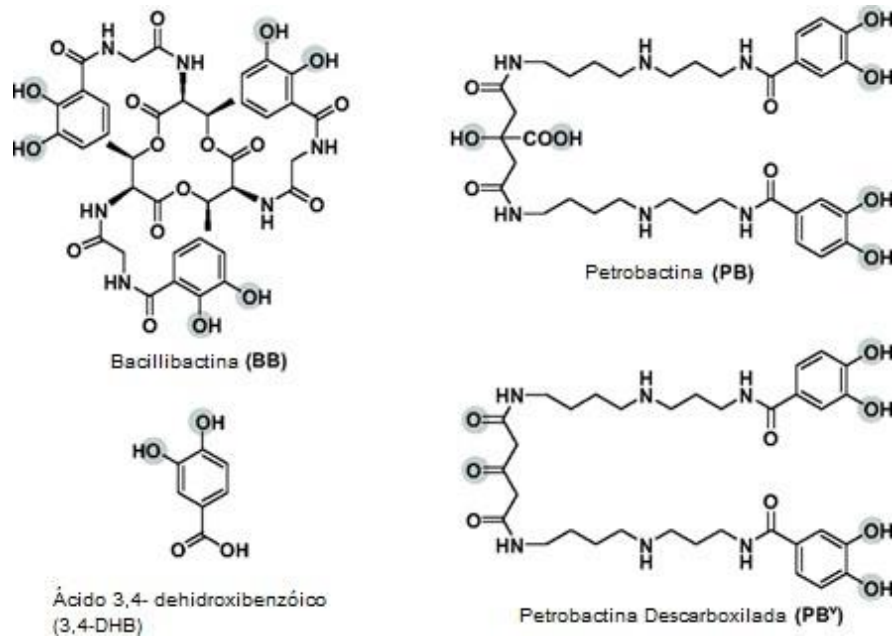


Figura 11. Estructura de sideróforos producidos por *Bacillus* spp. (Caulier *et al.*, 2019).

El ácido itoico y la bacillibactina son sideróforos catecólicos que quelan el hierro y reducen su biodisponibilidad. Este mecanismo de restricción del hierro permite a *B. subtilis* antagonizar el crecimiento de otros microorganismos circundantes como, por ejemplo, *F. Oxysporum* (Wu *et al.*, 2020), permitiendo a la cepa reducir la incidencia de *Fusarium* entre un 12.5 y 56.9 %.

2.5.1.3 Péptidos ribosomales en *Bacillus subtilis*: Bacteriocinas

Los péptidos sintetizados ribosomalmente generalmente se derivan de precursores de 100 aminoácidos aproximadamente y se procesan a compuestos maduros mediante modificaciones postraduccionales. En su mayoría, estos péptidos son también llamados “bacteriocinas”, caracterizados como moléculas de bajo peso molecular que exhiben características inhibitorias de crecimiento contra bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora (Figura 12) (Basi-Chipalu *et al.*, 2022; Chopra *et al.*, 2015).

A lo largo de los años se han sugerido diversas clasificaciones, de manera que una forma razonable de abarcar la diversidad de bacteriocinas de *Bacillus* es clasificarlas en función de su ruta biosintética. Por consiguiente, se distinguen 3 clases principales para *B. subtilis*, la Clase I: péptidos modificados

postraduccionalmente, la Clase II: péptidos no modificados y la Clase III: bacteriocinas de más de 10 kDa (Kumariya *et al.*, 2019).

Sin embargo, debido a su gran diversidad, las bacteriocinas muestran diferentes modos de acción, como la vascularización del protoplasma, la formación de poros o la desintegración celular (Negash & Tsehai, 2020). Para la mayoría de las bacteriocinas de clase I y II, el objetivo de su actividad se centra en la envoltura bacteriana debido a sus propiedades anfífilas o hidrofóbicas. Por ejemplo. Los lantibióticos de la clase I, por un lado, inhiben la síntesis de la pared celular de las bacterias objetivo mediante la unión al lípido II, el encargado del transporte de subunidades de peptidoglicano a través de la membrana celular interna. Por otro lado, el lípido II se puede utilizar como molécula de acoplamiento para la inserción del antibiótico a la membrana, de este modo conduciendo a la formación de poros y muerte celular (Caulier *et al.*, 2019).

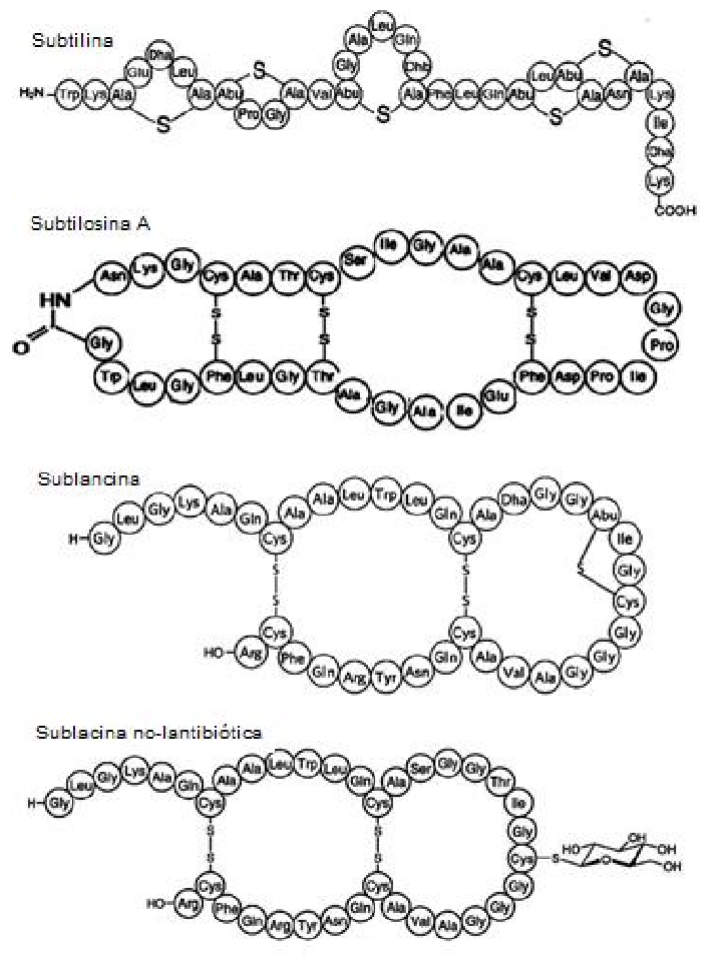


Figura 9: Estructuras de bacteriocinas producidas por *Bacillus* (Mongkolthanaruk, 2012)

2.5.1.4 Enzimas AMP

En *B. subtilis*, dos tipos principales de enzimas presentan actividades antagonicas contra microorganismos: las enzimas líticas y las involucradas en la extinción del quórum (Caulier *et al.*, 2019). Dentro de estas enzimas destacan las celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas, generalmente degradadoras de pared celular. Son especialmente efectivas contra hongos, debido a la quitina y glucano presente en su pared celular, donde también se encuentran incrustadas diversas glicoproteínas (Mishra *et al.*, 2020).

Las N-acil-l-homoserina lactona hidrolasas (AHL-lactonasas) de *B. subtilis* son enzimas autoinductoras, puesto que cuando una población bacteriana prolifera, la concentración de AHL aumenta de manera que todas las células coordinen sus actividades metabólicas (formación de biopelícula, esporulación, factores de virulencia o producción de antibióticos) (Sanches, 2020). Estas enzimas han atraído interés para el control biológico, ya que son capaces de afectar el crecimiento de plagas microbianas nocivas como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causante de la pudrición blanda de la papa (Hong *et al.*, 2022).

2.5.1.5 Inducción de defensa de plantas

El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o microorganismos (PAMPs/MAMPs por sus siglas en inglés) son una de las primeras líneas de defensa de las plantas (Bhar *et al.*, 2021). Tanto DAMPs como los MAMPs encienden cascadas de señalización estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, y la activación de proteínas quinasa (Héloir *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2017). Estos mecanismos son modulados mediante factores de transcripción que desencadenan la expresión de genes que codifican a enzimas hidrolíticas (glucanasas, quitinas), al igual que activan la producción de compuestos con actividad antimicrobiana como fitoalexinas, estimulan el reforzamiento de la pared celular mediante la deposición de calosa/lignina y provocan cierre estomático (Bacete *et al.*, 2018).

Además, existen dos tipos de resistencia inducida: la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la inducción de resistencia sistémica (IRS). Esta última es inducida gracias a microorganismos benéficos por diferentes elicitores, incluyendo los MAMPs, COVs, lipopéptidos y sideróforos. De esta manera, se deduce que el mecanismo mediante el cual *Bacillus* spp. es capaz de activar IRS (Poveda *et al.*, 2022; Niu *et al.*, 2016). La IRS y RSA estimulada por cepas de *Bacillus* se ha reportado en una diversidad de especies de plantas, resultando efectivo en contra de una importante diversidad de patógenos relevantes como *Botrytis cinerea* (Li *et al.*, 2015; Poveda *et al.*, 2022; Shafi *et al.*, 2017). Es interesante resaltar que la combinación de ISR y SAR puede fortalecer la protección contra diferentes patógenos (Montejano-Ramírez & Valencia-Cantero, 2023).

2.5.1.6 Compuestos orgánicos volátiles (COV)

El control de enfermedades utilizando microorganismos productores de COV se ha informado con un creciente éxito en diversas enfermedades de plantas (Tabla 4) (Choub *et al.*, 2022; Prakash & Arora, 2021; Santos *et al.*, 2023b; Xie *et al.*, 2021). Los COV de origen microbiano pueden también funcionar como una posible fuente directa de nutrientes para las plantas (Raza & Shen, 2020) como es el caso de la formamida y N,N-dimetil-formamida (Zhou *et al.*, 2016). Por otro lado, los COV son capaces de inducir resistencia sistémica en plantas (Kottb *et al.*, 2015; Wintermans *et al.*, 2016), inhibir directamente los patógenos que afectan a la planta (Schulz-Bohm *et al.*, 2017).

Existe poca información acerca de la implementación de compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVm) en agricultura u horticultura. En los sistemas agrícolas, las condiciones a campo abierto donde son aplicados los COVm son muy diferentes de las condiciones *in vitro* que se utilizan actualmente en la mayoría de los estudios. Desde el descubrimiento de compuestos volátiles como el 2,3-butanodiol, se ha empleado su potencial para estimular el crecimiento de las plantas y fortalecer su resistencia sistémica (Park *et al.*, 2018, y Song *et al.*, 2019). Estos enfoques han demostrado resultados alentadores, tanto mediante la aplicación directa de los compuestos como mediante la

incorporación de cepas productoras en el suelo (Park *et al.*, 2018). Por otro lado, el disulfuro de dimetilo (DMDS), es emitido también por un gran número de bacterias, y su efectividad contra nematodos y patógenos transmitidos por el suelo es indudable (Meldau *et al.*, 2013; Seefeldt & Weimer, 2000). Este mismo motivo justifica la relevancia de su uso en productos fumigantes de suelos en los últimos años.

Sin embargo, la investigación respecto a la aplicación de otros COV microbianos en la agricultura apenas comienza. Actualmente los métodos de antaño se siguen usando, y los productos químicos que dañan tanto a los suelos como a la flora y la fauna que no son objetivo, deben ser remplazados o complementados con soluciones más amigables. Es aquí donde los COV microbianos encajan en la solución, pues respecto a los fungicidas sintéticos, los COV no parecieran compartir esas desventajas.

La protección de cultivos que proveen de alimentos altamente consumidos en México (arroz, tomate, frijol, pimiento, etc.) ha sido bien documentada. De este modo, han surgido estudios referidos a la inducción de respuesta sistémica utilizando cepas del género *Bacillus* con fines de buscar nuevas soluciones (Akram *et al.*, 2016; Choudhary & Johri, 2009; W. Wang *et al.*, 2013).

El género *Bacillus* particularmente cuenta con la capacidad de producir una diversa cantidad de moléculas elicitoras que inducen respuesta sistémica en plantas, entre las cuales destacan: lipopéptidos (Hernández-Morales *et al.*, 2018), fitohormonas (Kashyap *et al.*, 2019) y COV (Tabla 4) (Li *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2021). Específicamente los COV son activadores de genes *PR*, los cuales se encuentran relacionados con la protección ante agentes patógenos, y en comparación con las sustancias no volátiles, los COV al existir en forma gaseosa son absorbidos fácilmente por las plantas en forma de señales químicas, ejerciendo así su efecto. Un ejemplo es el de la planta del tabaco, donde *PR2* codifica a β -1,3 glucanasa y *PR3* codifica a quitinasa, son activados mediante la interacción con COV provenientes de *Bacillus* sp., adoptando resistencia a *Rhizocronia solani* y *Phytophthora nicotianae* (Kim *et al.*, 2015).

Además de genes *PR*, existen otros mecanismos que también son activados por *Bacillus*, por ejemplo, cambios estructurales en la pared celular por acumulación de lignina o la producción de flavonoides, auxinas, fitoalexinas o glucosinolatos (Pretali *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016). A pesar de que cada mecanismo que involucra la protección de la planta es mediado por diferentes rutas metabólicas, un solo microorganismo puede ser capaz de desencadenar múltiples mecanismos de protección. Se ha visto que *Bacillus amyloliquefaciens* B-16 inoculado en plantas de trigo indujo producción de diversas proteínas *PR*, además de metabolitos secundarios, como ferúlico y ácido gálico, confiriendo capacidad de resistencia contra *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016).

Tabla 4. COV producidos por *Bacillus subtilis* y su efecto contra diversas especies

Especies	COVm	Efecto	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	Benzaldehído	Actividad antimicrobiana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. Sependónico	Rajer <i>et al.</i> , 2017
	Nonal		
	Benzotiazol		
	Acetofenona		
	2,3-butanodiol	Inducción de resistencia sistémica en <i>A. thaliana</i> frente <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	Ryu <i>et al.</i> , 2003
	Acetoína	Inducción de resistencia sistémica en <i>A. thaliana</i> frente a <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	Rudrappa <i>et al.</i> , 2010
	2,4-Di-terc-butilfenol	Actividad antifúngica contra <i>C. gloeosporioides</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>A. alternata</i> y <i>Monilinia fructicola</i>	Gao <i>et al.</i> , 2018
1-Octanol			
Benzotiazol			
Ácido benzoico			
Benzaldehido			
3-Metilbutanal			

También se ha observado una capacidad inhibitoria micelial y de producción de esporas de hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* por efecto de COV producidos por *Bacillus* spp. (Wang *et al.*, 2022). C. Wang *et al.*, 2022 ,

Gao *et al.*, 2017 y Massawe *et al.*, 2018 reportaron comportamientos de antagonismo de COV sintetizados por especies del género *Bacillus* sobre fitopatógenos comunes pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Sclerotinia*, *Botrytis* y *Colletotrichum*.

Vespermann *et al.*, (2007) evaluaron el efecto de COV producidos por siete cepas de *B. subtilis* contra un fitopatógeno, donde se obtuvo inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*. De manera similar, Leelasuphakul *et al.* (2008) descubrieron que los COV producidos por 23 cepas de *B. subtilis* inhibían el crecimiento de *Penicillium digitatum* en un 30-70%. Li *et al.* (2015) encontraron que las cepas de *B. subtilis* XF-1 y 168 mediante COV son capaces de inhibir eficazmente el crecimiento de *Fusarium solani*, y los principales COV detectados por cromatografía de gases de microextracción en fase sólida-espectrometría de masas (SPME-GC-MS) incluyeron 2-metilbutanona, 2-pentanona, 3-metil-2-pentanona, 2,5-dimetilpirazina, benzaldehído y 5-metil-2-heptanona.

El género *Bacillus* es capaz de fijar de nitrógeno atmosférico y convertirlo en compuestos nitrogenados inorgánicos, indispensables pues son un requisito para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Jain *et al.*, 2021). Éste género es capaz de producir componentes nitrogenados a partir de procesos metabólicos primarios y secundarios, siendo los procesos metabólicos secundarios los responsables de la producción de volátiles, semivolátiles y moléculas de bajo peso molecular (<300 Da) (Tilocca *et al.*, 2020).

