



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD MICHOACÁN**



**“BACTERIAS ANTAGONICAS AISLADAS DE FRESA, COMO  
CONTROLADORAS DE *Botrytis cinerea* y *Rhizopus  
stolonifer* EN FRUTOS DE FRESA POSTCOSECHA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN:**

**PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

**PRESENTA:**

**ROSA I SELA PLASCENCIA TENORIO**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dra. María Valentina Angoa Pérez**

**Dr. Víctor Olalde Portugal**

**Jiquilpan, Michoacán, México.**

**Noviembre de 2011**



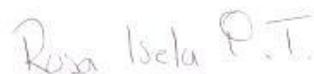


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán el día 22 del mes de Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe IBQ.Rosa Isela Plascencia Tenorio alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B091402, adscrito a CIIDIR IPN MICHOACAN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Valentina Angoa Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado "Bacterias Antagonicas Aisladas de fresa, como controladoras de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en frutos de fresa postcosecha, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [rositaf\\_21@hotmail.com](mailto:rositaf_21@hotmail.com) ó [valeangoa@hotmail.com](mailto:valeangoa@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



**IBQ. Rosa Isela Plascencia Tenorio**

## A G R A D E C I M I E N T O S

Al Instituto Politécnico Nacional por haberme otorgado el apoyo de beca Institucional para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al CIIDIR IPN-MICH. Por el las facilidades prestadas para lograr llevar a cabo y a buen término mis estudios.

Al CINVESTAV Campus Irapuato, en especial al Dr. Víctor Olalde Portugal encargado del laboratorio de Bioquímica Ecológica por el apoyo brindado durante y después de mi estancia en la obtención de información y datos que contribuyeron a los resultados obtenidos en este proyecto de tesis, así como a todos los compañeros de este laboratorio por su hospitalidad y calidez para hacer de mi estancia y trabajo más placentero.

A la Dra. Valentina Angoa P. por el apoyo y la confianza que depositó en mí para sacar adelante este proyecto de tesis, sus consejos, motivación, objetividad y profesionalismo siempre los pondré en práctica para cualquier actividad que realice.

A todos los miembros de mi comité revisor, Dra. Hortencia Mena V., Dr. Luis Fernando Ceja T. y al Dr. José Venegas G, que siempre me mostraron su apoyo en la realización de trabajo ó resolver dudas, así como por todos los comentarios que enriquecieron este trabajo de tesis.

A todos y cada uno de los compañeros que conocí en la Maestría, con los cuales pasamos momentos muy especiales, pero especialmente a Lupita, Melisa, Claudia y Beto por su apoyo incondicional, los momentos de risa que liberaron la tensión presente en el momento, por sus consejos pero sobre todo por la amistad que me han regalado.

A todos y cada una de las personas que laboran en el CIIDIR-IPN-MICH que me apoyaron en mi proceso estudiantil, colaborando conmigo en la realización de diferentes actividades dentro del centro, pero especialmente a José Antonio Ceja Díaz, por la disponibilidad, paciencia y ayuda prestada siempre.

A todos ustedes, muchas gracias!

## DEDICATORIA

Quiero dedicar especialmente a mi hija Sofia Rodríguez Plascencia quien con su amor, sonrisas, caricias, canciones y demás alegrías me da la fortaleza que necesito para salir adelante y por hacer de mi vida cada día más feliz, por ser mi motivo principal para querer mejorar en todos los aspectos y poder ser el mejor ejemplo posible para ella, por todas sus porras y palabras de aliento para concluir ese ciclo, por todo el amor que me das día a día, muchas gracias hija, todo el trabajo realizado de estos dos años te lo dedico, no encuentro las palabras para agradecerte todo lo que me das, eres lo mejor que me ha pasado en la vida, Te amo Sofy!

A mis padres, Noe Plascencia y Lucia Tenorio, por el amor que siempre me han brindado, por su apoyo incondicional gracias al cual he logrado concluir diferentes metas, por estar conmigo en mis mejores y peores momentos, por todo lo que soy gracias pues sin ustedes no sería posible ser quien soy, los quiero.

A mis hermanos Diana, Elizabeth y Oscar por ser ejemplos de superación, fortaleza y amor, por estar siempre conmigo y apoyarme siempre, los quiero. Y a mi sobrino Dany por sus ocurrencias que me hicieron reír tantas veces.

A Dios por permitirme superar diversos obstáculos y concluir un ciclo más, por permitirme compartir estos momentos con toda mi familia y amigos, por todas y cada una de las personas que ha sido parte de este ciclo y de mi vida Gracias!

## INDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>1</b>
<b>2.ANTECEDENTES</b> -----	<b>6</b>
<b>2.1LaFresa</b> .....	<b>6</b>
2.1.1 Producción y Comercialización Internacional-----	6
2.1.2 Producción Nacional-----	7
2.1.3 Importancia Económica-----	8
2.1.4 Problemática Fitosanitaria-----	8
2.1.5 Efectos de Hongos fitopatógenos en postcosecha-----	9
<b>2.2 Botrytis cinerea</b> -----	<b>11</b>
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i> -----	12
2.2.2 Alternativas para el control de <i>Botrytis cinerea</i> -----	12
2.2.3 Control Químico de <i>Botrytis cinerea</i> -----	13
2.2.4 Control Biológico de <i>B. cinerea</i> -----	14
<b>2.3 Rhizopus stolonifer</b> -----	<b>15</b>
2.3.1 Ciclo de vida de <i>Rhizopus stolonifer</i> -----	15
2.3.2 Condiciones para el desarrollo de <i>R. stolonifer</i> -----	16
2.3.3 Mecanismo de Acción de <i>R. stolonifer</i> -----	17
2.3.4 Control Químico de <i>R. stolonifer</i> -----	17
2.3.5 Combinación de alternativas químicas con naturales-----	18
2.3.6 Control Biológico de <i>R. stolonifer</i> -----	19
2.3.7 Riesgos y beneficios del control biológico-----	20
<b>2.4 Objetivo</b> -----	<b>22</b>
2.4.1 Objetivos específicos-----	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>23</b>
<b>3.1 Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i></b> -----	<b>23</b>
<b>3.2 Aislamiento y purificación de <i>Rhizopus stolonifer</i></b> -----	<b>23</b>
<b>3.3 Aislamiento de bacterias antagónicas</b> -----	<b>24</b>
<b>3.4 Selección de cepas bacterianas</b> -----	<b>25</b>

<b>3.5 Prueba de inhibición por volátiles</b>	<b>26</b>
<b>3.6 Prueba de patogenicidad</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Preparación de suspensiones bacterianas</b>	<b>26</b>
<b>3.8 Preparación de suspensión fúngica</b>	<b>27</b>
<b>3.9 Prueba de antagonismo <i>in vivo</i></b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Aislamiento de Hongos fitopatógenos</b>	<b>30</b>
4.1.1 <i>Rhizopus stolonifer</i>	30
4.1.2 <i>Botrytis cinerea</i>	31
<b>4.2 Aislamiento de cepas bacterianas</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Pruebas de confrontación <i>in vitro</i> de cepas bacterianas</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Prueba de volátiles.</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Patogenicidad de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i></b>	<b>36</b>
<b>4.6 Determinación del tipo de bacteria utilizando técnica de Gram</b>	<b>36</b>
<b>4.7 Pruebas de Biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>in vivo</i></b>	<b>36</b>
4.7.1. Biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i>	36
4.7.2 Biocontrol de <i>Botrytis cinerea</i> en el tiempo	37
<b>4.8 Biocontrol de <i>Rhizopus stolonifer</i></b>	<b>39</b>
4.8.1 Biocontrol de <i>Rhizopus stolonifer</i> en el tiempo	40
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>48</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Aislados bacterianos procedentes de distintas áreas de plantas de fresa silvestre y comercial ----- 33

Cuadro 2. Cepas bacterianas con poder antagónico vs *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*.----- 34

## Índice de figuras

Figura 1. Características culturales y morfológicas de *R. stolonifer*. .....31

Figura 2. Características culturales y morfológicas de *Botrytis cinerea*. ....33

Figura 3. Confrontación in vitro de B1, B2, B3 y B4 vs *B. cinerea*. ....35

Figura 4. Prueba de inhibición por la liberación de sustancias volátiles. ..35

Figura 5. Porcentaje de virulencia de las cepas de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa.....36

Figura 6. Índice de severidad del daño producido por *Botrytis cinerea* en frutos de fresa el último día del experimento. ....37

Figura 7. Índice acumulativo de severidad del daño producido por *Botrytis cinerea* en frutos de fresa a lo largo del experimento (7días). ....38

Figura 8. Antagonismo in vivo de *Botrytis cinerea* aplicando bacteria. ....39

Figura 9. Índice de severidad del daño producido por *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa. ....40

Figura 10. Índice acumulativo de severidad del daño producido por *Rhizopus stolonifer* .....41

Figura 11. Antagonismo in vivo de *R. stolonifer* aplicando bacteria.....41

## RESUMEN

La fresa es una fruta no climatérica, con una vida postcosecha muy corta. El manejo de la misma se realiza a temperatura ambiente lo cual propicia su deterioro hasta en un 80% en sólo 8 horas. Otro factor de pérdida de su calidad es el daño por hongos, especialmente por el moho gris (*Botrytis cinerea*), y la pudrición blanda (*Rhizopus stolonifer*) dos problemas de gran impacto en el fruto postcosecha. *Botrytis cinerea*, tiene la capacidad de seguir desarrollándose aún a bajas temperaturas (0°C-4°C) lo cual dificulta su control. *Rhizopus stolonifer* es un fitopatógeno muy versátil y de rápido crecimiento que causa grandes pérdidas económicas. Una alternativa para controlar los daños por patógenos en frutos postcosecha es el uso de antagonistas microbianos. En este estudio se aislaron 39 bacterias, de las cuales 15 fueron de tejido foliar de fresa silvestre conocida como fresa de la India (*Duchesnea indica* Andr. Fock) y 24 de tejido foliar de fresa comercial. Se eligieron nueve aislados que presentaron actividad antagónica *in vitro* a *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, oscilaron entre 67.1% a 81.7% para *Botrytis cinerea* y 45.5% a 73.2% para *Rhizopus stolonifer* como resultado de la interacción con cuatro aislados dos obtenidos de fresa silvestre y dos de comercial, todos ellos con capacidad para controlar a ambos fitopatógenos. Al aplicarlas *in vivo* se encontró que sólo 3 cepas mostraron potencial biocontrolador de ambos patógenos, 2 provenientes de tejido de fresa silvestre y una de tejido de fresa comercial, la cepa de origen comercial presentó control sobre *B. cinerea* de un 37.5% por otro lado una de las cepas silvestres mostró biocontrol sobre los dos patógenos, con un 30% de biocontrol para *B. cinerea* y 8.5% para *R. stolonifer*. No obstante lo anterior los estudios deben continuarse con miras a lograr una tecnología sustentable y amigable con el medio ambiente.

## A B S T R A C T

Strawberry is a non-climacteric fruit, with a short postharvest life. The handling of it is performed at room temperature which is conducive to decay by 80% in just 8 hours. Another factor in loss of quality is the damage by fungi, especially gray mold (*Botrytis cinerea*), and soft rot (*Rhizopus stolonifer*) two high impact pathogens on the fruit after harvest. *Botrytis cinerea*, has the ability to continue to develop even at low temperatures (0 ° C-4 ° C) making it difficult to control. *Rhizopus stolonifer* is a very versatile plant pathogen with fast growth that cause important economic losses. An alternative to control damage in fruit postharvest pathogens is the use of microbial antagonists. In this study, were isolated 39 bacteria, of which 15 were wild strawberry leaf tissue known as Strawberry India (*Duchesnea indica* Andr. Fock) and the other 24 from commercial strawberry. Nine of them were selected in vitro showed antagonistic activity to *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. The highest percentages of mycelial growth inhibition ranged from 67.1% to 81.7% for *Botrytis cinerea* and 45.5% to 73.2% for *Rhizopus stolonifer* as a result of interaction with four isolates obtained from: two wild strawberry and two commercial, all of them with ability to control both pathogens. When applied in vivo was found that only 3 showed potential biocontrol strains of both pathogens, 2 tissue from wild strawberry and strawberry tissue commercial, commercial origin strain introduced control over *B. cinerea* of 37.5%, on the other side of the biocontrol strains showed wild on two pathogens, with 30% of biocontrol for *B. cinerea* and 8.5% for *R. stolonifer*. Notwithstanding the above studies should be continued in order to achieve a sustainable technology and environmentally friendly.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es quizás uno de los frutos más apetecibles por su exquisito sabor (Howard *et al.*, 1992), pertenece a la familia de las *Rosaceae* en el género *Fragaria*. Es originaria de las regiones templadas del mundo y se caracteriza por tener tallos rastreros, nudosos y con estolones, hojas grandes trifoliadas, pecioladas, blancas por el envés y frutos rojos aromáticos (SAGARPA, 2008). Se cultiva en grandes cantidades, contiene gran cantidad de ácidos orgánicos y vitamina C, sustancias minerales y azúcares. Todas las fresas cultivadas se obtuvieron a partir de cuatro especies principales, la primera es de fresa silvestre o de bosque, es una especie nativa de las montañas de América y las Antillas. La fresa escarlata o fresa de Virginia, es nativa del este de América del Norte y se introdujo en Europa durante el siglo XVII. La fresa de playa o fresa de Chile, procede de las regiones montañosas del hemisferio occidental. La última especie se parece a la fresa silvestre común, en Europa central se dio origen por hibridación a las variedades europeas de frutos más gruesos llamados fresones.

En México, la producción de esta frutilla tiene un lugar relevante en la agroindustria, ya que genera empleos y divisas con un valor de producción estimado en más de 1,200 millones de pesos (INFOCIR, 2006). El principal mercado de la fresa mexicana es Estados Unidos, quien recibe cerca del 98% de las exportaciones de fruta fresca, el restante es enviado por aire a Europa (INFOCIR, 2006). Los principales productores de fresa a nivel mundial son: Estados Unidos, España, Polonia y México (Ingeniería agrícola, 2008).

México en el 2008 registró una superficie cultivada de fresa de 6 mil 214 hectáreas, obteniendo una producción de 208 mil 932.25 toneladas métricas, con un rendimiento promedio de 33.86 toneladas por hectárea. Esta hortaliza se cultiva en cerca de 11 entidades federativas de las cuales Baja California, Guanajuato, Estado de México y Michoacán; producen y dedican la mayor superficie de siembra a este cultivo, este último estado concentra la mayor producción nacional con una superficie cultivada de 3,215 Ha y una producción superior a las 106,905 Ton, seguido por el estado de Baja California con una superficie de 1,355 Ha y una producción de 70,410 Ton; el estado de Guanajuato con una superficie de 1,048 Ha y una producción de 18,065 Ton y por último el estado de México con una superficie de 244 Ha y una producción de 5,068 Ton (SAGARPA, 2009). México participa con 3%, otros 6%, Guanajuato 9%, Baja California 39% y finalmente Michoacán con el 43% de la producción nacional de fresa situándose como el Estado productor más importante de fresa en nuestro país (SAGARPA, 2009).

Cabe señalar que esta frutilla es una fruta no climatérica con una vida postcosecha muy corta. Su recolección es manual, su epidermis es turgente y su elevada tasa de respiración la hacen susceptible a daños mecánicos y a la invasión de algunos organismos patógenos, el cuidado desde su formación y desarrollo es de vital importancia para que llegue en buenas condiciones a la cosecha. Después de la cosecha se presentan otros procesos como la selección de la fruta, empaquetamiento, transporte y almacenamiento. La fresa que se cosecha madura y se mantiene a temperatura ambiente, propicia su deterioro en un 80% en sólo 8 horas. La selección de la fruta se hace de acuerdo con el mercado al que se dirige, lo mismo que el empaque. Estas labores se inician en el momento

de la cosecha, cuando se separan las frutas de acuerdo con la calidad y se empacan en el mismo lugar (SAGARPA, 2008). En estudios sobre pérdidas en postcosecha realizados en los mercados de New York y Chicago, EUA, éstas ascendieron a 28.8 y 41.2% respectivamente, por daños mecánicos y pudriciones causadas por hongos principalmente (Kader, 1991).

Entre las causas de pérdida de calidad de la fresa se encuentra su sensibilidad al deterioro por hongos, entre los que se encuentran el moho gris (*Botrytis cinerea*) y la pudrición blanda (*Rhizopus stolonifer*) los cuales ocasionan importantes pérdidas postcosecha. En el caso de *Botrytis cinerea* se favorece la infección debido a que es hábil para crecer a temperaturas de almacenamiento muy bajas (Espinosa, 2006) y *Rhizopus stolonifer* lo hace por su rápida colonización.

*Botrytis cinerea*, se desarrolla en condiciones de alta humedad y temperaturas inferiores a 20 °C (INFOAGRO, 2002). Bajo dichas condiciones, el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados (Choquer *et al.*, 2007).

*Rhizopus stolonifer* es agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas; puede crecer y desarrollarse a temperaturas que van desde los 10 hasta los 33°C (siendo 25°C la óptima) y humedades relativas variables (Pontón, 2002).

El uso de plaguicidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, etc.), es un método que, en ocasiones, genera abuso y dependencia por su alta eficacia y facilidad de uso (Jaramillo *et al.*, 2007). En México, se han aplicado plaguicidas desde fines del siglo XIX, su aplicación intensiva en el país inició hacia 1948, con la introducción de DDT, lo cual estuvo relacionado con la llegada de la Revolución Verde, que en México fue uno de los primeros países en adoptarlo (Sertox, 2004).

En la actualidad los residuos de agroquímicos tienen una gran relevancia en el intercambio internacional de productos hortofrutícolas tanto en estado fresco como procesados. La aplicación masiva de plaguicidas es parte integral de la agricultura moderna y de los programas de salud pública. Su utilidad ha quedado demostrada por el control de enfermedades y el mejor rendimiento por hectárea de numerosos cultivos, con su benéfica repercusión económico-social. Por otro lado, surgen sus efectos tóxicos, no sólo sobre la salud humana, sino sobre los ecosistemas, ya que se trata de productos generalmente tóxicos, que pueden permanecer como residuos en el producto final que llega al consumidor, y, por tanto, reducen su calidad (Jaramillo *et al.*, 2007), por lo que necesario buscar alternativas que permitan el control de las enfermedades, reduciendo el uso de agroquímicos.

Una alternativa es el uso de antagonistas microbianos para el control de fitopatógenos. Entre los organismos que realizan procesos de biocontrol, destacan los pertenecientes al género *Pseudomonas*, debido a su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios tóxicos para hongos y bacterias fitopatógenos, entre los cuales se destacan los antibióticos (Hernández *et al.*, 1999). Existen reportes del uso de algunos microorganismos como biocontroladores de *Botrytis* como: *Actinobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Pseudomonas ssp.* en uva, además de *Gliocladium roseum* para combatir *B. cinerea* en fresa (Chaves y Wang, 2004); en lo que respecta a *Rhizopus* microorganismo como *Trichoderma harzianum*, *Trichosporon pullulans*, *C. laurentii* entre otras demostraron ser excelentes biocontroladoras postcosecha de este patógeno (Guédez *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

Debido a los efectos positivos que se han encontrado en diversas investigaciones al utilizar microorganismos antagónicos, la necesidad de buscar alternativas amigables con el medio ambiente y el consumidor final,

así como por la importancia de este fruto para el Estado de Michoacán, permiten que el uso de bacterias antagónicas aisladas de frutos de fresa silvestre y de fresa comercial pueda ser una opción a considerar para el control de dos de las enfermedades de mayor importancia a nivel postcosecha, disminuyendo los residuos de agroquímicos sobre los frutos y las posibles repercusiones sobre la salud de los consumidores. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar bacterias de tejidos de fresa tanto silvestre como comercial y determinar su actividad antagónica in vitro y posteriormente determinar su potencial in vivo, controlando o inhibiendo el desarrollo de *B. cinerea* y *R. stolonifer* en los frutos y con ello alargar su vida de anaquel, contribuyendo a la disminución del uso de fungicidas, proponiendo una alternativa sustentable.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 La Fresa**

La fresa (***Fragaria × ananassa***), es un fruto apreciado por su aroma, sabor y propiedades nutricionales (SAGARPA, 2005). Además, por su participación en el ámbito de la salud, se ha demostrado que estos frutos muestran efectos antioxidantes usándolas como método preventivo para enfermedades cardiovasculares, degenerativas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Fundación para la innovación agraria, 2009). Se consume principalmente fresco y también congelado, se utiliza para la elaboración de mermeladas, conservas, etc. (INFOCIR, 2006). Por varios siglos ha sido cultivado en Europa, Asia, Estados Unidos América y otros países constituyéndose como una de las principales frutas de consumo de los países desarrollados. En México, fue introducida a mediados del siglo XIX a través de variedades procedentes de Francia, las que se adaptaron y prosperaron en la zona de Irapuato, Guanajuato (COEFREM AC, 2007). Se conocen más 1000 variedades de fresa en el mundo, como son: Pájaro, Chandler, Selva, Camarosa, Tudla, Oso grande, Cartuno, Carisma, entre otras.

#### **2.1.1 Producción y Comercialización Internacional**

Estados Unidos, España, Polonia y México son algunos de los principales productores de fresa a nivel mundial (Ingeniería agrícola, 2008). México participa con una producción de 223 mil 922 toneladas anuales (SIAP, 2010). Tan solo en el 2007 más del 70% de la producción de fresa fresca

como congelada se destinó a la exportación estimándose un valor de producción de 2,100 millones de pesos (SAGARPA, 2008).

### **2.1.2 Producción Nacional**

En un principio, su producción se concretaba a cubrir las necesidades del mercado nacional, sin embargo, a partir de 1950 su importancia fue en aumento, debido a la creciente demanda por parte de Estados Unidos. Fue precisamente la posibilidad de exportación, lo que hizo que el cultivo se extendiera a cerca de 11 estados del país, y que la instalación de congeladoras y empacadoras creciera rápidamente en las diversas regiones freseras (INFOCIR, 2006). En México, la fresa se cultiva en 11 entidades de las cuales tres (Michoacán, Guanajuato y Baja California) son los principales productores de este fruto, y contribuyen con el 95% de la superficie sembrada y de producción nacional (Camacho 2003). Es importante resaltar que Michoacán es el generador del 52% de la producción nacional de fresa, con 113,193.37 Ton anuales (SAGARPA, 2010), colocándose como el principal productor (CONAFRESA, 2002). Las principales regiones de producción son, el valle de Zamora, Maravatío y Panindícuaro, nombrándolas en orden de importancia no solo por la producción, sino también por la superficie sembrada, mano de obra utilizada, así como la cantidad de empresas procesadoras (León, 2009). Las condiciones agroclimáticas, agua, y fertilidad de los suelos convierten a estos municipios en zonas de alto rendimiento en la producción de tal fruto.

### **2.1.3 Importancia Económica**

La producción de este fruto es de vital importancia para nuestro país, no solo por el capital que ingresa debido a su exportación, ó por la generación de empleos anuales, pues se ha reportado que desde el proceso de cultivo, hasta el procesamiento del mismo se requieren más de tres millones 749 mil 500 jornales anuales, generando una derrama económica de 450 millones de pesos (SAGARPA, 2008), sino también por la actividad comercial que se desarrolla a partir de la distribución de insumos, comercialización, transporte y consolidación de la red de frío (León, 2009). En el 2009 alrededor de 22 municipios en el estado eran productores de fresa con cerca de 2 mil 664 hectáreas cultivadas con este fruto, cuya producción ascendió a las 68 mil 461 toneladas; sin embargo, el costo de producción medio para establecer una hectárea de fresas fue de poco más de 8 mil dólares para una producción tradicional, mientras que para los productores que aplicaron una tecnología avanzada en sus procesos, el costo ascendió a más de 11 mil 500 dólares por hectárea (León, 2009).