Pirrol-pirazina son el principal grupo reportado de compuestos bacterianos nitrogenados producidos principalmente por *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* spp. (Valença *et al.*, 2021). De igual manera se han reportado otros compuestos nitrogenados como amidas, pirazinas, piridinas y nitrilos. Muchos de los compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno (piridina, indol, pirrol, etc.) son la base de moléculas con actividad biológica incluyendo antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos y alguicidas (Valença *et al.*, 2021).

En un informe reciente, los COV sintetizados por varias cepas de *Lysobacter* que se inocularon en un medio con alta cantidad de proteínas

disponibles, mostraron actividad antioomiceto, mientras que estas mismas cepas produjeron COV sin capacidad antagonista cuando se les hizo crecer en un medio rico en azúcares (Lazazzara *et al.*, 2017; Vlassi *et al.*, 2020). Ante estos datos se entiende que la producción de volátiles depende en gran medida de las condiciones de crecimiento, así como la disponibilidad de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos) y de nutrientes.

2.5.2 *Bacillus subtilis* como promotor de crecimiento

Arabidopsis thaliana es comúnmente el modelo vegetal de estudio en plantas, de hecho también se ha utilizado para analizar el efecto de los COV microbianos provenientes del género *Bacillus* (Li *et al.*, 2019), especialmente la promoción de crecimiento vegetal. Algunos de los volátiles producidos por *Bacillus* capaces de promover crecimiento de brotes:

- 2,3 butanodiol: producido por *B. amyloliquefaciens* (Asari *et al.*, 2016; Ryu *et al.*, 2003) , *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2021) y *B. mojavensis* (Rath *et al.*, 2018).
- Acetoína (3-hidroxi-2-butanona): producida por *B. amyloliquefaciens* (Asari *et al.*, 2016), que a pesar de los efectos fitotóxicos que causa en cantidades grandes (Rath *et al.*, 2018), es también una molécula que promueve el crecimiento en lechugas a partir de un aumento en el peso seco, número de raíces laterales y longitud de brotes (Fincheira *et al.*, 2016).
- Tetrahidrofuran-3-ol y 2-heptanona-2-etil-1-hexanol: promueven crecimiento a través de acción de auxinas y estrigolactonas, incrementando los niveles endógenos. Mecanismo estudiado en *Arabidopsis* y tomate (Jiang *et al.*, 2019).
- Benzaldehído, 9-octadecanona y 6,10,14-trimetil 2-pentadecanona: promueven la producción de biomasa, lo que se asoció con modulación diferencial de la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana* (Poveda, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Caracterizar y evaluar lipopéptidos y compuestos volátiles producidos por *Bacillus* spp., relacionados con el antagonismo microbiano de hongos causantes de pérdidas poscosecha.

3.2 Específicos

1. Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de las cepas Q11, Q19, Q20, Q37, Q38 y Q39 contra *S. rolfisii*, *Phytophthora* spp., *A. alternata*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporoides* y *R. solani* mediante la confrontación dual y de placas invertidas.
2. Identificar las cepas de estudio mediante la secuenciación del gen 16S ribosomal.
3. Identificar los lipopéptidos por FT-IR y el perfil de volátiles mediante SPME GC-MS producidos *in vitro* por cepas bacterianas seleccionadas.
4. Evaluar la capacidad de los volátiles producidos por *Bacillus* spp. para reducir la infección en frutos causados por hongos fitopatógenos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material biológico

Se empleó como referencia de potencial antagónico de fitopatógenos, la cepa *Bacillus subtilis* Q11 del producto comercial BsQ11 (Quimia). Las cepas Q39, Q38, Q37, Q20, Q19 y Q11 que se emplearon forman parte de la colección de la empresa SINQUIMICA, de las cuales se desconoce su actividad de control biológico.

Las cepas de hongos fitopatógenos *R. solani* AG4, *F. oxysporum* FOX13, *S. rolfsii*, *C. gloesporoides* y *P. capsici* también forman parte de la colección de la empresa SINQUIMICA, las cuales fueron aislados de diferentes regiones del país e identificadas mediante claves taxonómicas.

Durante los ensayos, las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio TSA (Difco) y conservadas en papel filtro de celulosa a -20°C (Gardner & Shama, 1998). Mientras que las cepas fúngicas fueron subcultivadas para su mantenimiento en agar PDA (Difco) en tubo inclinado y conservadas en glicerol a -20 °C.

4.2 Caracterización *in vitro* del potencial antagonista de las cepas de *Bacillus*

4.2.1 Ensayos duales

Los ensayos duales (Figura 13), permitieron simular un contacto directo entre bacterias y patógenos para determinar el efecto de compuestos difusibles en el medio generando un halo de inhibición. Para la confrontación *in vitro* de cada cepa de hongo fitopatógeno se realizaron ensayos duales de confrontación y de placas superpuestas.

Para estos ensayos se utilizaron placas Petri (90 × 15 mm) con PDA. Se colocó en el centro de la placa un disco (5 mm de diámetro) de micelio activo del hongo fitopatógeno, y a 10 mm del extremo de la placa se inocularon por estría la cepa de *Bacillus* a ensayar como antagonista (Figura 13) (Shrivastava *et al.*, 2017). Cabe resaltar que las cepas bacterianas se inocularon 24 h después de sembrar el hongo para permitir su crecimiento debido a que su tiempo de duplicación es mayor.

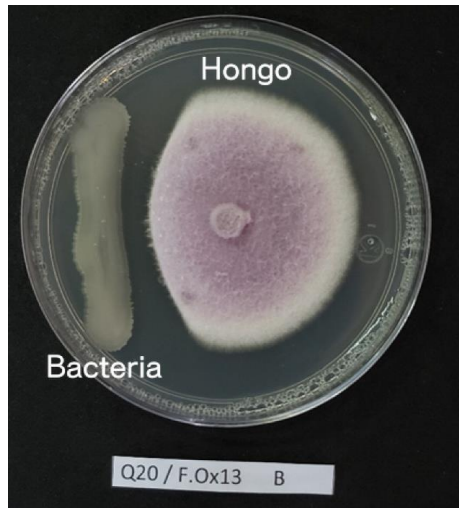


Figura 10. Técnica de confrontación dual en placa.

De este ensayo, se realizaron 3 repeticiones para cada una de las 6 cepas bacterianas y 3 controles sin cepa antagonista.

Una vez sembradas las placas, se incubaron a 27 °C en incubadora Fisherbrand Isotemp RPGA (Thermo Fisher Scientific, USA) por 7 días aproximadamente. Los días de duración de cada ensayo fueron determinados en función al crecimiento micelial, el ensayo se detuvo cuando el hongo llenó la placa control.

Para determinar el porcentaje de antagonismo, se midió el crecimiento desde el centro del disco hasta el micelio activo aproximado a la bacteria. Obteniendo los porcentajes de inhibición con respecto al crecimiento de las placas control donde no se inoculó *Bacillus* (Formula 1).

$$\text{Inhibición (\%)} = [(MC - MP)/MC] * 100 \quad (1)$$

- MC: Promedio de la distancia medida desde el centro del inóculo hasta el micelio activo de las placas control
- MP: Medida desde el centro del inóculo hasta el micelio activo de la placa ensayo

4.2.2 Ensayos de confrontación de placas invertidas

Para evaluar el impacto de los volátiles producidos por las cepas bacterianas en el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos, se llevaron a

cabo ensayos indirectos de confrontación en placas superpuestas (Figura 14) (Abdallah *et al.*, 2018).

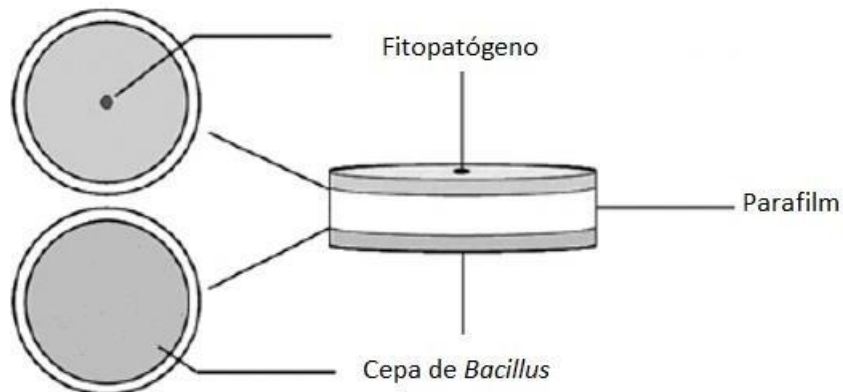


Figura 11. Esquema de ensayos de confrontación para la evaluación de antagonismo por volátiles. Placas Petri inoculadas y colocadas de manera superpuesta, posteriormente selladas con Parafilm.

Para este ensayo se realizaron tres repeticiones para cada una de las 6 cepas bacterianas y el control sin cepa antagonista. De este modo, se sembraron discos (5 mm de diámetro) con micelio activo del fitopatógeno en el centro de placas Petri (90 x 15 mm) con medio PDA y se incubaron a 27 °C por 24 horas.

Al mismo tiempo, se preparó el inóculo de las cepas antagonista. Para ello, en tubos Falcon (50 mL, polipropileno) con 20 mL caldo TSA se dejaron crecer las cepas por 24 horas a 35 °C y 150 rpm en un agitador 3500 Standard Orbital Shaker (VWR, USA). Al término, la pastilla bacteriana fue recuperada por centrifugación utilizando una centrifugadora Rotofix 32 A (Hettich, Alemania) a 2706 x *g* por 10 minutos. Posteriormente, la pastilla fue lavada y la densidad celular fue ajustada a 1x10⁸ cel/mL mediante conteo en cámara de Neubauer. De tal manera, las cepas bacterias fueron sembradas mediante alícuotas de 150 µL en placas con TSA mediante siembra por extensión. Los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron a 28 °C por 7 días.

El porcentaje de inhibición fue calculado de acuerdo con la siguiente Formula 2:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(MC - MA)/MC] * 100 \quad (2)$$

Donde:

- MC: Promedio de la distancia medida desde el centro del inóculo hasta el micelio activo de las placas control.
- MA: Medida desde el centro del inóculo hasta el micelio activo de la placa ensayo.

4.3 Identificación molecular mediante el análisis de subunidad 16S ARNr

La identificación molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S ribosomal. Primeramente, se realizará la extracción de ADN bacteriano mediante el kit Quick-DNA 96 Plus (Zymo Research), de acuerdo con la metodología que proporciona el fabricante. Posterior a la obtención de ADN, se verificó la integridad del ADN mediante gel de electroforesis de agarosa 1% (Bio-Rad). Se utilizó una solución amortiguadora TBE en adición de bromuro de etidio (1 µg/mL) para tinción y se corrió a 90 V por 45 min. El gel se reveló utilizando un fotodocumentador (MiniBis Pro) con luz UV.

Una vez obtenido el ADN, se realizó en un termociclador (Bio-Rad MJ Mini) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación del gen 16S RNAr, utilizando una mezcla de reacción (Tabla 1) de acuerdo con las condiciones indicadas en la Figura 2. Se hizo uso de los oligonucleótidos universales (Weisburg *et al.*, 1991).

fD1: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'

rD1: 5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

(Weisburg *et al.*, 1991).

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para PCR por muestra basada en los componentes del kit GFX PCR DNA Gel Band Purific PAC (Alcali scientific)

Reactivo	Volumen 1X (µL)
Agua	31.1
Solución amortiguadora 10X	2.5
Cloruro de Magnesio 1.5 mM	3
dNTP 50 mM	2
Oligo fD1 20 mM	2
Oligo rD1 20 mM	2
Taq polimerasa	0.4
DNA	2
Glicerol	2.5
Total	50

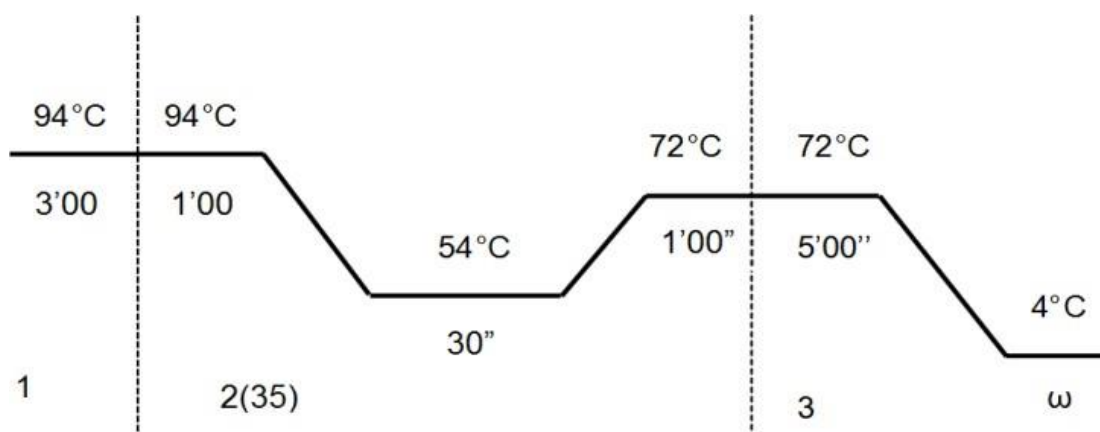


Figura 12. Condiciones para la amplificación genómica de 16S RNAr mediante PCR

Los productos de la reacción de polimerasa se visualizados en transiluminador UV en gel de agarosa al 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en solución Amortiguadora TAE 1X a 70 V por 45 min. Posteriormente, el gel se tiñó adicionando Red Gel (Biotium). Luego las bandas correspondientes al gen ribosomal 16S en el gel fueron reveladas en un fotodocumentador.

Las bandas esperadas respecto al marcador de peso molecular (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA ladder). Posteriormente fueron enviadas a Macrogen (Seoul, Korea) para su secuenciación.

La secuencia de 16S RNAr fue convertida a formato multiFasta. Posteriormente en Mega (6.0) se realizaron arboles Neighbor-joining aplicando Bootstrap (100 permutaciones) para establecer una matriz de distancias de consenso.

4.4 Producción de lipopéptidos como antibióticos

4.4.1 Detección de capacidad de producción de lipopéptidos

Las cepas bacterianas se sometieron a una prueba de hemólisis en placas de Agar sangre, ya que los lipopéptidos bacterianos son capaces de lisar eritrocitos. Se tomó una colonia de las cepas bacterianas en agar y se sembró en placas de agar sangre. Las placas se incubaron 96 horas a 37 °C en incubadora Ecoshel 9025E monitoreando cada 24 horas. Posteriormente se

corroboró aclaramiento de zona alrededor de las colonias indicando producción de lipopéptidos (Zhao *et al.*, 2014).

4.4.2 Extracción de lipopéptidos y análisis por FT-IR

Se realizaron fermentaciones en caldo TSA (Difco) en 3 L por 120 horas a 28 °C y 150 rpm en un agitador 3500 Standard Orbital Shaker (VWR, USA). Posteriormente se vaciaron en tubos Falcon de 50 mL para ser sometidos a centrifugación en una centrifugadora Rotofix 32 A (Hettich, Alemania) a 2706 x g por 20 min, con el fin de separar las bacterias del medio de fermentación. Para la obtención de los lipopéptidos, se realizó una precipitación ácida del sobrenadante, ajustándola a un pH de 2 con una solución de HCl 6 M, la cual se refrigeró a 4 °C en Fisherbrand Isotemp RPGA (Thermo Fisher Scientific, USA) por 24 horas. Después del tiempo, el residuo obtenido se recuperó por centrifugación en Rotofix 32 A (Hettich, Alemania) a 2706 x g por 20 min en frío. La pastilla bacteriana obtenida se lavó con agua destilada a pH 2 en dos ocasiones (Haddad *et al.*, 2009) y se dejó secar en una toalla de papel durante 12 horas. Posteriormente, se adicionó 30 mL de metanol a la pastilla para la extracción de los lipopéptidos. Por último, el contenido del matraz bola se destiló en un rotavapor RII (Buchi, Suiza) a 50 °C a presión reducida para la eliminación del metanol y de esta manera obtener la mezcla de lipopéptidos en crudo concentrada (Pathak & Keharia, 2014).