### **2.1.4 Problemática Fitosanitaria**

Al igual que otros cultivos, el cultivo de la fresa durante su producción se ve afectado por numerosas enfermedades (Guédez *et al.*, 2009), pese a los grandes adelantos en el desarrollo de la tecnología, siguen presentándose grandes pérdidas en postcosecha en todo el mundo, siendo difícil su cuantificación (Batta, 2004). Se estima que anualmente los agricultores mexicanos aplican 23 millones de kilogramos de distintos plaguicidas a frutas y verduras (Tripathi *et al.*, 2004), que son incorporados comúnmente antes y durante la cosecha. Estos productos presentan efectos nocivos a la salud, tales como carcinogénesis,

teratogénesis así como toxicidad residual cuando se consumen frutas y verduras que han sido expuestas. Además, existen reportes del desarrollo de cepas fúngicas resistentes sin dejar de lado la contaminación ambiental que su uso irracional ha generado ((Bautista-Baños *et al.*, 2000; Vero *et al.*, 2002; Spadaro *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2004; Muñoz y Ávila, 2005; Cia *et al.*, 2007).

### **2.1.5 Efectos de Hongos fitopatógenos en postcosecha**

En este sentido, los hongos fitopatógenos son los que mayores pérdidas en los cultivos y productos hortofrutícolas ocasionan. Hasta el momento se conocen más de 100 especies responsables de la mayoría de las enfermedades postcosecha (Tripathi y Dubey, 2004). Cabe señalar que algunos de esos hongos están presentes en los productos desde antes de la cosecha, sin que éstos presenten algún signo o síntoma de enfermedad, sin embargo, una vez que las condiciones ambientales se vuelven favorables el proceso de infección se desarrolla (Rivera, 2008).

La presencia de fitopatógenos además de la mala manipulación ó aplicación de tecnologías postcosecha es una de las causas de pérdidas postcosecha, (Vero *et al.*, 2002; Neri *et al.*, 2006). Lo anterior posibilita que las alteraciones físicas producidas por agentes mecánicos, machucones, heridas, así como el manejo inadecuado que causa aberturas en los productos, favorezcan la invasión de los mismos por patógenos (Zaccari, 2003, Spadaro *et al.*, 2004; Rivera, 2008;). El mayor porcentaje de pérdida de productos postcosecha se debe principalmente a pudriciones causadas por hongos y bacterias fitopatógenas (Vero *et al.*, 2002). El grado de daño depende de la especie hortícola, del organismo patógeno y de las condiciones de almacenamiento (Agrios, 2007).

Es sabido que los productos hortofrutícolas cambian su metabolismo a lo largo de su vida, sobre todo en la fase postcosecha, generando metabolitos secundarios que al ser secretados pueden favorecer que el patógeno invada al producto; o bien el simple envejecimiento natural puede disminuir las defensas naturales que se presentan durante su estado inmaduro. Las condiciones ambientales cambian cuando los productos son recolectados, lo que da lugar a una tasa de respiración más alta, transpiración elevada, pérdida de agua. La temperatura de almacenamiento, por su parte, es determinante para que se presente la enfermedad, ya que la mayoría de los hongos pueden desarrollarse a temperaturas ambientales con condiciones de alta humedad. Los hongos causantes del deterioro postcosecha muestran crecimiento óptimo de 20 a 25 °C en general, las temperaturas máximas que toleran los hongos para su crecimiento están entre los 32 a 38 °C y la temperatura mínima es de 15 °C ya que por debajo de esta, generalmente su desarrollo se ve disminuido o inhibido, aunque existen sus excepciones como *Penicillium spp.* y *B. cinerea* que pueden crecer a temperaturas de 4 °C (Rivera, 2008).

Por todo lo antes mencionado, el manejo del fruto en particular requiere de cuidado especial desde el inicio del ciclo del cultivo hasta la cosecha, actividades como la selección de la fruta, envasado, transporte y almacenamiento, se realizan a temperatura ambiente, situación que propicia el deterioro del 80 % de la fruta en tan solo 8 horas. (SAGARPA, 2008). En un estudio realizado en México se encontró que hongos como: *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phytophthora*, *Botrytis*, y *Rhizopus stolonifer*, son los responsables de diferentes enfermedades que atacan al fruto de fresa en postcosecha, sin embargo los de mayor frecuencia son *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* (Fraire *et al.*, 2003).

## 2.2 *Botrytis cinerea*

En 1797 Persoon describió las características de un hongo filamentoso denominándolo *Botrytis cinereascens* y no fue hasta 1832 que fue aceptado el nombre de ***Botrytis cinerea*** para su especie (Groves & Loveland, 1953). *B. cinerea* es también conocido como podredumbre gris, debido a que produce una gran cantidad de micelio gris de apariencia polvosa, conidióforos largos y ramificados en donde se encuentran racimos de conidios con forma ovoide, los conidióforos y los racimos de conidios asemejan un racimo de uvas, cuando el clima es húmedo los conidios son liberados con facilidad siendo diseminados por el viento, el hongo produce esclerocios que son estructuras de resistencia planos duros y color negro, hibernando en el suelo y desarrollándose sobre restos de plantas en proceso de descomposición, el hongo puede propagarse con las semillas infectadas con esclerocios del tamaño de la semilla, y se desarrolla, esporula y germina en un clima húmedo y preferentemente frío( 18°C a 23°C) produciendo la infección (INFOAGRO, 2002), por lo que debe evitarse el contacto del fruto con el suelo, frutos u hojas en descomposición. Este patógeno afecta a más de 235 especies de plantas como ornamentales, frutales, hortalizas, por mencionar algunas y puede atacar desde la semilla, bulbos, tallos, hojas, flores, raíces y frutos (postcosecha). Si se le dan las condiciones necesarias para que la enfermedad prospere, la infección puede comenzar desde el cultivo quedando las esporas latentes hasta que las condiciones sean las apropiadas y poder desarrollarse. Requiere de condiciones de alta humedad relativa, crece aún a bajas temperaturas de almacenamiento (Espinosa, 2006), puede desarrollarse en clima templado, en áreas secas y desérticas (Yunis & Elad, 1989), como en zonas frías (Anderson, 1924), se estima que alrededor del 20% de la cosecha mundial de fresa, tomate y vid es afectada por *B. cinerea* ocasionando una inversión de 10 a 100

billones de euros anuales para su control (Genoscope, 2005). Actividades como la recolección, transporte y almacenamiento son situaciones que pueden contribuir con la propagación de la enfermedad (Coley-Smith *et al.*, 1980).

### **2.2.1 Ciclo de vida de *Botrytis cinerea***

De manera general el ciclo de vida de este fitopatógeno consiste en la adhesión de los conidios a la superficie del huésped, donde germinarán y penetrarán el tejido, ya sea por daño mecánico, hendiduras naturales, ó excreción de enzimas ó toxinas que degradan la pared celular vegetal dando lugar a una lesión primaria, donde la planta muestra un mecanismo de defensa manifestándose la muerte celular (necrosis) del tejido adyacente a la penetración del patógeno, pareciendo que ha controlado la infección; sin embargo el hongo no muere, sigue latente en el área de necrosis, posteriormente el patógeno es capaz de vencer las barreras que la planta ofreció ante el ataque, iniciando la diseminación, colonización y maceración rápida del tejido, y sobre el cual el hongo genera nuevos conidios mismos que germinarán comenzando nuevamente el ciclo (Prins *et al.*, 2000).

### **2.2.2 Alternativas para el control de *Botrytis cinerea***

Algunas de las técnicas de control para esta enfermedad consiste en someter los frutos a 0°C después de cosechados o bien combinar diferentes técnicas con la refrigeración para alargar su vida de anaquel (Hernández-Muñoz *et al.*, 2006); también se han utilizado atmósferas controladas y modificadas sin embargo se ha encontrado que esta práctica puede afectar el color del fruto (Holcroft y Kader, 1999) y posiblemente el

aroma y sabor (Pelayo *et al.*, 2003). Se ha reportado también que altas concentraciones de CO<sub>2</sub> pueden producir aroma desagradable en los frutos (Li y Kader, 1989 y Ke *et al.*, 1994). No obstante lo anterior, el hecho de que el hongo pueda desarrollarse a temperaturas de refrigeración, posibilita su ataque en cualquier estado de desarrollo de la planta, incluso en postcosecha, lo cual hace su control más complicado.

### **2.2.3 Control Químico de *Botrytis cinerea***

La estrategia comúnmente usada por los productores es el **control químico**, este control ha sido una herramienta útil, en este caso se emplean fungicidas que pueden funcionar como protectores (preventivos), mismos que se aplican antes de que aparezcan signos de la enfermedad, curativos y erradicantes, estos penetran el tejido dañado matando al hongo además de que pueden evitar la formación de esporas contribuyendo así a que no se presente la enfermedad (Jaramillo, 2007) entre los fungicidas que más se utilizan para controlar este fitopatógeno encontramos benomilo, carbendazima, captan y diclofunida por mencionar algunos. El uso de tales productos es cada vez menos recomendable debido a que su uso inmoderado ha provocado la contaminación ambiental; a esta problemática debe agregarse la resistencia a muchos de los fungicidas aplicados que las cepas de este fitopatógeno han adquirido; esto último ha conducido al aumento de la dosis o ya no son efectivos por lo que deben cambiar el fungicida para el control el hongo (Espinosa, 2006). Por otro lado, cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitarias, puesto que los fungicidas se presentan como potenciales agentes oncogénicos cuando son aplicados a las frutas y verduras (Elad *et al.*, 1983).

### 2.2.4 Control Biológico de *B. cinerea*

Una alternativa que se ha venido utilizando es el **control biológico**, el cual hace uso de microorganismos. Bacterias, hongos, nematodos y levaduras son agentes que se han utilizado para el control de enfermedades (Espinosa, 2006). Se ha demostrado que levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos postcosecha además de competir por espacio y nutrientes son capaces de inducir resistencia en la planta, tal es el caso de *Pichia guilliermodii* US-7 (Wickerham, 1996).

La mayoría de las plagas y enfermedades tienen un antagonista biológico o enemigos naturales (insectos) que pueden ser utilizados como estrategia de lucha en el control biológico (Rubio & Fereres, 2005). Entre las estrategias que algunos microorganismos usan para controlar al patógeno está su capacidad de colonizar las heridas en los frutos, utilizando los nutrientes disponibles, lo que ocasiona que el patógeno tenga menor disponibilidad de nutrientes por lo que la germinación de las esporas se ve disminuida. (Espinosa, 2006). Por otro lado el hongo *Trichoderma harzianum* es de los más estudiados y comercializados debido a las ventajas que presenta sobre el control químico y otros microorganismos, la velocidad de crecimiento, abundancia de esporas, generalmente se comporta como micoparásito, compite con otros organismos del suelo, produce antibióticos además de presentar resistencia a pesticidas, (Espinosa, 2006). Se han hecho productos a base de este hongo aplicándose en diferentes países y diferentes cultivos, respecto a la acción que tiene sobre *B. cinerea* se sabe disminuye la germinación de las esporas además de reducir también la elongación de los tubos germinativos (Kapat *et al.*, 1998). En un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca se encontró que una cepa nativa de Chile del género *Trichoderma* mostró eficiencia al controlar *Botrytis cinerea* aplicándolo de manera preventiva en lechuga (Sandoval,

2004). Se sabe que bacterias como *Streptomyces*, *Xanthomonas maltophilia*, *Bacillus pumilus*, así como las levaduras *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus albidus*, logran controlar la superficie de las hifas, conidios y conidióforos de *B. cinerea* (Espinosa, 2006). Aunque los resultados mostrados han sido favorables, la aplicación de estos microorganismos no es aplicada al 100%, por lo que se ha optado por realizar un manejo integrado utilizando el control químico, biológico y métodos preventivos (rotación de cultivos, medidas de higiene). De igual manera se ha usado en conjunto el hongo *Trichoderma harzianum* con diferentes fungicidas obteniendo mejores resultados vinculado que aplicándolo por separado (Espinosa, 2006), contribuyendo con ello a la disminución de aplicación de agroquímicos.

### **2.3 *Rhizopus stolonifer***

Es el otro de los patógenos a nivel postcosecha de importancia para los productores de fresa. *Rhizopus stolonifer*, se encuentra clasificado dentro del Phylum Zygomycota (Pontón *et al.*, 2002; Agrios 2007), es agente causal de la enfermedad conocida también como pudrición blanda y ocasiona grandes pérdidas económicas, puede crecer y desarrollarse a diferentes temperaturas y humedades relativas, temperaturas que van desde los 10 hasta los 33 °C, siendo 25 °C la óptima, se ve seriamente afectado por temperaturas menores a los 5 °C (Pontón, 2002).