Mediante un análisis de FT-IR en un equipo Alpha II FTIR Spectrometer (Bruker Corp., Massachusetts, USA) se verificó la presencia de lipopéptidos identificando los grupos funcionales propios de los lipopéptidos, destacando bandas de estrechamiento N-H y CO-N, cadenas alifáticas y carbonilos de lactona. Se analizó el espectro IR en el intervalo de frecuencias de 4,000 a 650 cm^{-1} .

4.5 Identificación de volátiles por medio de SPME GC-MS

4.5.1 Microextracción en fase sólida (SPME)

La extracción y análisis de los COV bacterianos se llevaron a cabo según los procedimientos realizados en la metodología descrita por Ryu *et al.* (2004).

Las cepas bacterianas permanecieron en incubación 24 horas a 37 °C en viales de vidrio con caldo soya tripticaseína.

Se colocaron 3 mL de muestra en un vial de 20 mL con tapa de magnética y septum de teflón/silicón. La muestra fue agitada a 200 rpm y calentada a 50 °C durante 1 hora para su extracción con fibra de microextracción en fase sólida de 2 cm compuesta por PDMS/DVB/CAR (Supelco, Sigma Aldrich, California, EUA). La fibra fue desorbida térmicamente a 250 °C en el puerto de inyección en modo splitless de un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, California, EUA), acoplado a un detector de espectrometría de masas cuadrupolar modelo 5975C (Agilent Technologies).

4.5.2 Análisis de COV bacterianos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Se utilizó una columna capilar HP-5MS (60 m x 250 µm de diámetro, 0.25 µm de espesor de fase, Agilent Technologies). En cuanto al programa de temperatura del horno se estableció las siguientes condiciones: 40 °C por 3 min, para luego incrementar a 180 °C con una velocidad de 5 °C/min, un último incremento a 260 °C fue aplicado con una velocidad de 20 °C/min donde se mantuvo por 5 min. El gas de arrastre utilizado fue Helio (pureza 99.999 %), a flujo constante de 1 mL/min.

El detector de espectrometría de masas se utilizó en modo de impacto electrónico a 70 eV, con un Gain Factor de 1. Se configuraron las temperaturas de la siguiente manera: 280 °C para línea de transferencia, 230 °C en fuente de ionización y 150 °C en el cuadrupolo, además, se ajustó el rango de masas de 33 a 500 uma.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó a partir del espectro de masas obtenido, comparando con la base de datos NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versión 2017, USA.

4.6.4 Color

Para determinar los parámetros colorimétricos se utilizó un colorímetro CM-600d (Konica Minolta, Japón) utilizando un iluminante D65 y observador a 10°. Se tomaron mediciones de los valores L, a y b en dos zonas opuestas de la región ecuatorial de cada fruto. Estos valores L, a y b corresponden al espacio de color L*a*b*.

Para calcular el ángulo de tono (Hue) y la pureza del color (Croma) (Little, 1975) utilizando estos valores, se emplearon las fórmulas 4 y 5 respectivamente:

$$Hue = \tan^{-1}(b/a) \quad (4)$$

$$Croma = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad (5)$$

Además, la luminosidad L se obtuvo directamente con el colorímetro.

Estos cálculos permiten caracterizar el color de los frutos en términos del espacio de color L*a*b*, proporcionando información sobre la tonalidad, saturación y luminosidad de este.

4.6.5 °Brix

Los frutos de tomate se cortaron de manera longitudinal, se recolectaron tres gotas de jugo y se colocaron sobre la celda de un refractómetro digital HI 96801 (Hanna instruments, USA).

4.7 Ensayo de antagonismo *in vivo* por compuestos volátiles en fruto

Se realizaron ensayos de producción de volátiles en Agar Soya Trypticaseína (TSA) (Difco) para la evaluación de la capacidad de *Bacillus* spp. para reducir la infección en frutos causados por hongos.

Los tomates fueron desinfectados superficialmente mediante su sumergimiento en etanol (90%) por 5 minutos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% por 60 segundos y, después en etanol 70 % por 60 segundos; finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. Se hizo una punción en el eje del ecuador usando un tubo capilar de vidrio produciendo

una lesión de 2 mm de diámetro y 3 mm de profundidad de la superficie. En cada punción se inoculó 10 μL de una suspensión que contenía 1×10^3 esporas mL^{-1} de la cepa fúngica. El patógeno seleccionado para el ensayo fue *A. alternata* ya que presentó la mayor inhibición provocado por las cepas bacterianas en los ensayos duales y de placas invertidas. Además, por ser un patógeno de tomate, un fruto muy consumido en el país.

Luego, un recipiente y una gradilla plástica fueron tratados con etanol (90%) por 5 minutos, seguido de una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% v/v por 60 segundos y etanol 70% por 60 segundos; finalmente se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secando en una campana de flujo laminar con luz UV. Para el establecimiento del ensayo, se colocó en el fondo del recipiente placas TSA con la cepa bacteriana a ensayar, posteriormente se colocó la gradilla dentro del recipiente sobre la cual se colocaron los tomates inoculados (Figura 16). Las condiciones del ensayo se fijaron a temperatura ambiente de 30 °C durante 7 días. Posterior a los 7 días se midió la incidencia y el diámetro de la infección provocada por el hongo.

Se consideraron 5 frutos por unidad experimental, tomando como porcentaje de incidencia el número de frutos infectados luego de los 7 días fijados en el ensayo de exposición a volátiles.



Figura 13: Modelo de ensayo de antagonismo por compuestos volátiles en fruto. Un recipiente plástico mantiene los COV producidos por las cepas bacterianas sembradas en la parte inferior (medio TSA). En la parte superior se sitúa el fruto mantenido por una rejilla.

El porcentaje de inhibición fue medido de acuerdo con la Formula 4:

$$[(FC - FE)/FC] * 100 \quad (6)$$

- FC: Promedio del diámetro de la pudrición provocada por el hongo en el fruto
- FE: Medida del diámetro de la pudrición provocada por el hongo en el fruto

4.8 Análisis estadístico

Los datos expresados representan la media \pm desviación estándar de tres repeticiones en cada ensayo.

Los datos obtenidos fueron sujetos a prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico RStudio 4.1.3. Los datos obtenidos en porcentajes fueron transformados a grados angulares antes de realizar el ANOVA, expresando al final los resultados en la variable original.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayos duales

Para la exploración de presencia de compuestos difusibles antagonistas producidos por *Bacillus* spp. en el medio PDA, se evaluó el radio de inhibición causado por dichos compuestos hacia las diferentes especies fúngicas (Figura 17).

Los resultados muestran que Q39, Q38, Q37 y Q20 reflejan diferencia significativa de inhibición contra la mayoría de los hongos fitopatógenos, destacando el antagonismo contra *A. alternata* y *C. gloesporoides* (Tabla 6). Los porcentajes de inhibición más altos contra *A. alternata* se obtuvieron en los tratamientos Q39 (58.4%), Q38 (51.8%) y Q20 (50.6%). Respecto al antagonismo de *C. gloesporoides* los tratamientos que lograron mayor porcentaje de inhibición fueron Q38 (56.8%) y Q39 (55.6%). Por otra parte, los tratamientos con Q19 y Q11 no mostraron capacidades de inhibición contra ninguna especie fúngica.

Tabla 6. Porcentajes de inhibición de micelio activo en ensayos duales.

Porcentaje de inhibición en ensayo dual						
Cepa	Q39	Q38	Q37	Q20	Q19	Q11
<i>F. oxysporum</i>	49.1 ± 1.8 a	38.9 ± 8.3 ab	32.1 ± 1.1 b	41.0 ± 1.3 ab	6.4 ± 1.9 c	16.8 ± 1.8 d
<i>A. alternata</i>	58.4 ± 0.3 a	51.8 ± 2.8 ab	48.3 ± 3.0 b	50.6 ± 4.7 ab	24.6 ± 3.6 c	38.1 ± 2.3 d
<i>C. gloesporoides</i>	55.6 ± 3.0 a	56.8 ± 0.8 a	49.2 ± 4.1 a	39.1 ± 2.5 b	4.5 ± 1.6 c	30.0 ± 3.3 d
<i>R. solani</i>	47.7 ± 2.6 a	48.8 ± 0.3 a	46.1 ± 2.7 a	33.3 ± 3.3 b	7.6 ± 2.9 c	9.4 ± 1.0 c
<i>Phytophthora</i> spp.	41.6 ± 1.9 ab	46.1 ± 1.1 a	36.6 ± 2.4 b	39.1 ± 0.8 b	9.6 ± 1.0 c	7.0 ± 0.9 c
<i>S. rolfsii</i>	46.6 ± 2.8 a	46.4 ± 0.3 a	38.4 ± 0.6 a	42.2 ± 1.7 a	4.5 ± 3.0 b	17.2 ± 2.4 c

Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

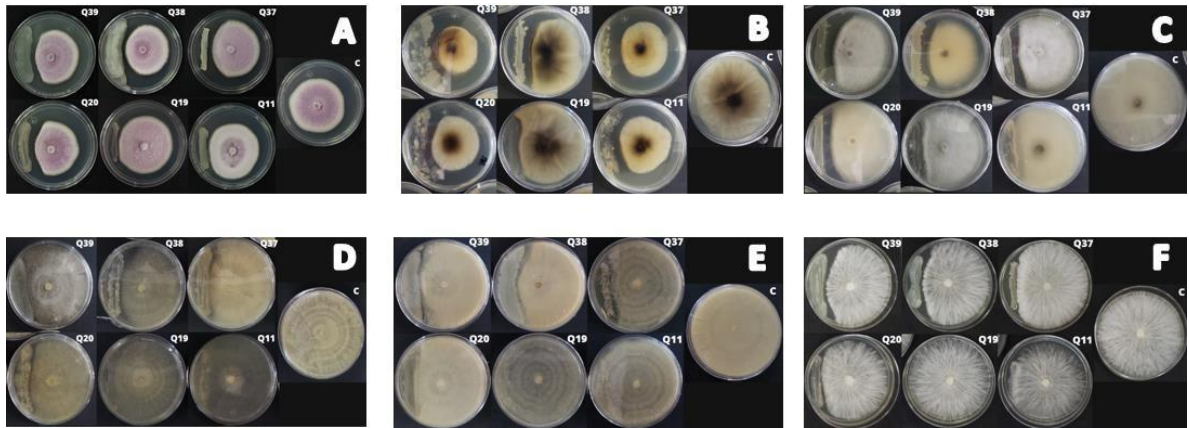


Figura 17. Ensayos duales de *Bacillus* contra *F. oxysporum* (A), *A. alternata* (B), *C. gloesporoides* (C), *R. solani* (D), *Phytophthora* spp. (E) y *S. rolfsii* (F).

Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas bacterianas, excepto Q19 y Q11, reflejaron capacidad de inhibición de crecimiento contra la mayoría de los hongos patógenos. Se ha reportado inhibición por cepas de *Bacillus* spp. contra estos patógenos en pruebas similares, en las cuales se ha adjudicado a compuestos lipopéptidicos (Qi *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020).

En adición, respecto a los mecanismos de acción se sabe que particularmente, la pared celular y el metabolismo de la membrana celular fúngica son los principales procesos afectados por el estrés provocado por lipopéptidos (D. Zhang, Qiang, Zhou, *et al.*, 2022) culminando finalmente en la inducción de apoptosis celular (Qi *et al.*, 2010) o lisis celular (D. Yu *et al.*, 2019).

La literatura sugiere que el modo de acción antifúngica de los compuestos lipopeptídicos se debe a su interacción con el ergosterol, el principal componente de la membrana celular fúngica. Es así, que se propicia la formación de complejos agregados de lipopéptido-fosfolípido o lipopéptido-fosfolípido-esterol que producen una modificación de espacial de fosfolípidos y esteroides, y finalmente la formación de grandes poros de conducción de iones en bicapas lipídicas que permiten la liberación de K^+ y otros compuestos intracelulares (Rodríguez *et al.*, 2019).

Por otro lado, en estudios anteriores, se ha demostrado que la presencia de grupos hidroxilo en esteroides es crucial para propiciar interacciones con

lipopéptidos. Dado que el grupo hidroxilo constituye la parte hidrófila de los esteroides, se sugiere una interacción por enlaces de hidrógeno entre este grupo con la parte hidrófila de los lipopéptidos constituida por la parte peptídica. Es así, que se ha reportado ausencia de actividad antifúngica de lipopéptidos como la micosubtilina cuando el grupo fenólico de su residuo tirosilo estaba metilado o acetilado. Dado esto, se sugiere que la incorporación de los lipopéptidos en las monocapas de ergosterol está fuertemente influenciada por la existencia del grupo hidroxilo en el ergosterol (Nasir & Besson, 2012).

Gracias a estos resultados nos permitió confirmar la capacidad de compuestos difusibles de inhibir el crecimiento de patógenos, por otro lado, estos compuestos serían confirmados como lipopéptidos mediante ensayos posteriores.

5.2 Ensayos de confrontación de placas invertidas

Para la exploración del efecto de biocontrol de los COV producidos por las cepas de bacterianas en los diferentes hongos patógenos, se evaluó el ensayo de confrontación de placas invertidas (Figura 18). Los resultados mostraron que todos los tratamientos antagonizaron notablemente a *A. alternata* y *S. rolfsii*, a excepción de la cepa Q20 la cual no logró inhibir a *A. alternata* (Tabla 7). Los porcentajes de inhibición más altos contra *A. alternata* se obtuvieron en los tratamientos Q19 (72.44%), Q38 (63.47%) y Q37 (60.58%). En cuanto a *S. rolfsii*, se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición en el tratamiento con Q11 (64.78), sin embargo, no hay diferencia estadística respecto a los tratamientos con Q39, Q38 y Q20. Por otro lado, el porcentaje de inhibición obtenido por aplicación de los tratamientos bacterianos a *F. oxysporum* y *R. solani* fue el más bajo, siendo que en los mejores tratamientos aplicados a estas cepas fúngicas se obtuvo 22.18% y 2.45% de inhibición, respectivamente.

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de micelio activo en ensayos de confrontación de placas invertidas.

Porcentaje de inhibición en ensayo de volátiles						
Cepa	Q39	Q38	Q37	Q20	Q19	Q11
<i>F. oxysporum</i>	10.3 ± 1.9 ac	22.2 ± 2.7 b	7.2 ± 2.9 ad	18.1 ± 3.5 bc	10.3 ± 1.9 ac	2.5 ± 1.7 d
<i>A. alternata</i>	55.6 ± 5.0 a	63.5 ± 5.3 ac	60.6 ± 3.6 ac	10.8 ± 6.2 b	72.4 ± 3.2 c	59.2 ± 3.8 ab
<i>C. Gloesporoides</i>	49.2 ± 4.9 a	36.2 ± 6.5 ac	20.6 ± 7.2 b	39.0 ± 5.2 ac	31.6 ± 4.8 bc	49.0 ± 4.7 a
<i>R. solani</i>	2.5 ± 0.8 a	2.4 ± 0.4 a	1.8 ± 0.6 a	3.0 ± 1.9 a	2.4 ± 1.0 a	1.8 ± 1.4 a
<i>Phytophthora</i> spp.	36.8 ± 2.4 ab	40.3 ± 1.0 a	33.8 ± 2.7 b	36.2 ± 2.5 b	32.7 ± 1.5 b	41.0 ± 1.9 a
<i>S. rolfsii</i>	56.9 ± 4.9 ab	56.0 ± 6.5 ab	53.0 ± 7.2 a	56.3 ± 5.2 ab	47.7 ± 4.8 a	64.8 ± 4.7 b

Los valores corresponden al promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

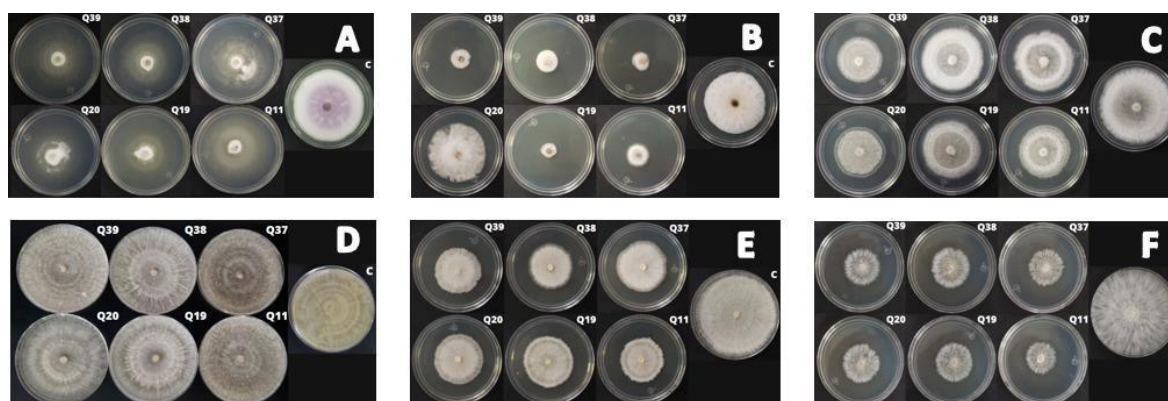


Figura 18. Ensayos de volátiles de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* (A), *A. alternata* (B), *C. gloesporoides* (C), *R. solani* (D), *Phytophthora* spp. (E). y *S. rolfsii* (F).