#### **2.3.1 Ciclo de vida de *Rhizopus stolonifer***

Es un hongo que se encuentra como saprófito sobre pedazos de fruta o cualquier material orgánico, su micelio es aéreo y cenocítico, se puede reproducir sexual y asexualmente, por medio de dos estructuras

morfológicamente similares donde no es posible diferenciar los sexos. El resultado de esta fusión es la formación de una zigospora, la cual tiene paredes gruesas que le dan resistencia para poder mantenerse latentes en el suelo por varios meses, soportando condiciones de escasez de agua y altas temperaturas, hasta que encuentra las condiciones necesarias para desarrollarse (Adaskaveg *et al.*, 2002), apareciendo un esporangio lleno de esporangiosporas las cuales pueden tener forma globosa, elipsoidales y angulares (Schipper, 1994; Hernández- Lauzardo *et al.* 2007) mismas que son diseminadas por el viento, llegando a heridas de frutos donde germinan e invaden el tejido formando el micelio típico de la enfermedad, el cual contiene muchos esporangios que al liberar las esporas dan inicio a la fase asexual (Rivera, 1999).

La velocidad de crecimiento es rápido por lo que una vez que ha comenzado la infección a un fruto, el micelio lo invade por completo y también a los adyacentes, provocando la descomposición del fruto en 4 días (Northover y Zhou, 2002).

### **2.3.2 Condiciones para el desarrollo de *R. stolonifer***

Durante la etapa de recolección y transporte de los frutos, pueden sufrir magulladuras o daños mecánicos que pueden propiciar que el patógeno se desarrolle, por lo que frutos maduros y dañados son los más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Lisker *et al.*, 1996). En el 2002 Holmes y Stange, realizaron un estudio sobre la influencia del tipo de herida (raspadura, perforación, magulladura y quebradura) en los frutos con la incidencia de la enfermedad, encontrando que los frutos con magulladura fueron los que presentaron mayor incidencia de la misma, dependiendo del cultivo empleado (Velázquez del Valle, *et al.*, 2008).

### 2.3.3 Mecanismo de Acción de *R. stolonifer*

*R. stolonifer* excreta enzimas pécticas que degradan y disuelven la pared de los frutos (Barkai-Golan, 2001), enzimas como poligaracturonasa (PG) y pectin metil esterasas (PME) han sido encontradas en frutos enfermos (Blandino *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de los microorganismos que actúan como bio-controladores en enfermedades postcosecha son poco conocidos, se han descrito varios mecanismos incluyendo la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, inducción de resistencia así como competencia por nutrientes, espacio, generalmente hay más de un mecanismo implicado, es casi inusual que un microorganismo utilice solo un mecanismo para ejercer su acción como biocontrolador sobre el fitopatógeno (Obagwu y Korsten, 2003).

### 2.3.4 Control Químico de *R. stolonifer*

Entre las estrategias más utilizadas para el control de este patógeno encontramos la alternativa **química** aplicando productos como: Dicloran, de un 87-100% de control del patógeno sobre durazno (Northover y Zhou, 2002), Iprodine muestra 59 % de reducción de la enfermedad en jitomate (Abdel-Mallek *et al.*, 1995) sin embargo este producto fue sacado del mercado por sus fabricantes, Fludioxonil redujo de un 90, 95.2 y 75 % la incidencia de la enfermedad en frutos de durazno, nectarinas y ciruelas respectivamente (Förster *et al.*, 2007) y Tebuconazole (Adaskaveg *et al.*, 2002); por otro lado fungicidas como Benomil y miclobutanil no han tenido efecto controlador sobre el hongo por el contrario han generado resistencia a estos fungicidas (Northover y Zhou, 2002).

### 2.3.5 Combinación de alternativas químicas con naturales

Se han utilizado otras alternativas químicas con diferentes soluciones, Gabler *et al.*, (2004) probaron la combinación de una solución de etanol con temperatura, obteniendo 50 % de control sobre las esporas de *R. stolonifer*. El uso de Molibdato de amonio redujo en un 100 % la incidencia en manzanas (Nunes *et al.*, 2001<sup>a</sup>). El uso de ácido paracético controló en 100% la enfermedad en nectarinas (Mari *et al.*, 2004); el empleo de gases como el dióxido de cloro han mostrado efecto antifúngico inhibiendo más del 90 % la enfermedad (Zoffoli *et al.*, 2005). En el caso particular de la fresa se ha empleado óxido nitroso encontrando 7 días de retraso de la enfermedad (Qadir y Hashinaga, 2001). Tratamientos con temperaturas bajas no son recomendables debido a que los patógenos soportan mejor la temperatura que los hospederos (Adaskaveg *et al.*, 2002), atmósferas controladas en combinación con quitosano han mostrado buenos resultados en la reducción de la enfermedad; por otro lado la radiación gamma inhibe totalmente el desarrollo de la enfermedad en jitomate (Bazza Zeinab *et al.*, 2001). En camote y jitomate la aplicación de dosis pequeñas de luz UV reduce la enfermedad, dosis bajas de Luz UV le confieren cierta resistencia interna a productos cosechados haciéndolos más resistentes al decaimiento postcosecha (Stevens *et al.*, 2004).

Además de los problemas fitosanitarios, el productor se enfrenta a la resistencia que muestran muchas cepas fitopatógenas a los fungicidas y la baja efectividad de los mismos, un ejemplo de ello es la resistencia de varias cepas del género *Penicillium* en frutos de manzana, causantes de las pudriciones verde y azul durante el almacenamiento (Holmes y Eckert, 1999; Fogliata *et al.*, 2001). Lo cual ha llevado a la búsqueda de otras alternativas no químicas para solucionar dichos problemas. Por lo que las alternativas naturales o medidas de control biológico se vuelven una opción con alto potencial.

### 2.3.6 Control Biológico de *R. stolonifer*

En los últimos 15 años la aplicación de antagonistas microbianos ha sido aplicada eficazmente en enfermedades postcosecha (Janisciewicz y Korsten, 2002). Tal es el caso de *Trichoderma harzianum*, que en un estudio realizado por Guédez *et al.* (2009) demostró ser un excelente biocontrolador de diferentes hongos postcosecha entre ellos *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa aplicando a *Trichoderma* antes de la cosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y en lugares de venta, el mecanismo de acción que utiliza es el parasitismo, en otros estudios se ha reportado que *Trichosporon pullulans* es efectiva para controlar a *R. stolonifer* en cereza dulce almacenándola a 25 °C, sin embargo combinando esta levadura con temperaturas bajas y atmósferas controladas esta levadura no crece (Qin *et al.*, 2004); así mismo se ha demostrado que *Aureobasidium pullulans* mostró actividad antagónica significativa contra *R. stolonifer* en frutos de uva (Castoria *et al.*, 2001); de igual manera, el empleo de *C. laurentii* redujo en un 80 % la enfermedad en durazno almacenados a 25°C durante 5 días (Zhang *et al.*, 2007). Por otro lado el utilizar productos vegetales como polvo de raíces de Kava (*Piper methysticum* G. Forst.) inhibió significativamente el crecimiento de varios hongos postcosecha, encontrando que *R. stolonifer* fue el más afectado (Xuan *et al.*, 2003). También se ha reportado el uso de quitosano como buen fungicida al retardar el crecimiento micelial de *R. stolonifer*, el recubrimiento con quitosano en fresa almacenada logró reducir la enfermedad (Zhang y Quantick, 1998).

### **2.3.7 Riesgos y beneficios del control biológico**

El control biológico cuando funciona, posee muchas ventajas entre las que se pueden destacar:

- Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluido el hombre.
- La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
- El tratamiento con insecticidas es eliminado de forma sustancial.
- La relación costo/beneficio es muy favorable.
- Evita plagas secundarias.
- No existen problemas con intoxicaciones (Tejada, 1982; Summy y French, 1988).

Entre las limitaciones que tiene el control biológico se pueden citar:

- Ignorancia sobre los principios del método.
- Falta de apoyo económico.
- Falta de personal especializado.
- No está disponible en la gran mayoría de los casos.
- Problemas con umbrales económicos bajos.
- Enemigos naturales más susceptibles a los plaguicidas que las plagas.
- Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata (Ceballos, 2004).

El beneficio del control biológico se puede valorar en términos de éxitos o fracasos (DeBach, 1968). Un éxito completo se obtiene cuando se utiliza el control biológico contra una plaga importante y sobre un área extensa a

tal grado que las aplicaciones de insecticidas se vuelven raras (Ceballos, 2004).

El éxito sustancial incluye casos donde las ganancias son menos considerables ya que la plaga y el cultivo son menos importantes o cuando el área cultivada es pequeña o porque ocasionalmente se requiere el uso de insecticidas. El éxito parcial es donde el control químico permanece como necesario pero se reduce el número de aplicaciones y el área tratada es pequeña (Ceballos, 2004).

En términos económicos, los beneficios cuando los hay, son tan espectaculares como los ecológicos; se ha calculado un retorno aproximado por cada dólar invertido en control biológico clásico de una plaga de 30:1, mientras que para el control químico la relación es 5:1 (DeBach, 1977; Hokkanen, 1985).

Con base en lo anteriormente planteado, este trabajo pretendió hacer uso de microorganismos presentes en el ecosistema, utilizándolos como antagonistas de dos de los fitopatógenos de mayor importancia a nivel postcosecha en frutos de fresa, y así reducir las dosis de agroquímicos utilizados para retrasar la pudrición blanda y la podredumbre gris causantes de grandes pérdidas económicas.

## **2.4 Objetivo**

Evaluar el efecto biocontrolador de aislados bacterianos nativos de fresa silvestre y comercial sobre dos hongos fitopatógenos en frutos postcosecha.

### **2.4.1 Objetivos específicos:**

- 1) Determinar el efecto antagónico de aislados bacterianos vs los patógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer in vitro*.
- 2) Determinar el efecto biocontrolador de aislados bacterianos vs los patógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa *in vivo*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea***

De frutos infectados con *Botrytis cinerea* se tomó una muestra realizando una impronta con cinta adhesiva en un portaobjetos, sobre el cual se colocó una gota de azul de tripano y se observó al microscopio con la finalidad de observar las estructuras del hongo y confirmar si se trataba de *Botrytis cinerea*. Una vez demostrado que se trataba del hongo, se pasó 1cm<sup>3</sup> de tejido enfermo con micelio a medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubó a 18 °C por dos días. El siguiente paso fue realizar la purificación de la siguiente manera: una vez desarrollado el hongo en PDA, se colocó 1cm<sup>3</sup> del medio de cultivo con el hongo en Agar- Agua y se incubó a 18 °C hasta el desarrollo de hifas, una vez obtenido lo anterior en campana de flujo laminar y con ayuda de un microscopio estereoscópico se observó y realizó el corte de punta de la hifas, las cuales se traspasaron a medio PDA, incubándose a 18 °C por dos días.

#### **3.2 Aislamiento y purificación de *Rhizopus stolonifer***

De frutos infectados con *Rhizopus stolonifer* se tomó una muestra realizando una impronta con cinta adhesiva en un portaobjetos con una gota de azul de tripano, se observó al microscopio con la finalidad de observar las estructuras del hongo y confirmar si se trataba de *Rhizopus stolonifer*. Una vez garantizado que se trataba del hongo, se pasó 1cm<sup>3</sup> del tejido enfermo con micelio a caja petri con PDA, se incubó a 26 °C por 2 días, seguido se realizó la purificación de la siguiente manera: una vez desarrollado el hongo en medio PDA, se colocó 1cm<sup>3</sup> del hongo en medio

Agar- Agua y se incubó a 26 °C hasta el desarrollo de hifas, una vez obtenido lo anterior en campana de flujo laminar y con ayuda de un microscopio estereoscópico se observó y realizó el corte de punta de la hifas, las cuales se traspasaron a medio PDA, incubándose a 26°C por dos días.

### **3.3 Aislamiento de bacterias antagónicas**

El aislamiento se realizó de planta de fresa comercial, colectadas en un campo de cultivo de Zamora, Michoacán y de una especie silvestre (*Duchesnea indica* Andr. Fock) colectada en la localidad de Cherán, Michoacán.