A diferencia de los tratamientos de ensayos duales, los COV segregados por las mismas cepas bacterianas solo lograron una inhibición significativa contra *A. alternata* y *S. rolfsii*. En contraste con los lipopéptidos, el mecanismo de inhibición de los COV de *Bacillus* spp. no se encuentra claro, sin embargo, se sabe que pueden inhibir la germinación de los conidios y afectar morfológicamente las hifas de hongos patógenos (Zhang *et al.*, 2020). También se ha reportado que los COV de *B. subtilis* modifica la regulación de la expresión de genes relacionados con la fluidez de la membrana celular, la integridad de la pared celular, el metabolismo energético y la producción de enzimas que degradan la pared celular (Wang *et al.*, 2021).

Los tratamientos óptimos para antagonizar las diferentes infecciones por hongos patógenos dependen de la especie fúngica. Sin embargo, destacan las cepas Q39, Q38 y Q37, las cuales lograron inhibiciones destacables de todos los patógenos tanto por difusión de lipopéptidos como por difusión de COVs. Exceptuando a *F. oxysporum* y *R. solani* en este último ensayo mencionado, dichas especies no lograron ser inhibidas por los COV de ninguna cepa bacteriana.

Sin embargo, actualmente carecemos de una comprensión precisa de cómo se detectan e interpretan los compuestos orgánicos volátiles (COV). No se han descubierto receptores específicos ni otros mecanismos responsables de la percepción de los COV en ninguno de los casos descritos. El mayor obstáculo es averiguar si los COV entran y se procesan en las células mediante métodos basados en receptores, si interactúan con la membrana celular para desencadenar una secuencia de eventos de transducción de señales, o si las células simplemente los absorben y los descomponen.

5.3 Identificación de las cepas de estudio mediante la secuenciación del gen 16S ribosomal

Para evaluar la relación filogenética se realizó un árbol filogenético utilizando la secuencia del gen 16s rRNA en Mega 11.0.13. Adicionalmente, se descargaron 21 secuencias de 16s de *Bacillus* y su número de identificación de la base de datos de NCBI.

Mediante el análisis de Bootstrap se simularon 100 muestreos de las secuencias de las cepas de estudio y las obtenidas en NCBI, de esta manera, poder determinar su similitud, y así, obtener el valor de confianza (Figura 19). Es así, que se pudieron determinar valores de confianza Bootstrap en relación con la similitud de las secuencias obtenidas y las extraídas de NCBI.

La relación filogenética entre la cepa Q11 y el género *Bacillus* es sugerida con un alto soporte Bootstrap (99). De la misma manera, las cepas Q37 y Q38 agrupadas en un mismo clúster sugieren una relación filogenética con el género *Bacillus* con un alto soporte Bootstrap (100). Por su parte, Q39 muestra relación filogenética con *Bacillus* con un valor de confianza Bootstrap de 91. Estos altos valores de confianza Bootstrap nos sugieren que al simular 100 muestreos y

compararlos, en la mayoría de estas comparaciones (>90) se encuentra una relación filogenética.

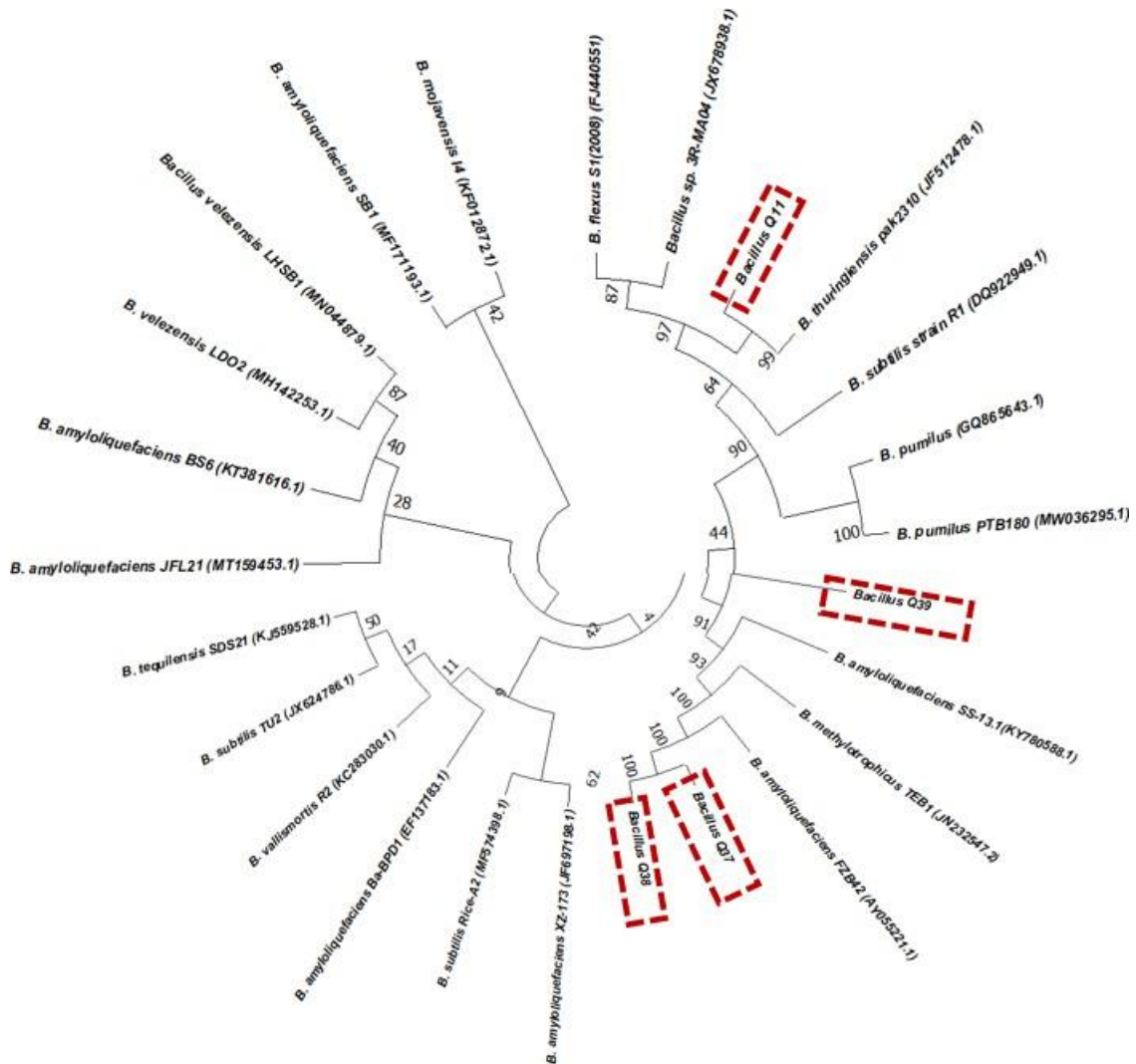


Figura 19. Árbol filogenético mediante el método neighbor-joining basado en el gen de 16s ribosomal. Los valores de confianza Bootstrap se generaron utilizando 100 permutaciones. Software Mega 11.0.13.

5.4 Detección de la producción de lipopéptidos

La producción de compuestos difusibles en el medio con capacidades hemolíticas se detectó en todas las cepas de *Bacillus* mediante el ensayo de hemólisis (Figura 20). Sin embargo, la hemólisis por compuestos producidos por las cepas bacterianas es más evidente en las cepas Q11, Q37, Q38 y Q39.

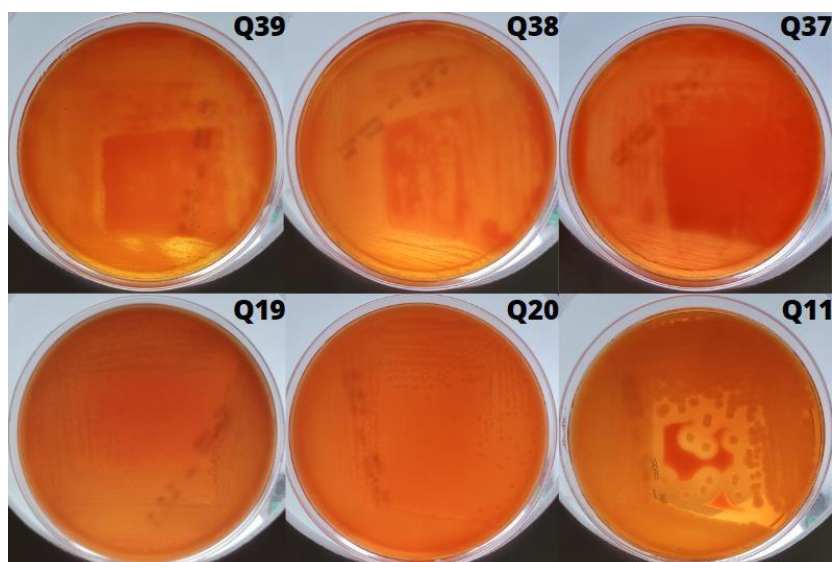


Figura 20. Hemólisis en placas de agar sangre causado por las cepas Q39, Q38, Q37, Q20, Q19 y Q11 después de 48 horas de incubación a 37 °C.

Aunque se ha reportado una asociación entre la actividad hemolítica y la producción de lipopéptidos (Płaza *et al.*, 2015; Sarwar, Brader, *et al.*, 2018), son necesarios estudios complementarios como FT-IR que lo confirmen.

En adición, respecto a los mecanismos de acción se sabe que particularmente, la pared celular y el metabolismo de la membrana celular fúngica son los principales procesos afectados por el estrés provocado por lipopéptidos culminando finalmente en la inducción de apoptosis o lisis celular. De igual manera, se sabe que el mecanismo de acción de lipopéptidos difiere dependiendo de su composición tanto peptídica como lipídica (Qi *et al.*, 2010; D. Yu *et al.*, 2019; D. Zhang *et al.*, 2022).

5.5 Extracción de lipopéptidos y análisis por FT-IR

Mediante el análisis del extracto crudo por FT-IR se identificó la presencia de la parte peptídica y lipídica de los lipopéptidos presentes (Figura 21). Priorizando de esta manera, las bandas de identificación del anillo lactona y enlaces peptídicos, al igual que las bandas de identificación de la parte hidrocarbonada formada por lípidos.

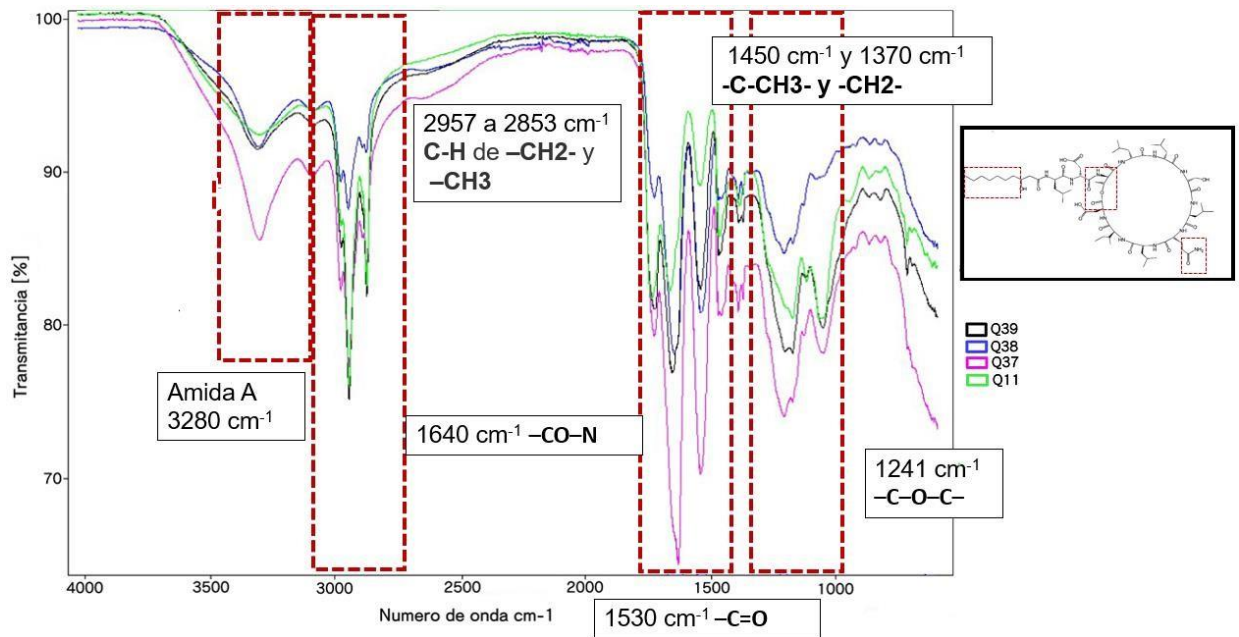


Figura 21. Espectros infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de la fracción lipopeptídica de las cepas *Bacillus* Q11(verde), Q37(rosa), Q38(azul) y Q39(negro).

Los espectros obtenidos a partir del lipopéptido crudo de las cepas Q11, Q37, Q38 y Q39 reflejaron diferentes bandas correspondientes a lipopéptidos. Al igual que Etemadzadeh & Emtiazi, (2021) se encontraron picos de amida A alrededor de 3280 cm^{-1} , dos picos en la región de $2957\text{ a }2853\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a la vibración de estiramiento del C-H. En Rodríguez et al., (2019) se encontraron picos de 1640 cm^{-1} asignados a vibraciones de estiramiento de C=O, además, se observaron picos de amida II alrededor de 1530 cm^{-1} asociada a la flexión de N-H y a la vibración de estiramiento de C-N en lipopéptidos provenientes de *Bacillus*. Se observa la presencia de grupos peptídicos y carboxílicos asociada a picos de enlace peptídico (Glassford *et al.*, 2013) en los rangos de $1241\text{ y }1172\text{ cm}^{-1}$ en lipopéptidos.

5.6 Identificación del perfil de volátiles producidos por las cepas de *Bacillus subtilis* por medio de SPME GC-MS.

Con el fin de identificar los COV con capacidad de inhibir los hongos patógenos ensayados, se analizaron cuatro de las cepas bacterianas (*Bacillus* Q11, Q37, Q38 y 39) debido a su capacidad inhibitoria en los ensayos de confrontación de placas invertidas. Es así, que los compuestos volátiles fueron

captados por microextracción en fase sólida, separados por cromatografía de gases e identificados por espectrometría de masas (SPME GC-MS) (Tabla 8).

Se encontró que para las cepas Q11 y Q39 las cetonas fueron la especie química con mayor presencia en cuanto a porcentaje relativo respecto al perfil total de volátiles, siendo este de 37.44 % y 63.63%, del cual el 30.24 % para *Bacillus* Q11 y el 53.04% para *Bacillus* Q39 corresponden a la 3-hidroxi, 2-butanona. Para las cepas *Bacillus* Q37 y *Bacillus* Q38 el 2,3-butanediol fue el compuesto presente en mayor porcentaje relativo, 30.25 y 28.14 % respectivamente. Las especies químicas predominantes en porcentaje relativo para las cepas *Bacillus* Q37 y *Bacillus* Q38 fueron los alcoholes con 63.98 % y 48.03 %, respectivamente.

Tabla 8. Contenido relativo de compuestos presentes en el perfil volátil de las diferentes cepas (Q11, Q37, Q38 y 39) de *Bacillus* a 24 h en caldo soya tripticaseína.

Contenido relativo (%)				
Compuesto	Q11	Q37	Q38	Q39
Alcoholes				
Etanol	10.17	-	-	-
1-octanol	-	-	-	0.67
2-octanol	-	-	-	1.65
2-nonanol	-	-	-	1.71
2-hexadecanol	-	-	-	1.18
2-tetradecanol	-	-	-	1.14
2-metil, 1-propanol	1.53	-	-	-
3-metil, 1-butanol	10.58	26.07	16.92	4.2
2,3-butanediol	-	30.25	28.14	-
3,3,5-trimetil ciclohexanol	-	-	2.16	-
2-(2-etoxietoxi) etanol	-	0.56	-	0.5
1-metil-1-silaciclopentan-1-ol	-	3.51	-	-
3-furanometanol	1.12	-	-	-
2,4,7,9-tetrametil, 5-deceni-4,7-diol	-	0.53	0.81	-
Alcohol feniletílico	-	3.07	-	2.38
Alcohol bencílico	-	-	-	1.46
Ácidos				
Ácido acético	7.77	3.67	3.25	0.89
Ácido 2-metil propanoico	4.06	-	-	-
Ácido 2-etil,2-metil propanoico	-	-	4.66	-
Ácido nonanoico	5.78	-	16.07	-
Ácido butanoico	0.64	-	-	-
Ácido de éster de isobutil hex-2-in-4-ilo ftálico	1.27	-	-	-
Ácido éster 6-tridecíl 2-fluoro-5-trifluorometilbenzoico	-	-	-	5.24
Ácido éster bis(trimetilsilil) etanodioico	-	-	-	0.73
Cetonas				

Acetona	7.16	-	-	-
3-hidroxi, 2-butanona	30.28	15.39	8.38	53.04
2-butanona	-	-	5.94	-
2,3-butanediona	-	-	-	6.74
2-nonanona	-	-	-	1.79
2-undecanona	-	-	-	0.73
1-(4-aminofenil) 1-propanona	-	-	-	1.32
Compuestos heterocíclicos				
1,3-Diazina	2.38	-	3.31	-
Metil beta-D-arabinopiranosido	6.24	-	-	-
2-etil, 6-metil pirazina	-	0.98	0.80	-
1-oxi, 3-butil piridina	-	-	0.71	-
Alcanos				
Pentano	6.34	9.74	-	-
Cloruro de metileno	-	-	0.87	-
Nonadecano	-	-	0.78	-
Octilciclopropano	-	-	-	-
Ésteres				
Dietilftalato	0.22	-	-	-
Duodecil ftalato	-	-	0.71	-
Butirato de butilo	-	5.77	-	-
Aromaticos				
Tolueno	-	0.47	-	-
2-metoxifenol	-	-	-	1.30
Alqueno				
Isopreno	-	-	6.49	-
Amida				
Ciclohexanocarboxilamida	-	-	-	2.97
Tiol				
Metanotiol	3.54	-	-	9.61
Otros compuestos				
Pentobarbital	0.92	-	-	-

En total se registraron 21 compuestos producidos por *Bacillus* Q39, 17 por *Bacillus* Q11, 16 por *Bacillus* Q38 y 12 por *Bacillus* Q37. Dentro de los compuestos encontrados predominan especies como alcoholes, ácidos y compuestos heterocíclicos, sin embargo, también se encontraron alquenos, amidas, cetonas, ésteres y tioles (Figura 22).

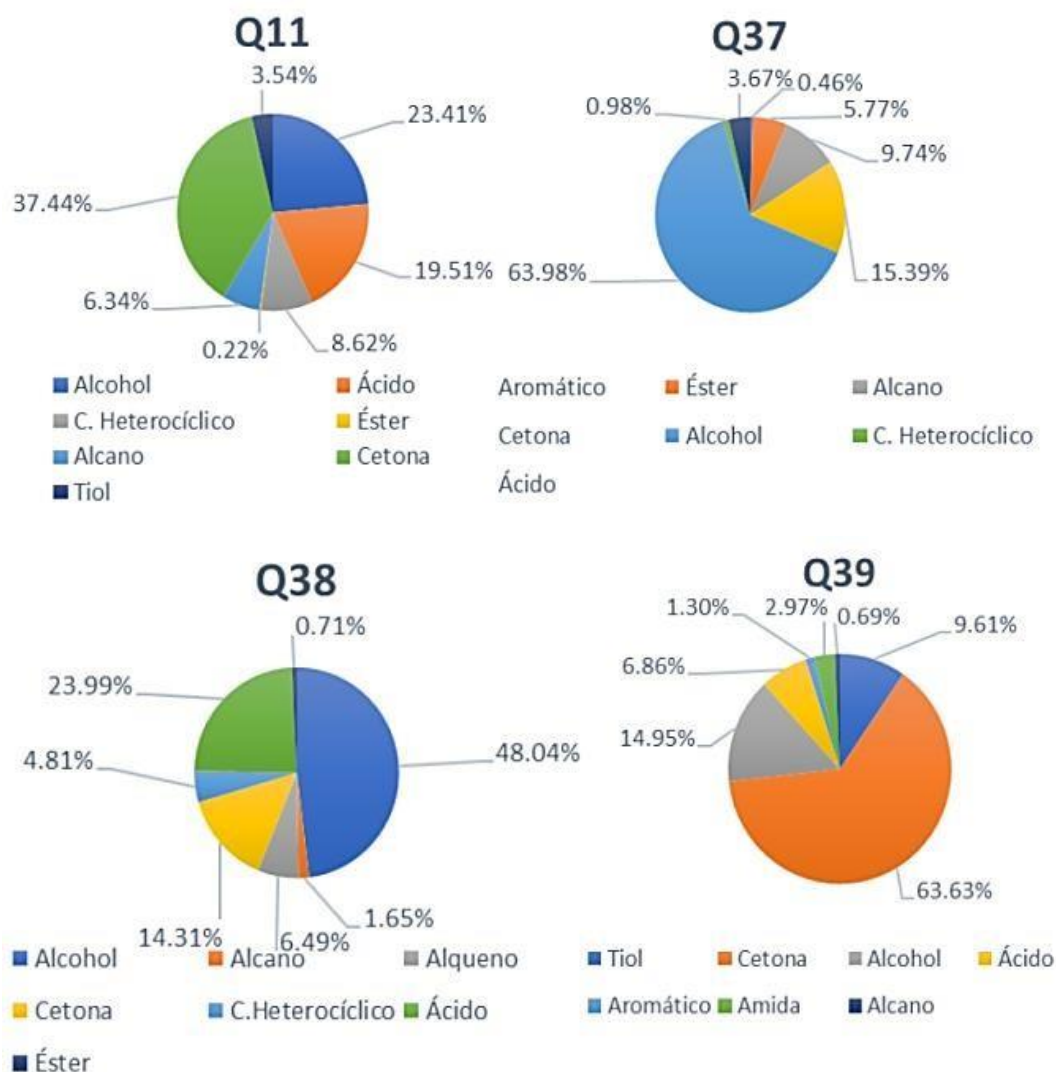


Figura 22. Contenido relativo de especies químicas presentes en el perfil volátil analizado de las cepas *Bacillus* Q11, Q37, Q38 y 39.

Adicionalmente, se encontraron similitudes en el perfil volátil de las cuatro cepas bacterianas, donde es posible observar que tanto el 3-metil, 1-butanol como la 3-hidroxi, 2-butanona se producen en las cuatro cepas bacterianas, aunque en distintas cantidades (Figura 23).

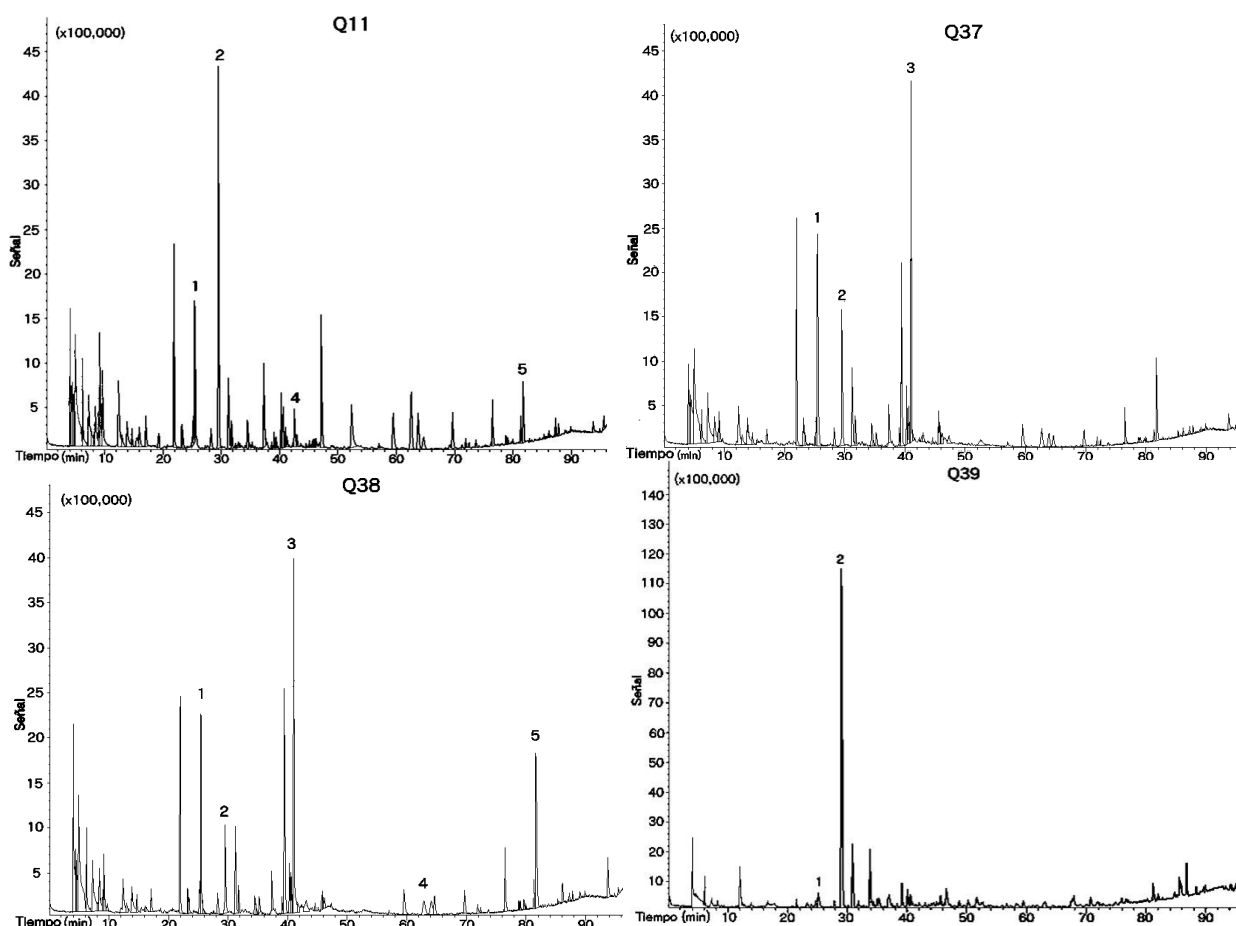


Figura 23. Cromatogramas de COVs producidos por las cepas de *Bacillus* Q11, Q37, Q38 y Q39 después de 24 horas de fermentación en CST. Los principales COVs se señalaron como (1) 3-metil, 1-butanol, (2) 3-hidroxi, 2-butanona, (3) 2,3-butanediol, (4) ácido 2-metil propanoico, (5) ácido nonanoico.

Inicialmente, los compuestos volátiles producidos por las cepas *Bacillus* Q11, Q37, Q38 y Q39 demostraron en ensayos *in vitro* capacidades inhibitorias contra los fitopatógenos *A. alternata* y *S. rolfsii* a diferencia de las cepas *Bacillus* Q19 y Q20. Gracias a esto, se ha podido constatar que algunos de los COV identificados en este estudio han sido ya reportados como productos del metabolismo de cepas de *Bacillus* spp. (Fujimoto *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022; Yi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

De esta manera, se conoce que el 3-metil, 1-butanol, al igual que el ácido 2-metil propanoico causan inhibición del crecimiento de especies patógenas como *M. pernicioso* (40.3 y 35.1%, respectivamente) y *F. oxysporum* (45.12 y 46.2%, respectivamente) (Chaves *et al.*, 2015). En adición, Fialho *et al.*, (2011) y Wang *et al.*, (2022) reportaron una inhibición completa de *S. sclerotium* y *B. cinérea*, respectivamente, por parte de 3-metil, 1-butanol. Además, en este

último estudio se reportaron inhibiciones entre 74.96 y 92.81% de otros 11 patógenos por parte de la misma cepa de estudio, donde *A. alternata* fue inhibida en un 86.07%.

Por otro lado, Arrebola *et al.*, (2010) registraron inhibiciones >50% hacia el patógeno *P. crustosum* relacionadas a la 3-hidroxi, 2-butanona producida por *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, donde el volátil represento el 45.98% y 97.52% del contenido relativo total, respectivamente. De igual manera, Fujimoto *et al.*, (2022) reportaron inhibiciones de hasta 86% hacia *Phyllosticta citricarpade* por parte de *Bacillus* spp. donde los perfiles volátiles incluyen producción de 3-hidroxi, 2-butanona, 1,3-butanediol y 3-metil, 1-butanol.

No obstante, en algunos COVs de distintas cepas de *Bacillus* spp. se han encontrado capacidades relevantes distintas a las del antagonismo de patógenos. Por ejemplo, los COV 3-hidroxi, 2-butanona y 1,3-butanediol se les han adjudicado promoción de crecimiento de plantas (Rath *et al.*, 2018), al igual que al ácido nonanoico (Lee *et al.*, 2016). Este último compuesto es, además, capaz de inhibir en un 75% la germinación de esporas de los patógenos *Crinipellis perniciososa* Stahel y *Moniliophthora roreri* Cif. H.C. Evans.

En cuanto a los mecanismos de acción, se sabe los COVs producen alteraciones morfológicas en hifas (C. Wang *et al.*, 2022), y micelio (Massawe *et al.*, 2018) causando inviabilidad en la célula fúngica. Además, se sabe que los COVs son capaces de inhibir la germinación de las esporas causando anomalías en la morfología y fluidez de la membrana, afectando mecanismos de transporte y fuerza protón motriz. Aunque, se sabe que los mecanismos de acción de cada COV son distintos unos de otros (K. Wang *et al.*, 2021; S. Xie *et al.*, 2020; D. Zhang *et al.*, 2020; D. Zhang, Qiang, Zhao, *et al.*, 2022; M. Zhou *et al.*, 2019), los mecanismos de acción de cada volátil siguen siendo inciertos.

Sin embargo, Zhou *et al.*, (2019) y K. Wang *et al.*, (2021) reportaron disminución en el contenido de ergosterol en la pared de celular de *M. fructicola* y *C. gloesporoides* por exposición a COVs de *B. subtilis*. De esta manera, se destruyó la pared celular del hongo e interfirieron en el funcionamiento normal de la membrana celular. Además, bajo producción de COV de *B. subtilis* Wang *et al.*, (2021) reportó regulación a la baja de genes que codifican la quitina sintasa, la glucanasa y algunas proteínas en *C. gloesporoides*, lo que también contribuyó a la inhibición del crecimiento. Asimismo, Zhang *et al.*, (2022)

reportaron regulaciones a la baja de los genes *slt2* y *wetA* de *A. solani* que intervienen en la vitalidad del micelio, la esporulación y la madurez conidial cuando este microorganismo se expone a COV de *B. subtilis*. Otros genes de virulencia regulados a la baja por tratamientos de COVs fueron reportados por Xie *et al.*, (2020), donde una cepa de *B. subtilis* reprimió los niveles de los *clk1*, *clm1*, *scd* y *brn1* en *Curvularia lunata*. Además, se registró una acumulación de especies reactivas de oxígeno en conidios de *Curvularia lunata* propiciada por COVs de la misma cepa bacteriana.