El material vegetal se enjuagó con agua corriente. Una parte del tejido foliar fue cortado en trozos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente y se colocaron en cajas petri con PDA, las cuales se incubaron a 26 °C, hasta el desarrollo de bacterias; en el caso del fruto éste se pasó a cajas petri en forma de impronta e incubó a 26 °C por 72 h. De igual manera se realizaron improntas de las hojas se pasaron a PDA y se incubaron a 26 °C por 72 h.

Otra parte del tejido fue desinfectado por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, se enjuagó con agua destilada estéril, se secó con toallas estériles y se colocó en un homogenizador también estéril al cual se agregaron 9 ml de agua peptonada al 2%, se molió el material y del extracto se tomaron 0.5 mL, los cuales fueron colocados en cajas petri con PDA para hacer una siembra en superficie. Posteriormente se tomaron muestras de igual volumen para realizar diluciones 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, las cuales también fueron sembradas en placas con PDA y se incubaron a 26 °C por 72 h. Una vez obtenido desarrollo bacteriano se picaron las colonias

con palillo estéril y se pasaron a caja con PDA se incubaron a 26 °C por 48 h.

### **3.4 Selección de cepas bacterianas**

Estas se seleccionaron por medio de una confrontación preliminar con los hongos fitopatógenos seleccionados. Dichas pruebas se realizaron de la siguiente manera:

En el centro de una placa de petri con PDA, se colocó un centímetro cúbico del hongo correspondiente (*Botrytis cinerea* o *Rhizopus stolonifer*) y alrededor se colocó una asada de cada una de las cepas bacterianas, 7 cepas por caja con la finalidad de comenzar a discriminar los aislados bacterianos con efecto antagónico. Se incubaron a 18 °C por cuatro días, observando diariamente si presentaban halos de inhibición y midiendo éstos. Una vez que se observó el antagonismo entre bacterias se seleccionaron las que presentaron mayor halo de inhibición para ello se midió el diámetro del halo entre la bacteria y el hongo. Se hicieron 3 repeticiones por placa. Se realizó tinción Gram a las cepas de mayor antagonismo. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula (Singh, 2003):

—————

Donde:

R1= Crecimiento radial del patógeno en la placa control

R2= Crecimiento radial del patógeno con la bacteria

### **3.5 Prueba de inhibición por volátiles**

Se utilizaron bases de cajas petri con PDA. En una de las dos bases se colocó una asada de bacteria y sobre la otra base 1 cm<sup>3</sup> del hongo (*Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*). Las bases se colocaron una sobre la otra, se selló con plástico adherente y se incubó a 18 °C y 26 °C respectivamente, se observó si presentó inhibición por liberación de volátiles.

### **3.6 Prueba de patogenicidad**

Se realizó con frutos de fresa comercial, se lavaron y enjuagaron con agua destilada, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 6 % por un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril para quitar exceso de hipoclorito, se dejaron escurrir, posteriormente se colocaron en recipientes (vasos) desechables estériles colocando un fruto por recipiente, se aplicó 1 ml de suspensión del hongo (*Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*) y se incubaron a 18 °C y 26 °C respectivamente por 5 días, con observaciones diarias para verificar la virulencia del patógeno, se hicieron 4 repeticiones por patógeno.

### **3.7 Preparación de suspensiones bacterianas**

Cada una de las cepas bacterianas en estudio se inocularon en matraces con 50 ml de PDI, los cuales se colocaron en agitación constante por 24 hrs, para conseguir una densidad para la bacteria 1 (B1) de:  $2.6 \times 10^8$

UFC ml<sup>-1</sup>, para la 2 (B2): 3.2 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, para la 3 (B3) de: 5.4 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> y para la 4 (B4) de: 3.8 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de suspensión.

### **3.8 Preparación de suspensión fúngica**

A partir de cultivo puro, los patógenos se transfirieron a PDA para ponerlos a desarrollar a 18°C en el caso de *Botrytis cinerea* por 72 h y a 24 °C en el caso de *Rhizopus stolonifer* por 48 h. Una vez que se desarrollaron los conidios y esporangiosporas, se adicionaron 20 ml de agua destilada estéril y se removieron las esporas presentes en el cultivo, para obtener una suspensión de 7 X 10<sup>5</sup> esporas ml<sup>-1</sup> de *Botrytis cinerea* y 4.7x10<sup>5</sup> esporangios ml<sup>-1</sup> de *Rhizopus stolonifer*.

### **3.9 Prueba de antagonismo *in vivo***

Esta prueba se realizó con frutos de fresa comercial, y una suspensión del fitopatógeno correspondiente. Los frutos se lavaron y enjuagaron con agua destilada, la desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 6 %, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, a las charolas se les colocó una toalla desechable previamente humedecida con agua destilada estéril, los frutos se escurrieron se secaron y fueron colocados diez frutillas por charola (estériles). Se aplicaron cuatro suspensiones, cada una contenía una cepa bacteriana distinta (B1, B2, B3, B4). Se aplicaron 10 mL de suspensión bacteriana con una densidad de (B1: 2.6 X 10<sup>8</sup> UFC, B2: 3.2 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, B3: 5.4 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, B4: 3.8 X 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>). La aplicación se hizo con un aspersor usando 10 ml de suspensión sobre los frutos, en todos los tratamientos, exceptuando el control al cual se le

aplicaron 10 mL de PDI. Al cabo de dos días, se aplicaron 10 mL de la suspensión de los fitopatógenos en los tratamientos respectivos, se taparon las charolas y se incubaron a 18 °C y 26 °C por 7 días, (dos días con bacteria mas 5 con patógeno inoculado) se analizaron 10 tratamientos a 18 °C, los cuales fueron:

- 1) Control (PDI)
- 2) Bacteria 1 (B1)
- 3) Bacteria 2 (B2)
- 4) Bacteria 3 (B3)
- 5) Bacteria 4 (B4)
- 6) *Botrytis cinerea* (Bot)
- 7) B1 + (Bot)
- 8) B2 +(Bot)
- 9) B3 +(Bot)
- 10) B4 + (Bot)

Otros 10 tratamientos incubados a 26°C pero con el patógeno *Rhizopus stolonifer*.

- 11) Control (PDI)
- 12) Bacteria 1 (B1)
- 13) Bacteria 2 (B2)
- 14) Bacteria 3 (B3)
- 15) Bacteria 4 (B4)
- 16) *Rhizopus stolonifer* (Rhiz)
- 17) B1 + (Rhiz)
- 18) B2 + (Rhiz)
- 19) B3 + (Rhiz)
- 20) B4 + (Rhiz)

Todos los tratamientos se incubaron por 7 días realizándose revisiones diarias de los frutos. La severidad de la infección se determinó utilizando una escala de severidad, en la cual se manejó el número de frutos dañados y los tratamientos realizados, el índice de severidad se determinó sobre la superficie de los frutos con cuatro grados de daño en base una escala establecida con las siguientes categorías 1=0-24%, 2=25-49%, 3=50-74%, 4=75-100% de daño visual por fruto. Se utilizó la ecuación descrita por Pérez *et al.*, 1995, donde:

---

Donde:

$X_i$ =Número de frutos enfermos por cada grado de daño

1, 2, 3, 4= grado de daño en la escala manejada

$N$ = Número total de frutos por unidad experimental

Una vez terminado el bioensayo se re-aisló el fitopatógeno. El diseño del experimento fue completamente al azar, se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, cada unidad experimental estuvo constituida por 10 frutos desinfectados, se utilizó ANOVA para analizar los datos estadísticamente.

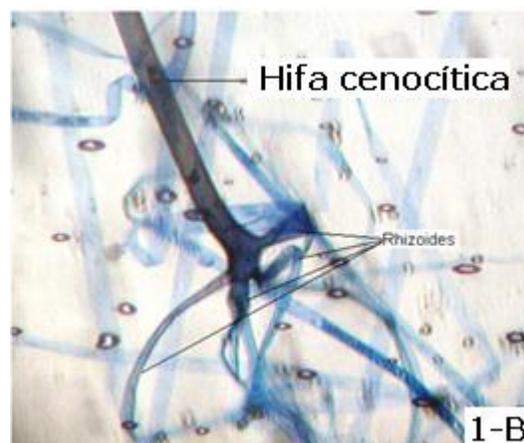
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislamiento de Hongos fitopatógenos

De frutos enfermos se aislaron 2 hongos que presentaron las características siguientes:

#### 4.1.1 *Rhizopus stolonifer*

Este hongo desarrolló en PDA un micelio de color blanco muy ramificado y aéreo, que posteriormente se tornó de color gris; también se pudieron observar a simple vista los esporangios de color negro (Figura 1). Su crecimiento en el medio de cultivo cubrió la placa en 48 h. El micelio que desarrolló el hongo produjo hifas cenocíticas, rizoides agrupados de 3 a 5, esporangióforos originados a partir de estolones, sobre los cuales se desarrollaron los esporangios que presentaron forma esférica y a partir de los cuales se encontraron las esporangiosporas de color oscuro que al liberarse permitieron la observación de la columela. Estas características concuerdan con las reportadas por Maas, (1998).



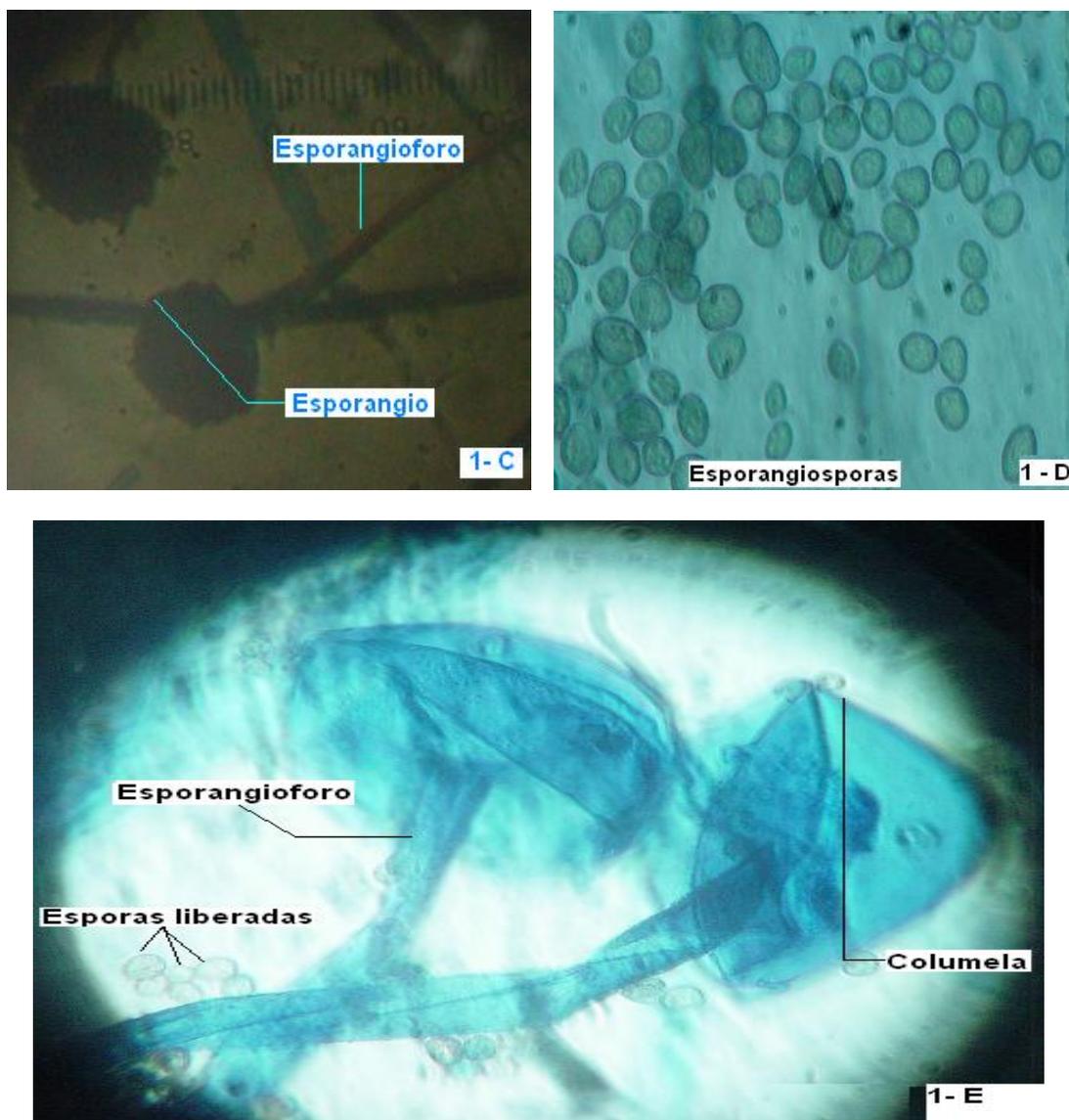
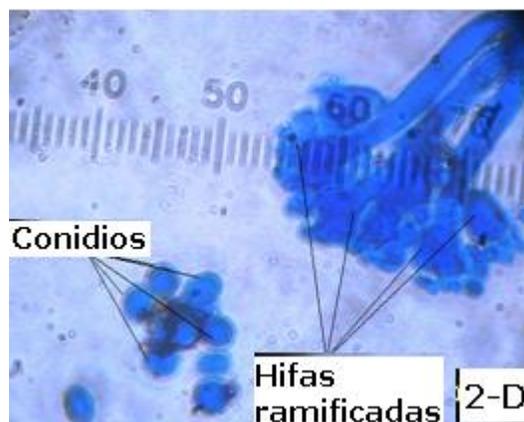
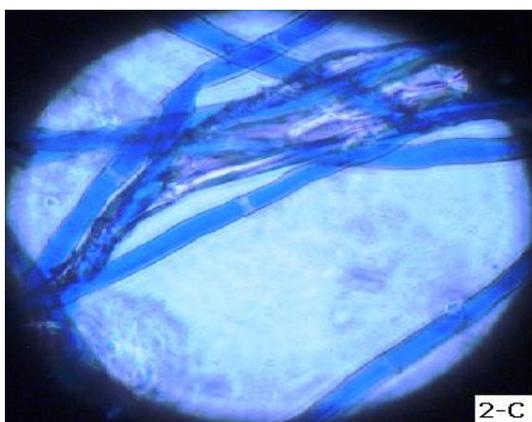
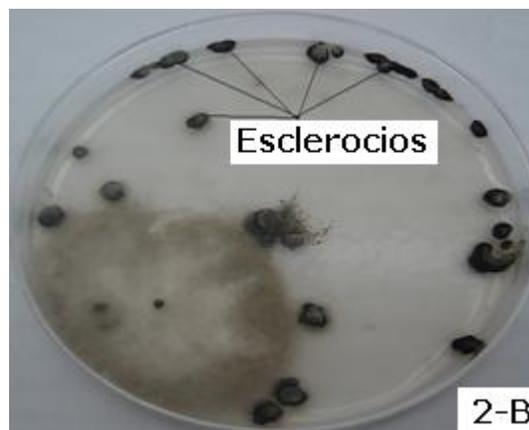