Estos resultados proporcionan una visión general de la interacción entre microorganismos y cómo actúan los COVs desde un punto de vista químico y biológico, siendo capaz, a través del antagonista, promover el biocontrol de aquellos fitopatógenos que afectan los frutos. Sin embargo, se requieren más estudios para investigar la eficiencia antifúngica de cada volátil y/o explorar el mecanismo o mecanismos involucrados.

5.7 Ensayo de antagonismo *in vivo* por compuestos volátiles en fruto.

De manera inicial, este ensayo se estandarizó determinando las características de madurez comercial de los frutos analizados, obteniendo que para los tomates ensayados las características fueron las expresadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores correspondientes a las características fisicoquímicas y de textura de tomates en etapa de madurez comercial

Lote	Características							
	Masa (g)	pH	Firmeza (N)	°Brix	AT (%)	Color		
						L	Hue	Croma
1	156.8 ± 15.5	4.7 ± 0.2	27.6 ± 3.04	3.7 ± 0.1	0.26 ± 0.02	39.67 ± 2.67	53.35 ± 2.98	27.33±2.28
2	155.8 ± 14.6	4.8 ± 0.1	22.9 ± 2.98	3.6 ± 0.2	0.28 ± 0.02	40.23 ± 1.98	54.64 ± 3.22	29.33±1.52
3	152.2 ± 12.3	5 ± 0.1	24.6 ± 2.01	3.8 ± 0.1	0.27 ± 0.01	38.73 ± 1.85	55.18 ± 2.42	29.39±1.37

Promedio de cinco repeticiones de lectura para cada lote de tomates utilizado en cada lote de repetición en ensayos de infección *in vivo* de volátiles en fruto. AT = Acidez titulable.

En este estudio se realizaron tres ensayos con tres réplicas cada uno. El primer ensayo (Figura 24) tenía por objeto evaluar las 4 cepas de *Bacillus* spp. (Q39, Q38, Q19 y Q11) que lograron inhibir en mayor medida *A. alternata* en los ensayos *in vitro*.

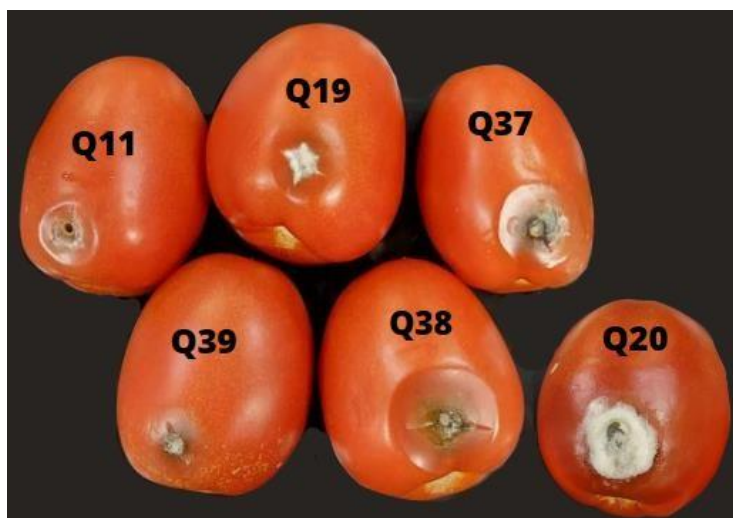


Figura 24. Primer ensayo *in vivo* para la evaluación de COVs de diferentes cepas de *Bacillus* contra *A. alternata* inoculada en tomate.

Mediante el primer ensayo se pudieron descartar como tratamiento las cepas bacterianas *Bacillus* Q20 y Q37, debido a sus bajos resultados en cuanto al antagonismo fúngico contra *A. alternata*.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo (Figura 25) donde mediante un escrutinio, se evaluaron las cepas *Bacillus* Q39 y Q11 ya que

presentaron mayores capacidades de inhibición contra *A. alternata* inoculada en tomates.



Figura 25. Segundo ensayo *in vivo* para la evaluación de COVs de diferentes cepas de *Bacillus* spp. contra *A. alternata* inoculada en tomate.

En el tercer ensayo (Figura 26), ambos tratamientos bacterianos mostraron capacidades de biocontrol de *A. alternata* en tomate (Tabla 10).



Figura 26. Tercer ensayo *in vivo* para la evaluación de COVs de las cepas Q11 y Q39 de *Bacillus* contra *A. alternata*.

La cepa *Bacillus* Q11 logró una reducción de la incidencia de la enfermedad de 27%, además, inhibiciones diametrales de 69.35% de los frutos infectados. Por otra parte, Q39 redujo la incidencia de *A. alternata* permitiendo que solo el 46% de los frutos se infectaran, de los cuales redujeron el tamaño de la lesión un 64.59%. Sin embargo, no hay diferencia significativa en ambos tratamientos respecto a la inhibición de la infección.

Por otro lado, es importante contrastar los resultados obtenidos con los controles donde no se inoculó ninguna cepa bacteriana. En dichos ensayos se obtuvo 100% de incidencia de la infección de *A. alternata* en los frutos.

Tabla 10. Ensayo de antagonismo de *A. alternata* por compuestos volátiles en frutos de tomate

Tratamientos (% de inhibición)		
Control	Q11	Q39
0	69.35 ± 7.8 A	64.59 ± 9.15 A
Incidencia		
100	73	46

Los datos fueron adjuntados tomando en cuenta el promedio \pm desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

Es de añadir que, aunque se carece de reportes de antagonismo de *A. alternata* en tomate mediante volátiles, estos resultados concuerdan con Jia *et al.*, (2023) quienes reportaron inhibiciones de 72.72% de éste patógeno en tomate mediante difusión de lipopéptidos provenientes de *B. amyloliquefaciens*.

Cabe resaltar que se encontró una correlación entre el antagonismo y la disminución de la incidencia de *A. alternata* y la producción de 3-hidroxi, butanona de las cepas *Bacillus* Q11 y Q39. De hecho, en Arrebola *et al.*, (2010) se registraron inhibiciones $>50\%$ hacia *Penicillium* spp. cuando el compuesto mayoritario producido por *Bacillus* spp. fue la 3-hidroxi, 2-butanona.

En general, en cuanto a plantas y frutos, se sabe que los COV microbianos pueden actuar de manera directa o indirecta en cuanto al antagonismo de patógenos. Induciendo de esta manera respuestas sistémicas, producción de ROS y de exudados radiculares antagonistas así como promoción de crecimiento de tallo y raíz. Tales resultados heterogéneos pueden ocurrir porque las interacciones de los microbios con los organismos receptores son complejas. Además, los COV microbianos actúan como señales multitróficas en sistemas ecológicamente complejos como plantas y frutos, que a su vez, no están bien estudiados o definidos hasta la fecha (Piechulla *et al.*, 2017).

Es inevitable destacar la influencia de los microorganismos en las plantas, de hecho, hay más de 10^{11} células bacterianas y 10^6 especies bacterianas en 1 g de suelo y aproximadamente 10^7 células bacterianas por cm^2 de área foliar (Farré-Armengol *et al.*, 2016). En comparación con las flores de las cuales se conocen alrededor de 2,500 compuestos volátiles (Knudsen *et al.*, 2006), solo se

han reportado aproximadamente 1,300 COV microbianos de solo 600 microorganismos registrados como productores de COV (Lemfack *et al.*, 2014).

Finalmente, estos resultados sientan una base preliminar para la clarificación de los lipopéptidos y COVs clave para el biocontrol de agentes fúngicos patógenos comunes. Además, proporcionan una base teórica para ampliar el abanico de opciones postulando cepas de *Bacillus* spp. cuyo valor posiblemente aporte en el campo del biocontrol de enfermedades. Sin mencionar, que la diversidad metabólica existente entre cepas candidatas brinda conocimiento de nuevas moléculas de origen microbiano con capacidades relevantes para el antagonismo de microorganismos causantes de enfermedades.

6 CONCLUSIONES

Se demostró que las cepas bacterianas estudiadas mostraron actividad antifúngica contra la mayoría de los patógenos, a excepción de *F. oxysporum* y *R. solani*. Se destacan las capacidades inhibitorias por segregación de lipopéptidos de las cepas *Bacillus* Q39 y Q38. No obstante, son necesarios más estudios para asegurar la composición que distingue a cada lipopéptido.

El análisis filogenético comprobó que todas las cepas bacterianas pertenecen al género *Bacillus* siendo necesario análisis más específicos para la determinación de su especie.

Por otro lado, la producción de los COV bacterianos provocó una mayor inhibición *in vitro* hacia *S. rolfisii* y *A. alternata* por parte de las cepas bacterianas, a excepción de *Bacillus* Q20. Aunque se registraron 21 compuestos producidos por *Bacillus* Q39, 17 por *Bacillus* Q11, 16 por *Bacillus* Q38 y 12 por *Bacillus* Q37; Las especies predominantes fueron alcoholes, ácidos y compuestos heterocíclicos. Sin embargo, no se descarta la producción de otros compuestos o la aparición de productos de oxidación de estos posterior a las 24 horas.

Mediante los ensayos de infección en fruto se identificó que los volátiles producidos por las cepas *Bacillus* Q11 y Q39 son capaces de inhibir a *A. alternata* inoculada en frutos de tomate. De esta manera, los resultados sugieren una correlación entre el biocontrol del patógeno y la producción de 3-hidroxi, 2-butanona por parte de la bacteria. Sin embargo, se destaca el potencial antagonico de *Bacillus* Q39 ya que fue la única cepa bacteriana con capacidad antagonica en las dos pruebas *in vitro* y la prueba *in vivo*. Por lo que resulta interesante realizar estudios posteriores referentes a la cepa *Bacillus* Q39, enfocados principalmente al aprovechamiento de su capacidad de producción de volátiles.

La utilización de lipopéptidos y COV resulta prometedora como alternativa para crear soluciones novedosas para el control de microorganismos fitopatógenos. De esta manera, evitar comprometer la calidad y la seguridad de

los productos agrícolas antes y después de la cosecha. Son necesarias más investigaciones para evaluar su aplicación, su impacto a largo plazo y su seguridad para los consumidores.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, M., De Boevre, M., Landschoot, S., De Saeger, S., Haesaert, G., & Audenaert, K. (2018). Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize. *Toxins*, *10*(12), 493. <https://doi.org/10.3390/toxins10120493>
- Akilli Şimşek, S., Katircioğlu, Y. Z., Ulubaş Serçe, Ç., Çakar, D., Rigling, D., & Maden, S. (2019). *Phytophthora* species associated with dieback of sweet chestnut in Western Turkey. *Forest Pathology*, *49*(4), e12533. <https://doi.org/10.1111/efp.12533>
- Akram, W., Anjum, T., & Ali, B. (2016). Phenylacetic acid is ISR determinant produced by *Bacillus fortis* IAGS162, which involves extensive re-modulation in metabolomics of tomato to protect against *Fusarium* wilt. *Frontiers in Plant Science*, *7*(APR2016), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00498>
- Albuquerque Andrade, D. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, *25*(2), 489–498. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Alzohairy, S. A., Hammerschmidt, R., & Hausbeck, M. K. (2020). Changes in winter squash fruit exocarp structure associated with age-related resistance to *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, *110*(2), 447–455. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0128-R>
- Amini, J., & Dzhalilov, F. S. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* F. SP. lycopersici associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, *50*(2), 172–178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>
- Arrebola, E., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, *53*(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>
- Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. *Ecological Complexity*, *49*, 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>
- Helrich, K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis the 15th edition* (Association).
- Azad, Z. R. A. A., Ahmad, M. F., & Siddiqui, W. A. (2019). Food spoilage and food contamination. In *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies* (pp. 9–28). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8_2
- Bacete, L., Mélida, H., Miedes, E., & Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, *93*(4), 614–636. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>
- Baldivia, A. S., & Ibarra, G. R. (2017). La disponibilidad de alimentos en México: Un análisis de la producción agrícola de 35 años y su proyección para 2050. *Papeles de Poblacion*, *23*(93), 207–230. <https://doi.org/10.22185/24487147.2017.93.027>
- Barreto, A., Paulus, S., Varrelmann, M., & Mahlein, A.-K. (2020). Hyperspectral

- imaging of symptoms induced by *Rhizoctonia solani* in sugar beet: comparison of input data and different machine learning algorithms. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(4), 441–451. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00344-8>
- Basi-Chipalu, S., Sthapit, P., & Dhital, S. (2022). A review on characterization, applications and structure-activity relationships of *Bacillus* species-produced bacteriocins. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 16(2), 55–62. <https://doi.org/10.5582/ddt.2021.01087>
- Baysal, O., Lai, D., Xu, H.-H., Siragusa, M., Carimi, F., Teixeira Da Silva, J. A., & Tö, M. (2013). A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>
- Betancourth-García, C. A., Castro-Caicedo, B. L., Quiroz-Ojeda, C., Sañudo-Sotelo, B., Florez-Casanova, C., & Salazar-González, C. (2021). Morphology and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Kühn associated with potato black scurf in Nariño (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 15(1), 0–3. <https://doi.org/10.17584/rcch.2021v15i1.11821>
- Beyene, S., Berhanu, W., Endalkachew, A., Meskel, W., Assefa, M., Hidoto, L., Tena, W., Dedefo, T., Ayana, R., & Fikre, A. (2015). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) production in the southern nations, Nationalities, and Peoples' Region of Ethiopia. *December*, 37.
- Bhar, A., Chakraborty, A., & Roy, A. (2021). Plant responses to biotic stress: Old memories matter. *Plants*, 11(1), 84. <https://doi.org/10.3390/plants11010084>
- Bist, N. S., & Bist, P. (2020). Role of microorganisms in post-harvest loss of agricultural products: a Review. *Sustainability in Food and Agriculture*, 2(1), 01–04. <https://doi.org/10.26480/sfna.01.2021.01.04>
- Bouchard-Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Thuy An Nguyen, T., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, 104925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>
- Broggi, L. E., González, H. H. L., Resnik, S. L., & Pacin, A. (2007). *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 47–51. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70012-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70012-8)
- Carmona Vivas, L. E. (2017). El manejo integrado de plagas (MIP) : Perspectivas e importancia de su impacto en nuestra región. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2), 67–69.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(302), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*, 160(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.013>
- Chaves, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Stellarini, A., Corsetti, A., & Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of*

- Applied Microbiology*, 119(2), 487–499. <https://doi.org/10.1111/jam.12847>
- Chopra, L., Singh, G., Jena, K. K., Verma, H., & Sahoo, D. K. (2015). Bioprocess development for the production of sonorenin by *Bacillus sonorensis* MT93 and its application as a food preservative. *Bioresource Technology*, 175, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.105>
- Choub, V., Won, S. J., Ajuna, H. B., Moon, J. H., Choi, S. I., Lim, H. I., & Ahn, Y. S. (2022). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Horticulturae*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060557>
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Cristóbal-martínez, A. L., & Jesús, M. De. (2016). Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. November 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>
- D'Alessandro, M., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J., et al. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, Cell and Environment*, 37, 813–826. <https://doi.org/10.1111/pce.12220>
- Dnh, Y. K., Hj, T. T., Id, J. S., & Bdid, S. S. J. (2004). Alternaria fruit rot of melon caused by *Alternaria alternata*. *RES. BULL. PL. PROT. JAPAN*. 155(40), 153–155. Recuperado en 12 de junio de 2022, de https://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/r_bulletin/pdf/rb040_026.pdf
- Egel, D. S., Adkins, S. T., Wintermantel, W. M., Keinath, A. P., D'Arcangelo, K. N., Parada-Rojas, C. H., Rennberger, G., Toporek, S. M., Hausbeck, M. K., & Quesada-Ocampo, L. M. (2020). Diseases of cucumbers, melons, pumpkins, squash, and watermelons BT. In W. H. Elmer, M. McGrath, & R. J. McGovern (Eds.), *Handbook of Vegetable and Herb Diseases* (pp. 1–105). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35512-8_33-1
- Etemadzadeh, S. S., & Emtiazi, G. (2021). In vitro identification of antimicrobial hemolytic lipopeptide from halotolerant *Bacillus* by Zymogram, FTIR, and GC mass analysis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(5), 666–674. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.53419.12022>
- F. Li, M. Tang, X. Tang, W. Sun, J. Gong, Y. Y. (2019). *Bacillus subtilis*-*Arabidopsis thaliana*: a model interaction system for studying the role of volatile organic compounds in the interchange between plants and bacteria. *Botany*, 97, 661–669. <https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0093>
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., & Peñuelas, J. (2016). Bidirectional interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions. *Trends in Plant Science*, 21(10), 854–860. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.005>
- Ferrucho, R. L., Cifuentes, J. M., Ceresini, P., & García-Domínguez, C. (2012). *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 204–213.
- Fialho, M. B., de Moraes, M. H. D., Tremocoldi, A. R., & Pascholati, S. F. (2011). Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(2), 137–142. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000200004>

- Fincheira, P., Venthur, H., Mutis, A., Parada, M., & Quiroz, A. (2016). Growth promotion of *Lactuca sativa* in response to volatile organic compounds emitted from diverse bacterial species. *Microbiological Research*, *193*, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.008>
- Fujimoto, A., Augusto, F., Fill, T. P., Moretto, R. K., & Kupper, K. C. (2022). Biocontrol of *Phyllosticta citricarpa* by *Bacillus* spp.: biological and chemical aspects of the microbial interaction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(3), 53. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03214-z>
- Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., & Guan, W. (2018). Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>
- Gao, H., Xu, X., Zeng, Q., & Li, P. (2017). Optimization of headspace solid-phase microextraction for GC-MS analysis of volatile compounds produced by biocontrol strain *Bacillus subtilis* CF-3 using response surface methodology. *Food Science and Technology Research*, *23*(4), 583–593. <https://doi.org/10.3136/fstr.23.583>
- Gardner, D. W. M., & Shama, G. (1998). The kinetics of *Bacillus subtilis* spore inactivation on filter paper by u.v. light and u.v. light in combination with hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology*, *84*(4), 633–641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00391.x>
- Garibaldi, A., Gilardi, G., & Gullino, M. L. (2004). Seed transmission of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. *Phytoparasitica*, *32*(1), 61–65. <https://doi.org/10.1007/BF02980861>
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, *117*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1834*(12), 2849–2858. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>
- Go, W. Z., H'ng, P. S., Wong, M. Y., Chin, K. L., Ujang, S., & Noran, A. S. (2019). Evaluation of *Trichoderma asperellum* as a potential biocontrol agent against *Rigidoporus microporus* *Hevea brasiliensis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *52*(7–8), 639–666. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1587821>
- Gonçalves, D. C., Tebaldi de Queiroz, V., Costa, A. V., Lima, W. P., Belan, L. L., Moraes, W. B., Pontes Póvoa Iorio, N. L., & Corrêa Póvoa, H. C. (2021). Reduction of *Fusarium* wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Crop Protection*, *141*, 105487. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2020.105487>
- González, A. (2013). Sclerotium rolfsii, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. *Tecnología Agroalimentaria: Boletín Informativo*. 19–20. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4229393&orden=396175&info=link>
- Guevara-Avedaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., Sánchez-Rangel, D., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A., & Reverchon, F. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against

- Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*, 219, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.009>
- Guo, L. W., Wu, Y. X., Ho, H. H., Su, Y. Y., Mao, Z. C., He, P. F., & He, Y. Q. (2014). First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. 162, 272–275. <https://doi.org/10.1111/jph.12183>
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., & Vaquera-Huerta, H. (2003). Resistencia a Benomil y Tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en Cinco Regiones de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 260–266.
- Haapalainen, M., Latvala, S., Kuivainen, E., Qiu, Y., Segerstedt, M., & Hannukkala, A. O. (2016). *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. *Plant Pathology*, 65(8), 1310–1320. <https://doi.org/10.1111/ppa.12521>
- Haddad, N., Wang, J., & Mu, B. (2009). Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein & Peptide Letters*, 16(1), 7–13. <https://doi.org/10.2174/092986609787049358>
- Haghiri, M. (2016). Consumer choice between food safety and food quality: The case of farm-raised Atlantic salmon. *Foods*, 5(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods5020022>
- Héloir, M.-C., Adrian, M., Brulé, D., Claverie, J., Cordelier, S., Daire, X., Dorey, S., Gauthier, A., Lemaître-Guillier, C., Negrel, J., Trdá, L., Trouvelot, S., Vandelle, E., & Poinssot, B. (2019). Recognition of elicitors in grapevine: from MAMP and DAMP perception to induced resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01117>
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66–74. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a9.pdf>
- Hernández-Morales, A., Martínez-Peniche, R. A., Arvizu-Gómez, J. Izzeta, Arvizu-Medrano, S. M., Rodríguez-Ontiveros, A., Ramos-López, M. A., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2018). Production of a mixture of fengycins with surfactant and antifungal activities by *Bacillus* sp. MA04, a versatile PGPR. *Indian Journal of Microbiology*, 58(2), 208–213. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0711-7>
- Hong, S., Kim, T. Y., Won, S. J., Moon, J. H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S. (2022). Control of fungal diseases and fruit yield improvement of strawberry using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>
- Huerta-palacios, G., Tropical, D. D. E., Holguín-meléndez, F., Benítez-camilo, F. A., Ecosur, P., Toledo-arreola, J., Tropical, D. D. E., Colegio, E., Frontera, D., Ecosur, S., Antiguo, C., & Correspondencia, M. C. P. (2009). Epidemiología de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. 93–105.
- INEGI. (2019). *Agricultura*. Encuesta Nacional Agropecuaria.

- <https://www.inegi.org.mx/temas/agricultura/>
- Ishizuka, M. S., Castro, R. R. L. de, Moraes, M. H. D. de, & Menten, J. O. M. (2020). Effect of chemical and biological seed treatments on common bean seeds inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 87, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000702018>
- Jacques, P. (2011). Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In G. Soberón-Chávez (Ed.), *Biosurfactants: From Genes to Applications* (Springer, pp. 57–91). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5>
- Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2021). Perspectives on Nitrogen-Fixing *Bacillus* Species BT. In C. Cruz, K. Vishwakarma, D. K. Choudhary, & A. Varma (Eds.), *Soil Nitrogen Ecology* (pp. 359–369). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-71206-8_18
- Jamali, H., Sharma, A., Roohi, & Srivastava, A. K. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 60(3), 268–280. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900347>
- Jenny, F., Sultana, N., Islam, M. M., Bhuiyan, M. M. K., & B., M. A. (2019). A review on anthracnose of mango caused by *Colletotrichum* a review on anthracnose of mango caused by *Colletotrichum*. *Bangladesh J. Plant Pathol*, 35(1&2)(October 2020), 65–74.
- Jia, Q., Fan, Y., Duan, S., Qin, Q., Ding, Y., Yang, M., Wang, Y., Liu, F., & Wang, C. (2023). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic Acid. *Toxins*, 15(1), 53. <https://doi.org/10.3390/toxins15010053>
- Jiang, C. H., Xie, Y. S., Zhu, K., Wang, N., Li, Z. J., Yu, G. J., & Guo, J. H. (2019). Volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. JC03 promote plant growth through the action of auxin and strigolactone. *Plant Growth Regulation*, 87(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-00473-z>
- Kanetis, L., Tsimouris, D., & Christoforou, M. (2016). Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf in Cyprus. *Plant Disease*, 100(8), 1591–1598. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1238-RE>
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., & Palou, L. (2010). Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Protection*, 29(8), 903–906. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.03.010>
- Kashyap, B. K., Solanki, M. K., Pandey, A. K., Prabha, S., Kumar, P., & Kumari, B. (2019). *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A promising green agriculture technology BT - plant health under biotic stress. In R. A. Ansari & I. Mahmood (Eds.), *Microbial Interactions* (pp. 219–236). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_11
- Kim, J. S., Lee, J., Lee, C. H., Woo, S. Y., Kang, H., Seo, S. G., & Kim, S. H. (2015). Activation of pathogenesis-related genes by the *Rhizobacterium*, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *Plant Pathology Journal*, 31(2), 195–201. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2014.0122>
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, 72(March), 1–120. [10.1663/0006-8101\(2006\)72\[1:DADOFs\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFs]2.0.CO;2)
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019a). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(July), 1–19.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019b). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kong, W.-L., Rui, L., Ni, H., & Wu, X.-Q. (2020). Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 against *Colletotrichum gloeosporioides* in *Liriodendron chinense* × *tulipifera*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01114>
- Kottb, M., Gigolashvili, T., Großkinsky, D. K., & Piechulla, B. (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: From inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>
- Kou, L. (2014). First report of *Atternairea tenuissima* causing postharvest decay on apple fruit from cold storage in the United States (Issue February 2013). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0802-PDN>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., de Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Querol, A., ... Herman, L. (2023). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*, *21*(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7747>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *128*, 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.01.002>
- Kwon, J.-H. (2010). Stem rot of garlic (*Allium sativum*) caused by *Sclerotium rolfsii*. *Mycobiology*, *38*(2), 156. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.2.156>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Latinović, N., Radišek, S., Latinović, J. (2014). First report of *Alternaria alternata* causing fruit rot on fig (*Ficus carica*) in Montenegro. *98*(3), 424. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0770-PDN>
- Lazazzara, V., Perazzolli, M., Pertot, I., Biasioli, F., Puopolo, G., & Cappellin, L. (2017). Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four *Lysobacter* type strains. *Microbiological Research*, *201*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2017.04.015>
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, *3*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., & Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *48*(1), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.024>
- Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., & Piechulla, B. (2014).

- MVOC: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 744–748. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>
- Li, J., Mao, L., Zhang, Y., Zhang, L., & Jiang, H. (2018). Phytochemical changes in mango fruit in response to *Alternaria alternata* infection. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(3), 227–232. <https://doi.org/10.17221/328/2017-CJFS>
- Li, Q., Wu, L., Hao, J., Luo, L., Cao, Y., & Li, J. (2015). Biofumigation on post-harvest diseases of fruits using a new volatile-producing fungus of *Ceratocystis fimbriata*. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132009>
- Li, W., Ren, L., Li, Q., Zhang, D., Jin, X., Fang, W., Yan, D., Li, Y., Wang, Q., & Cao, A. (2023). Evaluation of ethylcin as a potential soil fumigant in commercial tomato production in China. *Science of The Total Environment*, 854, 158520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158520>
- Li, X. Y., Mao, Z. C., Wu, Y. X., Ho, H. H., & He, Y. Q. (2015). Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Science and Technology*, 25(2), 132–143. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.960809>
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>
- Little, A. C. (1975). A research note off on a tangent. *Journal of Food Science*, 40(2), 410–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb02213.x>
- Maraite, H., & Meyer, J. A. (1971). Systemic fungitoxic action of benomyl against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis in vivo. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 77(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF01976392>
- Marcou, S., Wikström, M., Ragnarsson, S., Persson, L., & Höfte, M. (2021). Occurrence and anastomosis grouping of *Rhizoctonia* spp. Inducing black scurf and greyish-white felt-like mycelium on carrot in sweden. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050396>
- Massawe, V. C., Hanif, A., Farzand, A., Mburu, D. K., Ochola, S. O., Wu, L., Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., & Gao, X. (2018). Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 108(12), 1373–1385. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0118-R>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- McNeely, D., Chanyi, R. M., Dooley, J. S., Moore, J. E., and Koval, S. F. (2017). Biocontrol of *Burkholderia cepacia* complex bacteria and bacterial phytopathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Can. J. Microbiol*, 63, 350–358. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0612>
- Meldau, D. G., Meldau, S., Hoang, L. H., Underberg, S., Wünsche, H., & Baldwin, I. T. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *Plant Cell*, 25(7), 2731–2747. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114744>
- Mema, V., Martín, M., & Barrera, V. (2020). Hongos y bacterias antagonistas de fitopatógenos. In Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Ed.),

- Control biológico de plagas en horticultura: Experiencias argentinas de las últimas tres décadas* (pp. 285–309).
- Menzies, J., & Jarvis, W. (1994). The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*, 43(2), 378–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb02699.x>
- Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S. K., & Arora, N. K. (2020). Microbial enzymes in biocontrol of phytopathogens. In *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. (pp. 259–285). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10
- Mongkolthanaruk, W. (2012). Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1597–1604. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04013>
- Montejano-Ramírez, V., & Valencia-Cantero, E. (2023). Cross-talk between iron deficiency response and defense establishment in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076236>
- Mora, J., Ríos, E., Yáñez, M., Rebollar, A., Nava, C., Leyva, S., Sandoval, J., & Tovar, J. (2021). Sensitivity to MBC fungicides and prochloraz of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex isolates from mango orchards in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2), 481–491. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00412-z>
- Morris, P. F., Connolly, M. S., & St Clair, D. A. (2000). Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research*, 104(3), 286–292. <https://doi.org/10.1017/S0953756299008758>
- Moura, D. R., Yamada, J. K., de Albuquerque, L. C., & de Carvalho Pontes, N. (2020). Crop rotation reduces the density of volunteer plants in processing tomato fields and the inoculum of bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 299–304. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01868-y>
- Muzhinji, N., Woodhall, J. W., Truter, M., & Van Der Waals, J. E. (2018). Variation in fungicide sensitivity among *Rhizoctonia* isolates recovered from potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 102(8), 1520–1526. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1470-RE>
- Nasir, M. N., & Besson, F. (2012). Interactions of the antifungal mycosubtilin with ergosterol-containing interfacial monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(5), 1302–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.01.020>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020., 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., & Uppalapati, S. R. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. February, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Niu, D., Wang, X., Wang, Y., Song, X., Wang, J., Guo, J., & Zhao, H. (2016). *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1-and SA-dependent signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(1), 120–125. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.11.081>
- Pathak, K. V., & Keharia, H. (2014). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial

- roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, *4*(3), 283–295. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0151-3>
- Perelló, A., Moreno, M., & Sisterna, M. (2008). *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology*, *57*(2), 379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01713.x>
- Petkar, A., & Ji, P. (2017). Infection courts in watermelon plants leading to seed infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. Niveum. *Phytopathology*, *107*(7), 828–833. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0429-R>
- Pi, H., & Helmann, J. D. (2018). Genome-wide characterization of the fur regulatory network reveals a link between catechol degradation and bacillibactin metabolism in *Bacillus subtilis*. *MBio*, *9*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01451-18>
- Piechulla, B., Lemfack, M. C., & Kai, M. (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant Cell and Environment*, *40*(10), 2042–2067. <https://doi.org/10.1111/pce.13011>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(May), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Płaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K., & Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *Journal of Applied Microbiology*, *119*(4), 1023–1034. <https://doi.org/10.1111/jam.12893>
- Poveda, J. (2021). Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MVOCs) in plants. *Applied Soil Ecology*, *168*, 104118. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104118>
- Poveda, J., Calvo, J., Barquero, M., & González-Andrés, F. (2022). Activation of sweet pepper defense responses by novel and known biocontrol agents of the genus *Bacillus* against *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, *164*(4), 507–524. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02575-x>
- Prakash, J., & Arora, N. K. (2021). Novel metabolites from *Bacillus safensis* and their antifungal property against *Alternaria alternata*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *114*(8), 1245–1258. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01598-4>
- Pretali, L., Bernardo, L., Butterfield, T. S., Trevisan, M., & Lucini, L. (2016). Botanical and biological pesticides elicit a similar induced systemic response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*, *130*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>
- Qi, G., Zhu, F., Du, P., Yang, X., Qiu, D., Yu, Z., Chen, J., & Zhao, X. (2010). Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. *Peptides*, *31*(11), 1978–1986. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.003>
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *50*(May), 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Rabinal, C., & Bhat, S. (2020). Identification of differentially expressed genes in *Trichoderma koningii* IABT1252 during its interaction with *Sclerotium rolfsii*. *Current Microbiology*, *77*(3), 396–404. <https://doi.org/10.1007/s00284-019->

- Rajer, F. U., Wu, H., Xie, Y., Xie, S., Raza, W., Tahir, H. A. S., & Gao, X. (2017). Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(4), 523–530. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000451>
- Raquel, S., Moraes, G., André, F., Tanaka, O., Sidnei, N., & Júnior, M. (2013). Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 657–664. doi:10.1590/S0100-29452013000200039
- Rath, M., Mitchell, T. R., & Gold, S. E. (2018). Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. *Microbiological Research*, 208(August 2017), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.014>
- Raza, W., & Shen, Q. (2020). Volatile organic compounds mediated plant-microbe interactions in soil. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 209–219). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00018-3>
- Rodríguez-Chávez, J. L., Juárez-Campusano, Y. S., Delgado, G., & Pacheco Aguilar, J. R. (2019). Identification of lipopeptides from *Bacillus* strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.011>
- Rodríguez, J., Juárez, Y., Delgado, G., & Pacheco, J. (2019). Identification of lipopeptides from *Bacillus* strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. *Postharvest Biology and Technology*, 155(May), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.011>
- Román, S., Ojeda-Granados, C., & Panduro, A. (2013). Genética y evolución de la alimentación de la población en México. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(1), 42–51.
- Romano, A., Vitullo, D., Senatore, M., Lima, G., & Lanzotti, V. (2013). Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *Journal of Natural Products*, 76(11), 2019–2025. <https://doi.org/10.1021/np400119n>
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. In *Communicative and Integrative Biology* 3(2), 130–138. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.10584>
- Ruffner, B., Rigling, D., & Schoebel, C. N. (2019). Multispecies *Phytophthora* disease patterns in declining beech stands. *Forest Pathology*, e12514. <https://doi.org/10.1111/efp.12514>
- Ruiz-Sánchez, Esaú, Mejía-Bautista, Miguel Ángel, Cristóbal-Alejo, Jairo, Valencia-Botín, Alberto, & Reyes-Ramírez, Arturo. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1325-1332. Recuperado en 07 de agosto de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000700015&lng=es&tlng=es.
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W.