Figura 1. Características culturales y morfológicas de *R. stolonifer*. 1-A. *Rhizopus stolonifer* en PDA, 1-B: Hifas cenocíticas y rizoides; 1-C: Esporangióforo y esporangio; 1-D: esporangiosporas liberadas; 1-E: Columela, esporangióforo y esporas liberadas.

#### 4.1.2 *Botrytis cinerea*

El hongo al desarrollar en PDA presentó un micelio de color gris característico de este patógeno, el tipo de micelio creció al ras del medio de cultivo, también presentó esclerocios de forma irregular y de color

negro en cultivos con un tiempo de dos semanas de haber sido sembrados (viejos) (Figura 2). En comparación con *R. stolonifer* la velocidad de crecimiento fue más lenta en *B. cinerea* requiriendo 96 h de incubación para que el cultivo cubriera toda la caja con medio PDA. El micelio que desarrolló *B. cinerea* presentó conidióforos altos, septados, hialinos y ramificados, sobre los cuales se desarrollaron los conidios con forma ovoide generalmente y agrupados con aspecto de racimo de uvas. Estas características morfológicas coinciden con las reportadas por Barnett y Hunter (1998).



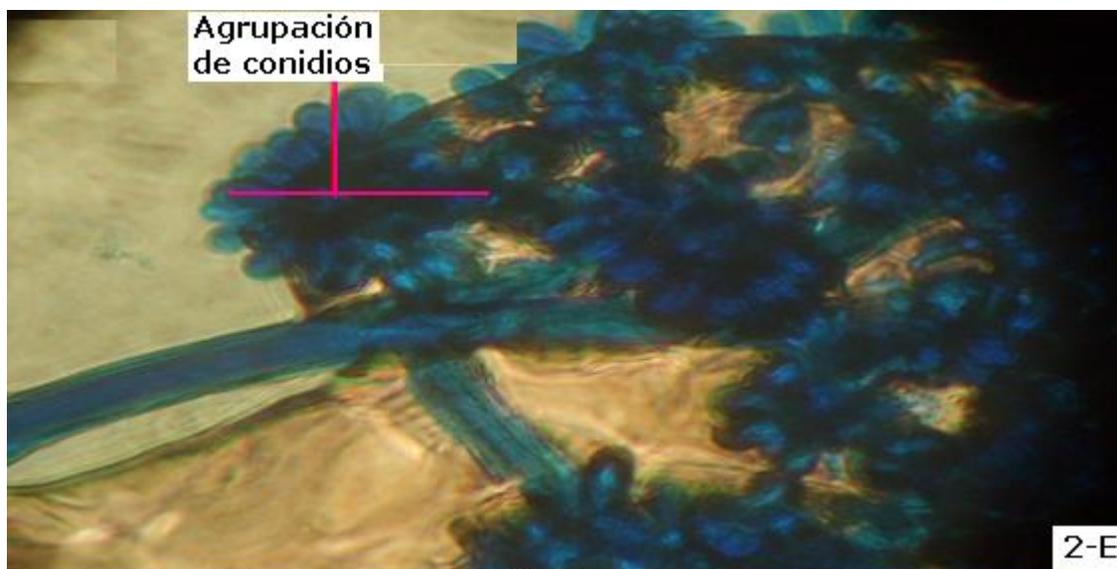


Figura 2. Características culturales y morfológicas de *Botrytis cinerea*. 2-A: Cepa de *Botrytis cinerea* en PDA; 2-B: Micelio gris y esclerocios negros; 2-C: Tipo de hifa del patógeno; 2-D: ramificaciones del patógeno así como conidios; 2-E: Conidios agrupados simulando la forma de racimos de uvas.

#### 4.2 Aislamiento de cepas bacterianas

Se aislaron un total de 39 cepas de distintos tejidos de la planta de las cuales 15, provenían de tejido de fresa silvestre y 24 de tejido de fresa comercial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislados bacterianos procedentes de distintas áreas de plantas de fresa silvestre y comercial

Planta	Área de la cual se obtuvo el aislado	No. Total de aislados
Silvestre	Hoja	7
	Raíz	4
	Fruto	4
Comercial	Hoja	15
	Raíz	5
	Fruto	4

### 4.3 Pruebas de confrontación *in vitro* de cepas bacterianas.

Al realizar las pruebas de confrontación entre los 39 aislados bacterianos tanto con *Botrytis cinerea* como con *Rhizopus solonifer* en placa, se obtuvieron 9 cepas con potencial biocontrolador para uno o ambos patógenos (Cuadro 2). Se realizó otra confrontación para observar cuales tenían mayor poder inhibitorio encontrando 4 cepas, las cuales fueron seleccionadas en base al diámetro del halo de inhibición medido en centímetros. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial oscilaron entre 67.1 % a 81.7 % para *Botrytis cinerea* y 45.5 % a 73.2 % para *Rhizopus stolonifer*. Estos porcentajes fueron obtenidos por cuatro aislados, dos obtenidos de fresa silvestre y dos de comercial, todos ellos con capacidad para controlar a ambos fitopatógenos.

Cuadro 2. Cepas bacterianas con poder antagónico vs *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*.

Cepa	<i>B. cinerea</i> (cm)	<i>R. stolonifer</i> (cm)	% de Inhibición <i>B. cinerea</i>	% de Inhibición <i>R. stolonifer</i>
FC1	-	3.52	0	50.2
FC2	-	3.53	0	50.4
FS1	-	2.58	0	3.68
<b>FS2</b>	<b>1.99</b>	<b>5.13</b>	<b>28.4</b>	<b>73.2</b>
<b>FS3</b>	<b>4.70</b>	<b>3.19</b>	<b>67.1</b>	<b>45.5</b>
FC3	0.94	0.80	13.42	11.4
<b>FC4</b>	<b>5.92</b>	<b>4.69</b>	<b>84.5</b>	<b>67</b>
<b>FC5</b>	<b>6.25</b>	<b>1.05</b>	<b>85.7</b>	<b>15</b>
FC6	1.95	-	27.8	0

Donde FC 1, 2, 3, 4, 5, 6 = Cepas bacterianas aisladas de tejido foliar de fresa comercial, FS 1, 2, 3 = Cepas bacterianas aisladas de tejido foliar de fresa silvestre. Se excluyó la cepa FC3 debido a que el diámetro presentado fue el menor en los dos patógenos mientras que en los demás el diámetro es mayor.

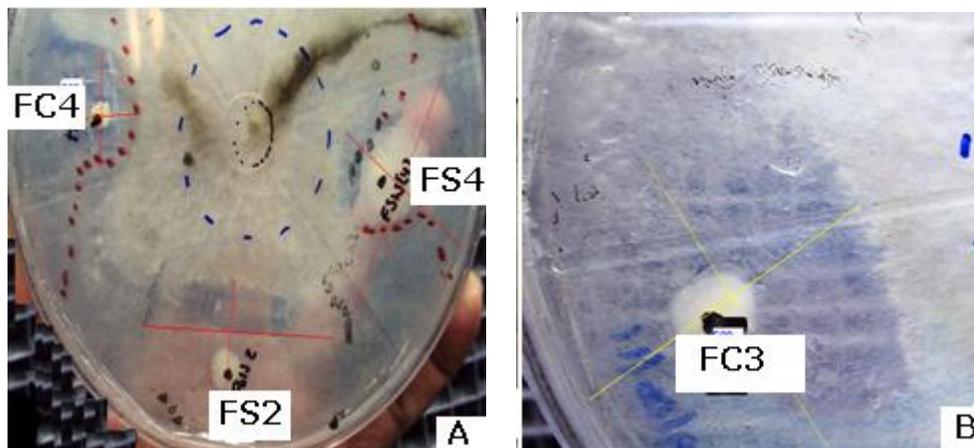


Figura 3. Confrontación in vitro de B1, B2, B3 y B4 vs *B. cinerea*. Donde B1= FS2, B2=FS4, B3=FC3 y B4=FC4

#### 4.4 Prueba de volátiles.

Esta prueba se realizó para observar si las cepas liberaban metabolitos volátiles que lograran el control de los patógenos. La prueba arrojó que ninguno de los aislados mostró control por liberación de volátiles.



Figura 4. Prueba de inhibición por la liberación de sustancias volátiles.

#### 4.5 Patogenicidad de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*

En la prueba de patogenicidad, *Botrytis cinerea* mostró un 100% de virulencia, mientras que *Rhizopus stolonifer* mostró solo un 50%.

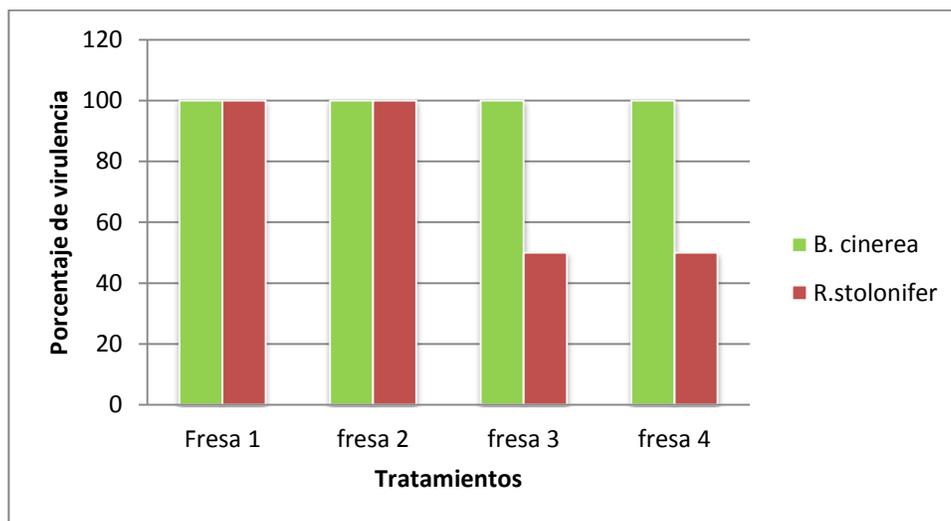


Figura 5. Porcentaje de virulencia de las cepas de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa

#### 4.6 Determinación del tipo de bacteria utilizando técnica de Gram

Las cuatro cepas resultaron ser Gram negativas 3 de ellas con forma de bacilo y una más con forma de coco.