- (2004). *Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 134(3), 1017-1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Ryu, M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. 8, 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0732813100>
- SADER. (2022). *Buenas prácticas agrícolas en pro de la agricultura y el medio ambiente*. La aplicación de buenas prácticas agrícolas facilita el desarrollo de la agricultura sostenible enfocada a la seguridad alimentaria y a la ordenación de los recursos naturales. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/buenas-practicas-agricolas-en-pro-de-la-agricultura-y-el-medio-ambiente?tab=#:~:text=Las buenas prácticas agrícolas en campo inician desde,así como de las instalaciones sanitarias%2C entre otras>.
- Sanches, L. (2020). Mecanismos de quorum sensing y quorum quenching del linaje tóxico de *Lysinibacillus sphaericus*: importancia celular, ecológica y biotecnológica [Universidad de los Andes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/49225/u833986.pdf?sequence=1>
- Sánchez-López, Á. M., Baslam, M., De Diego, N., Muñoz, F. J., Bahaji, A., Almagro, G., Ricarte-Bermejo, A., García-Gómez, P., Li, J., Humplík, J. F., Novák, O., Spíchal, L., Doležal, K., Baroja-Fernández, E., & Pozueta-Romero, J. (2016). Volatile compounds emitted by diverse phytopathogenic microorganisms promote plant growth and flowering through cytokinin action. *Plant Cell and Environment*, 39(12), 2592–2608. <https://doi.org/10.1111/pce.12759>
- Santos, J. E. de Á., de Brito, M. V., Pimenta, A. T. Á., da Silva, G. S., Zocolo, G. J., Muniz, C. R., de Medeiros, S. C., Grangeiro, T. B., Lima, M. A. S., & da Silva, C. de F. B. (2023a). Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03509-9>
- Santos, J. E. de Á., de Brito, M. V., Pimenta, A. T. Á., da Silva, G. S., Zocolo, G. J., Muniz, C. R., de Medeiros, S. C., Grangeiro, T. B., Lima, M. A. S., & da Silva, C. de F. B. (2023b). Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 60. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03509-9>
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M. A., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PloS One*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107>
- Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, 209, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>
- Sass, G., Ansari, S. R., Dietl, A.-M., Déziel, E., Haas, H., & Stevens, D. A. (2019). Intermicrobial interaction: *Aspergillus fumigatus* siderophores protect against competition by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 14(5),

- e0216085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216085>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3(3), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Chilli Anthracnose : The Epidemiology and Management. 7(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01527>
- Schmidt, M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Recent advances in physical post-harvest treatments for shelf-life extension of cereal crops. *Foods*, 7(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/foods7040045>
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>
- Seefeldt, K. E., & Weimer, B. C. (2000). Diversity of sulfur compound production in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 83(12), 2740–2746. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75168-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75168-X)
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.605195>
- Sharma, G., Maymon, M., & Freeman, S. (2017). Epidemiology , pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports*, November, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15946-w>
- Shirsole, S. S., Khare, N., Lakpale, N., & Kotasthane, A. S. (2019). Evaluation of fungicides against *Sclerotium rolfsii* Sacc. Incitant of collar rot of chickpea. ~ 310 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 8(12), 310–316. <http://www.thepharmajournal.com>
- Shrivastava, P., Kumar, R., & Yandigeri, M. S. (2017). In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.12.004>
- SIAP. (2016). *Producción agrícola*. Servicio de Información Agrícola y Pecuaria. <http://www.siap.org>
- SIAP. (2021). *El SIAP presenta: Expectativas agroalimentarias 2021*. <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/el-siap-presenta-expectativas-agroalimentarias-2021?idiom=es>
- Singh, U. B., Malviya, D., Wasiullah, Singh, S., Imran, M., Pathak, N., Alam, M., Rai, J. P., Singh, R. K., Sarma, B. K., Sharma, P. K., & Sharma, A. K. (2016). Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*, 108, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>

- Souza, C., Li, S., Lin, A. Z., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C., & Somerville, S. C. (2017). Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiology*, 173(4), 2383–2398. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01680>
- Statista. (2022). *Superficie sembrada y cosechada por el sector agrícola en México de 2009 a 2021*. <https://es.statista.com/estadisticas/591660/cosecha-de-cultivos-superficie-mexico/>
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(Figure 1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Strashnov, Y., Elad, Y., Sivan, A., Rudich, Y., & Chet, I. (1985). Control of *Rhizoctonia solani* fruit rot of tomatoes by *Trichoderma harzianum* Rifai. *Crop Protection*, 4(3), 359–364. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(85\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0261-2194(85)90039-0)
- Strausbaugh, C. A., Eujayl, I. A., Panella, L. W., & Hanson, L. E. (2011). Virulence, distribution and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(2), 210–226. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.558523>
- Sułowicz, S., & Piotrowska, Z. (2016). The impact of fungicides on soil microorganisms. *Postępy Mikrobiologii*, 55, 12–18. Recuperado en 03 de febrero de 2023, de https://www.researchgate.net/publication/299615676_The_impact_of_fungicides_on_soil_microorganisms
- Tapia, R., Quijano, A., Cortes, A., Lappe, P., Largue, Al., Perez, D. (2008). PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan peninsula. 293–298. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>
- Tariq, M., Ali, H., Hussain, N., Nasim, W., Mubeen, M., Ahmad, S., & Hasanuzzaman, M. (2019). Fundamentals of crop rotation in agronomic management. In *Agronomic Crops* (pp. 545–559). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9151-5_24
- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a killer: Microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>
- Torres, S. V., Vargas, M. M., Godoy-Lutz, G., Porch, T. G., & Beaver, J. S. (2016). Isolates of *Rhizoctonia solani* can produce both web blight and root rot symptoms in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Disease*, 100(7), 1351–1357. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1270-RE>
- Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M. E. (2014). *Alternaria alternata* (black rot, black spot). *Postharvest Decay: Control Strategies*, 147–187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>
- Valença, C. A. S., Barbosa, A. A. T., Souto, E. B., Caramão, E. B., & Jain, S. (2021). Volatile nitrogenous compounds from bacteria: Source of novel bioactive compounds. *Chemistry and Biodiversity*, 18(11). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100549>
- van Esse, H. P., Reuber, T. L., & van der Does, D. (2020). Genetic modification to improve disease resistance in crops. *New Phytologist*, 225(1), 70–86. <https://doi.org/10.1111/nph.15967>

- Vargas-Ayala, R., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2000). Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological Control*, 17(1), 11–22. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0769>
- Vespermann, A., Kai, M., & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5639–5641. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-07>
- Vidal-Martínez, N. A., Argumedo-Delira, R., Sánchez-Pale, J. R., Chiquito-Contreras, R., González-Mendoza, D., & Sánchez-Viveros, G. (2021). Microorganismos antagonistas: una alternativa para el control biológico de enfermedades fúngicas presentes en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.). *Informacion Tecnica Economica Agraria*, 117(3), 214–226. <https://doi.org/10.12706/itea.2020.042>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vitro, I., Vivo, I., Ye, H., Wang, Q., Zhu, F., Feng, G., Yan, C., & Zhang, J. (2020). Antifungal activity of alpha-Mangostin against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in vivo. *Molecules*, 25(22), 5335. <https://doi.org/10.3390/molecules25225335>
- Vlassi, A., Nesler, A., Perazzolli, M., Lazazzara, V., Büschl, C., Parich, A., Puopolo, G., & Schuhmacher, R. (2020). Volatile organic compounds from *Lysobacter capsici* AZ78 as potential candidates for biological control of soilborne plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01748>
- Wang, C., Duan, T., Shi, L., Zhang, X., Fan, W., Wang, M., Wang, J., Ren, L., Zhao, X., & Wang, Y. (2022). Characterization of volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* YJ15 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 106(9), 2321–2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0230-RE>
- Wang, D., Oh, B.-R., Lee, S., Kim, D.-H., & Joe, M.-H. (2021). Process optimization for mass production of 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* CS13. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01859-w>
- Wang, K., Qin, Z., Wu, S., Zhao, P., Zhen, C., & Gao, H. (2021). Antifungal mechanism of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* assessed using omics technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5267–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00640>
- Wang, M., Yu, H., Li, X., & Shen, Z. (2020). Single-gene regulated non-spore-forming *Bacillus subtilis*: Construction, transcriptome responses, and applications for producing enzymes and surfactin. *Metabolic Engineering*, 62, 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.008>
- Wang, W., Chen, L. N., Wu, H., Zang, H., Gao, S., Yang, Y., Xie, S., & Gao, X. (2013). Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 56(3), 208–215. <https://doi.org/10.1111/lam.12035>
- Wang W, de Silva D, Moslemi A, Edwards J, Ades P, Crous P, Taylor P.

- (2021) *Colletotrichum* species causing anthracnose of citrus in Australia. *J Fungi (Basel)*. 12;7(1):47. doi: 10.3390/jof7010047.
- Wang, Y., Zhang, C., Liang, J., Wu, L., Gao, W., & Jiang, J. (2020). Iturin A extracted from *Bacillus subtilis* WL-2 affects *Phytophthora infestans* via cell structure disruption, oxidative stress, and energy supply dysfunction. *Frontiers in Microbiology*, 11(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.536083>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wintermans, P. C. A., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2016). Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 623–634. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0442-2>
- Wu Q, T. K., M, M., MG, C., DR, B., SR, R., CR, C., MG, T., & Bugni, T. (2020). Bacillibactins E and F from a marine sponge-associated *Bacillus* sp. *J Nat Prod*, 84(1), 33337146. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01170>
- Wu, Z., Huang, Y., Li, Y., Dong, J., Liu, X., & Li, C. (2019). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via induction of the defense mechanism and antimicrobial compounds produced by *Bacillus subtilis* SL-44 on pepper (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in Microbiology*, 10(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02676>
- Wyenandt, C. A., Riedel, R. M., Rhodes, L. H., Bennett, M. A., & Nameth, S. G. P. (2010). Survey of *Fusarium* spp. associated with fruit rot of pumpkin in Ohio. *Plant Health Progress*, 11(1). <https://doi.org/10.1094/php-2010-0827-01-rs>
- Xie, S., Liu, J., Gu, S., Chen, X., Jiang, H., & Ding, T. (2020). Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. *Annals of Microbiology*, 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01553-0>
- Xie, Z., Li, M., Wang, D., Wang, F., Shen, H., Sun, G., Feng, C., Wang, X., Chen, D., & Sun, X. (2021). Biocontrol efficacy of *Bacillus siamensis* LZ88 against brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria alternata*. *Biological Control*, 154, 104508. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104508>
- Yahaya, S. M., & Mardiyya, A. Y. (2019). Review of post-harvest losses of fruits and vegetables. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 13(4), 10192–10200. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.13.002448>
- Yang, H., Wang, L., Li, S., Gao, X., Wu, N., Zhao, Y., & Sun, W. (2021). Control of postharvest grey spot rot of loquat fruit with *Metschnikowia pulcherrima* E1 and potential mechanisms of action. *Biological Control*, 152, 104406. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104406>
- Yaqub, F., & Shahzad, S. (2005). Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. *Pakistan Journal of Botany*, 37(1), 175–180. Recuperado en 13 de Febrero de 2023 de https://www.researchgate.net/publication/266468138_Pathogenicity_of_Sclerotium_rolfsii_on_different_crops_and_effect_of_inoculum_density_on_colonization_of_mungbean_and_sunflower_roots
- Yi, H.-S., Ahn, Y.-R., Song, G. C., Ghim, S.-Y., Lee, S., Lee, G., & Ryu, C.-M. (2016). Impact of a bacterial volatile 2,3-butanediol on *Bacillus subtilis*

- rhizosphere robustness. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00993>
- Youssef, K., Ippolito, A., & Roberto, S. R. (2022). Editorial: Post-harvest diseases of fruit and vegetable: Methods and mechanisms of action. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900060>
- Yu, D., Fang, Y., Tang, C., Klosterman, S. J., Tian, C., & Wang, Y. (2019). Genomewide transcriptome profiles reveal how *Bacillus subtilis* lipopeptides inhibit microsclerotia formation in *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(5), 622–634. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0233-R>
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5942–5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>
- Yuan, L., Zhang, S., Peng, J., Li, Y., & Yang, Q. (2019). Synthetic surfactin analogues have improved anti-PEDV properties. *PLOS ONE*, 14(4), e0215227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215227>
- Zhang, D., Qiang, R., Zhao, J., Zhang, J., Cheng, J., Zhao, D., Fan, Y., Yang, Z., & Zhu, J. (2022). Mechanism of a volatile organic compound (6-Methyl-2-Heptanone) emitted from *Bacillus subtilis* ZD01 against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.808337>
- Zhang, D., Qiang, R., Zhou, Z., Pan, Y., Yu, S., Yuan, W., Cheng, J., Wang, J., Zhao, D., Zhu, J., & Yang, Z. (2022). Biocontrol and action mechanism of *Bacillus subtilis* lipopeptides' fengycins against *Alternaria solani* in potato as assessed by a transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 13(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.861113>
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020). Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>
- Zhang, Q., Stummer, B. E., Guo, Q., Zhang, W., Zhang, X., Zhang, L., & Harvey, P. R. (2021). Quantification of *Pseudomonas protegens* FD6 and *Bacillus subtilis* NCD-2 in soil and the wheat rhizosphere and suppression of root pathogenic *Rhizoctonia solani* AG-8. *Biological Control*, 154, 104504. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104504>
- Zhang, Q., Zhang, L., Song, L., Duan, K., Li, N., Wang, Y., & Gao, Q. (2016). The different interactions of *Colletotrichum gloeosporioides* with two strawberry varieties and the involvement of salicylic acid. *February*. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.7>
- Zhang, X., Gao, Z., Zhang, X., Bai, W., Zhang, L., Pei, H., & Zhang, Y. (2020). Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *Biological Control*, 141, 104135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104135>
- Zhao, X., Han, Y., Tan, X. qian, Wang, J., & Zhou, Z. jiang. (2014). Optimization

- of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *Journal of Microbiology*, 52(4), 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3>
- Zheng, L., Zhao, J., Liang, X., Zhan, G., Jiang, S., & Kang, Z. (2017). Identification of a novel *Alternaria alternata* strain able to hyperparasitize *Puccinia striiformis* f. sp. tritici, the causal agent of wheat stripe rust. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00071>
- Zhou, J. Y., Li, X., Zheng, J. Y., & Dai, C. C. (2016). Volatiles released by endophytic *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth and volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.026>
- Zhou, M., Li, P., Wu, S., Zhao, P., & Gao, H. (2019). *Bacillus subtilis* CF-3 volatile organic compounds inhibit *Monilinia fructicola* growth in peach fruit. *Frontiers in Microbiology*, 10(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01804>