#### 4.7 Pruebas de Biocontrol de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* *in vivo*

##### 4.7.1. Biocontrol de *Botrytis cinerea*

El comportamiento de los tratamientos a los cuales se aplicaron bacterias y posteriormente se retaron con *Botrytis cinerea* (B1+Bot, B2+Bot, B3+Bot, B4+Bot) puede observarse en la Figura 6. Cabe señalar que el tratamiento F (B4+Bot) fue el que presentó el menor índice de severidad de la

infección ( $p \leq 0.05$ ) (después del control negativo con PDI), le siguió el tratamiento C (B1+Bot) ambos tratamientos (B4+Bot, B1+Bot) con una capacidad de control del crecimiento de *Botrytis cinerea* (37.5% y 30% respectivamente). Los tratamientos D (B2+Bot) y E (B3+Bot) por su parte, presentaron un índice de severidad significativamente mayor que los dos anteriores ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, éste fue significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) al presentado en el tratamiento B (*Botrytis*) con solo *Botrytis cinerea* el cual produjo un 90 % de infección.

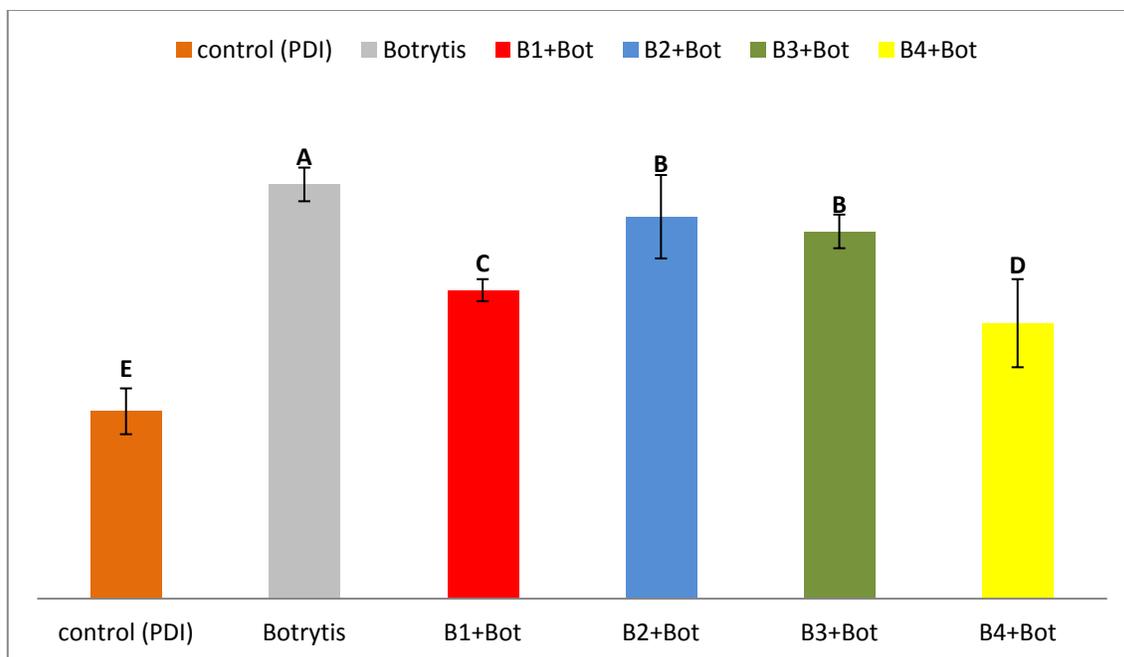


Figura 6. Índice de severidad del daño producido por *Botrytis cinerea* en frutos de fresa el último día del experimento. Comparación de medias Tukey ( $n=3$ ) con diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ).

#### 4.7.2 Biocontrol de *Botrytis cinerea* en el tiempo

El efecto de control de los tratamientos valorados sobre *B. cinerea* a lo largo del tiempo de evaluación se muestra en la Figura 7.

Cabe resaltar que los tratamientos C, D, E y F (B1+Bot, B2+Bot, B3+Bot, B4+Bot, respectivamente) presentaron un poder biocontrolador de *B. cinerea* similar al exhibido por el control negativo (PDI), durante los primeros 3 días de muestreo pues, a diferencia del Tratamiento B (*Botrytis*), los frutos permanecieron con el mínimo síntoma de infección. Este control se mantuvo aun por debajo del 50% para el cuarto día de evaluación en los tratamientos F, D y C (B4+Bot, B2+Bot y B1+Bot).

Para el día 5 de la evaluación, la infección empezó a incrementarse, no obstante, los tratamientos que mejor lograron controlar el avance de la enfermedad fueron el F (B4+Bot) y el C (B1+Bot) quienes permitieron un porcentaje menor al 50 % de infección en los frutos.

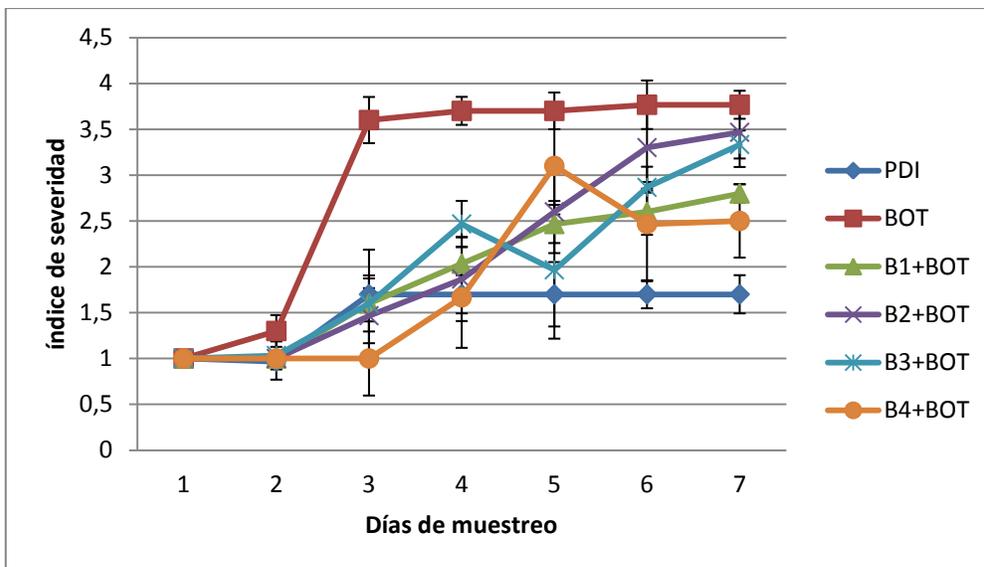


Figura 7. Índice acumulado de severidad del daño producido por *Botrytis cinerea* en frutos de fresa a lo largo del experimento (7días). Comparación de medias Tukey (n=3) con diferencia significativa de ( $P < 0.05$ )

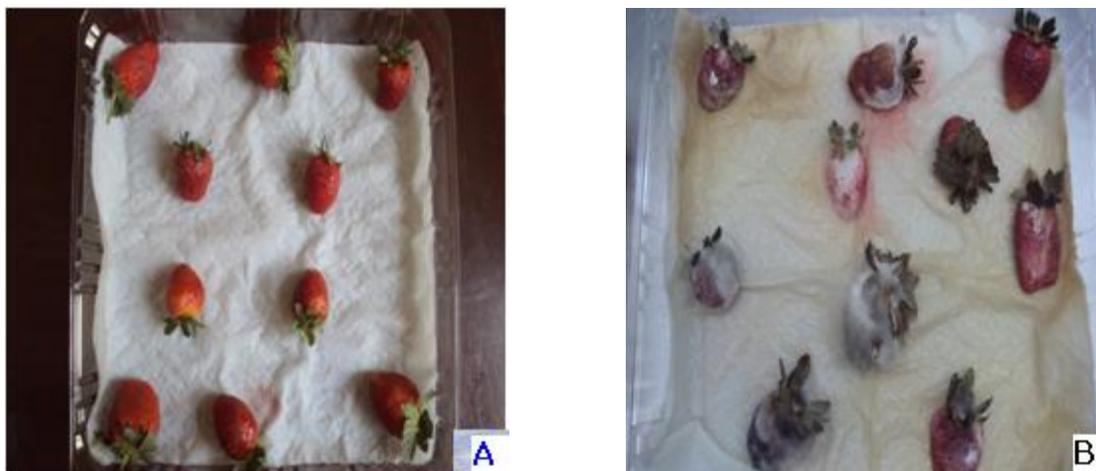


Figura 8. Antagonismo in vivo de *Botrytis cinerea* aplicando bacteria. 6-A: Frutos al inicio del experimento; 6-B Frutos + el patógeno al séptimo día del experimento aplicando el tratamiento F (B4+Bot).

#### 4.8 Biocontrol de *Rhizopus stolonifer*

El comportamiento mostrado por los tratamientos C, D, E y F (B1+Rhiz, B2+Rhiz, B3+Rhiz y B4+Rhiz) en los que se aplicó primero la bacteria y después el patógeno se ve plasmado en la Figura 9, donde el tratamiento D (B2+Rhiz) mostró una mayor eficiencia en el control de la incidencia de la enfermedad ( $p \leq 0.05$ ) (después del control negativo con PDI). Los tratamientos C, E y F (B1+Rhiz, B3+Rhiz y B4+Rhiz) mostraron una nula capacidad de inhibición del patógeno, presentando índices de severidad incluso superiores a los presentados por el tratamiento B (*Rhizopus stolonifer*) produciendo un 100% de la enfermedad.

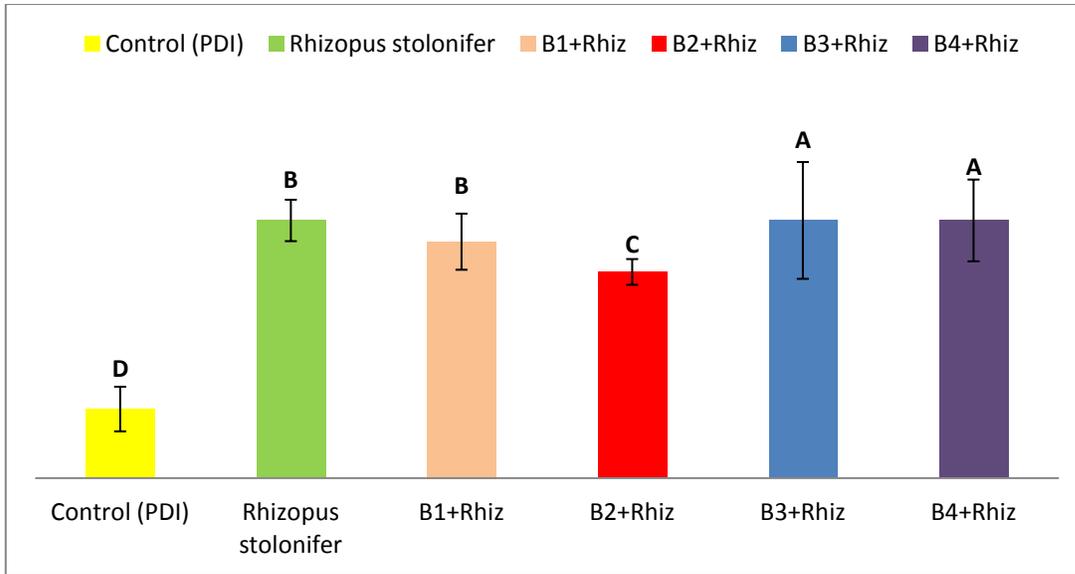


Figura 9. Índice de severidad del daño producido por *Rhizopus stolonifer* en frutos de fresa.

Comparación de medias Tukey (n=3) con diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ).

#### 4.8.1 Biocontrol de *Rhizopus stolonifer* en el tiempo

El efecto de control de los tratamientos evaluados sobre *Rhizopus stolonifer* a lo largo del tiempo de evaluación se muestra en la Figura 10.

Cabe resaltar que los tratamientos C, D, E y F (B1+Rhiz, B2+Rhiz, B3+Rhiz y B4+Rhiz) presentaron un poder biocontrolador de *Rhizopus stolonifer* similar al exhibido por el control negativo (PDI), durante los primeros 4 días de muestreo manteniendo la enfermedad por debajo de un 50%, a diferencia del Tratamiento B (*Rhizopus*), la incidencia de la enfermedad comenzó a elevarse el cuarto día.

Para el día 5 de la evaluación, la infección comenzó a incrementarse, no obstante, los tratamientos que mejor lograron controlar el avance de la enfermedad fueron el D y el C (B2+Rhiz y B1+Rhiz), los cuales

permitieron un control incipiente de infección en los frutos (20 % y 8.5 % respectivamente). Es importante mencionar que estos dos tratamientos (B2+Rhiz y B1+Rhiz) lograron mantener la enfermedad por debajo del 50 % el 71 % para el final del experimento.

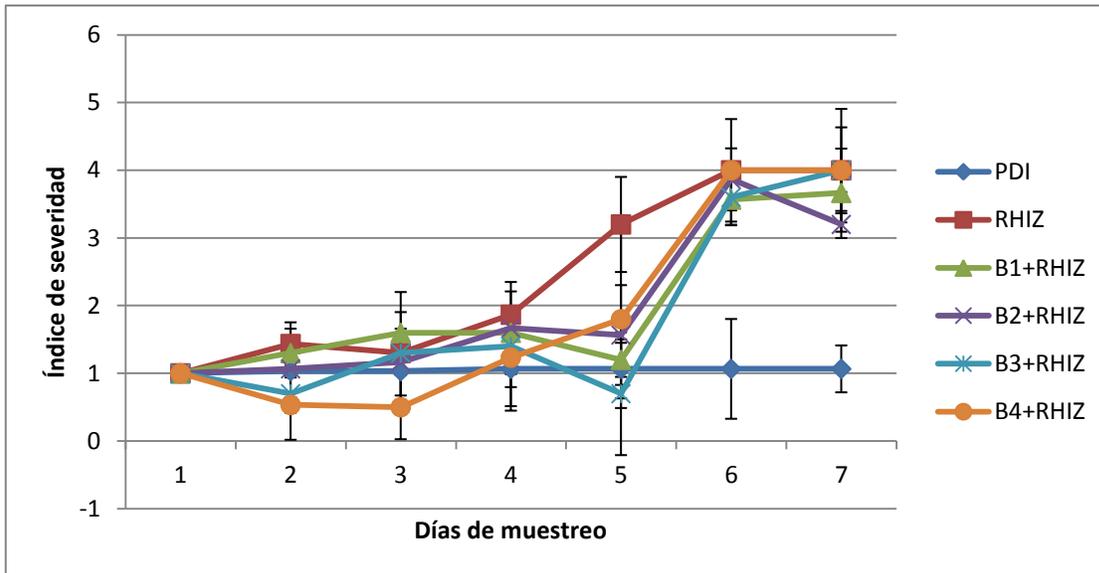


Figura 10. Índice acumulativo de severidad del daño producido por *Rhizopus stolonifer*  
Comparación de medias Tukey (n=3) con diferencia significativa de ( $P < 0.05$ )



Figura 11. Antagonismo in vivo de *R. stolonifer* aplicando bacteria.  
9-A: Frutos al inicio del experimento; 9-B Frutos + el patógeno al séptimo día del experimento aplicando el tratamiento D (B2+Rhiz).

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo se aislaron cepas bacterianas de tejidos de fresa silvestre y comercial, de las cuales se obtuvieron 4 cepas antagónicas 2 de tejido de fresa silvestre y 2 de tejido de fresa comercial, la incidencia de *Botrytis cinerea* fue reducida por una de las cepas procedentes de fresa silvestre y una de las cepas procedentes de fresa comercial. Mientras que para *Rhizopus stolonifer* el biocontrol fue realizado por las dos cepas provenientes de fresa silvestre. Cabe destacar que el mayor biocontrol se logró en el caso de *B. cinerea*. Lo anterior pudo deberse a las condiciones de temperatura en las que se llevaron a cabo los bioensayos. Como se mencionó anteriormente, la temperatura de almacenamiento es determinante para que se presente la enfermedad, pues la mayoría de los hongos pueden desarrollarse a temperaturas ambientales en condiciones de alta humedad (Alvarado-Hernández, 2009). En general las temperaturas máximas de crecimiento de los hongos van de 32 °C a 38 °C, siendo la óptima de 20 °C a 25 °C y la mínima puede ser de 15 °C, con algunas excepciones como *Penicillium spp.* y *Botrytis cinerea* mismos que pueden crecer a temperaturas de 4 °C (Rivera, 2008). En el caso de este trabajo la temperatura a la que fueron almacenados los frutos (18 °C) pudo conferirle ventajas para su desarrollo en comparación con *Rhizopus stolonifer* ya que ese bioensayo fue almacenado a 26 °C. Uno de los posibles mecanismos de acción de las cepas silvestres pudo ser la competencia por nutrientes pues el patógeno aprovecha lesiones provocadas por el mal manejo del producto colonizándolo rápidamente y desarrollando la enfermedad (Velázquez-del Valle *et al.*, 2008), pudiendo competir en ese momento el antagonista con el patógeno por los nutrientes exógenos.

Microorganismos epífitos aislados de la superficie de frutos y hojas de manzanas y peras, se evaluaron para conocer su actividad antagónica

contra *P. expansum* en peras, se seleccionó la bacteria *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini, Mergaert, Benji, Mielcarek, Izard, Kersters y De Ley (CPA-2), la cual fue efectiva contra *B.cinerea*, *P. expansum* y *R. stolonifer*, obteniéndose un 80 % de reducción de la pudrición causada por *B. cinerea* (Nunes *et al.*, 2001). La competencia por los nutrientes ha sido valorada en estudios *in situ*. Dos levaduras antagonistas *C. laurentii* (aislado 317) y *Candida ciferrii* Kreger-van Rij (aislado 283) obtenidas de la superficie de manzanas sanas, controlaron el moho azul causado por *P. expansum*. Ambos antagonistas redujeron la incidencia de la enfermedad en un 80 % a 25 °C, y a 5 °C el segundo aislamiento mantuvo su eficiencia en un 50 % (Vero *et al.*, 2002). Estudios previos realizados por Vero y Mondino (1999), demostraron que estas cepas no producen antibióticos, y que compiten por los nutrientes en las heridas de los frutos impidiendo la colonización de las mismas por parte del patógeno.

Por otro lado *R. stolonifer* secreta enzimas pectinolíticas que degradan la pared del fruto permitiendo la liberación de una sustancia líquida, dando como resultado la pudrición blanda (Maas, 1998; Barkai-Golan, 2001), por ello otro posible mecanismo de acción por parte de las antagonistas podría ser la liberación de alguna sustancia antibiótica que disminuya la actividad de las enzimas del patógeno (Rodríguez, 2002), aún cuando en este caso no fue demostrado. Sin embargo, hace falta hacer más abundante para elucidar los mecanismos de acción de los antagonistas para con los patógenos.

En los últimos años el control biológico ha sido objeto de estudio y se ha demostrado la eficiencia de varios microorganismos en el control de enfermedades postcosecha, en lo que respecta a este trabajo la eficiencia

de dos cepas aisladas precisamente de la superficie del fruto resultaron tener un gran poder antagónico a *Botrytis cinerea* siendo éstas obtenidas una de tejido de fresa silvestre y otra de tejido de fresa comercial, lo cual corrobora lo mencionado por Janisiewicz y Korsten en el 2002, quienes reportaron que la superficie de los frutos es un buen lugar para encontrar microorganismos capaces de disminuir enfermedades postcosecha. En este sentido, una de las características que deben ser tomadas en cuenta en un microorganismo antagonista es su efectividad para controlar un amplio rango de microorganismos patógenos (Wilson y Wisniewski, 1998). En este trabajo se pudo observar que el tratamiento A (PDI) fue efectivo para los dos patógenos, lo cual resulta promisorio para ser aplicada en biocontrol, sin embargo, hace falta realizar más estudios sobre ello. Esta cepa se obtuvo de tejido foliar de fresa silvestre, lo cual resulta interesante ya que el aislamiento de los antagonistas puede mejorarse usando la fruta de huertos no fumigados, o en este caso silvestre, donde las poblaciones naturales no han sido alteradas por el uso de químicos, y el conjunto de antagonistas potenciales es mayor que en frutos químicamente tratados (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Cabe señalar que los microorganismos antagónicos, pueden realizar esta función frente a los patógenos usando de distintos mecanismos, tales como: la antibiosis, la producción de enzimas líticas, el parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, y la inducción de resistencia (Janisiewicz y Korsten en el 2002). En algunos casos pueden presentarse varios mecanismos de acción.

La forma de biocontrol ejercida por F y C (B4+bot y B2+Bot) pudo deberse a la competencia por nutrientes ya que se sabe que *Botrytis cinerea* es un moho postcosecha típicamente dependiente de los nutrientes, siendo un hongo necrotrófico sus esporas requieren de nutrientes exógenos para poder germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar la

fruta (Spadaro *et al.*, 2004). Esos nutrientes los encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos hongos (Lara, 2006). Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que el antagonismo se haya llevado a cabo por medio de la antibiosis, ya que hay microorganismos que pueden producir sustancias antibióticas que logren lisar células de otros organismos patógenos (Rubio y Fereres, 2005) logrando con ello su control.

La bacteria B4, corresponde a un aislado de tejido de fresa comercial, en el que se obtuvo el mejor biocontrol mostrado por las cuatro cepas utilizadas, el hecho de ser una cepa aislada de tejido de fresa comercial podría hablar de la adaptación de la cepa a la región donde se obtuvo (Visintin *et al.*, 2010), pudiendo ser que por ello la cepa B4 (aislada de tejido foliar de fresa comercial) mostrara un mejor biocontrol sobre el patógeno que B1 (aislada de tejido foliar de fresa silvestre), sin embargo, cabe mencionar que el biocontrol mostrado por la cepa B1 fue menor en sólo 7.5 %.

En el control postcosecha de diversas enfermedades entre ellas *R. stolonifer* se ha reportado la eficiencia de levaduras aisladas de la superficie de frutos, debido a su rápida colonización y sobrevivencia sobre los frutos, compitiendo por nutrientes, además de que generalmente no son afectadas por fungicidas comerciales (Smilanick *et al.*, 1993).

En lo que respecta a los microorganismos más comúnmente reportados como biocontroladores postcosecha Hernández-Lauzardo *et al.*, en el 2007 reportaron que los microorganismos más utilizados son las levaduras. En este sentido, Guerrero-Prieto *et al.* (2004), lograron aislar e identificar una levadura epífita de manzana (*Malus sylvestris* (L) Mill. Var *doméstica* (Borkh.) Mansf.), utilizada para el biocontrol en postcosecha, se ha encontrado también que las levaduras *Trichosporon pullulans*,

*Cryptococcus laurenti*, *Rhodotorula gliutinis*, y *Pichia membranefaciens*, son efectivas para controlar *B. cinerea* en frutos de cereza almacenadas a 25 °C, sin embargo a bajas temperaturas el desarrollo de dos de las levaduras fue nulo (Qin *et al.*, 2004). De igual manera, estudios realizados por Latorre *et al.*, 1997, mencionaron que la aplicación de la levadura *T. harzianum* reduce parcialmente la enfermedad causada por *B. cinerea* en frutos de uva y manzana. No obstante lo anterior, en este trabajo se pudo observar la eficiencia de cepas bacterianas que permitieron el control.

Cabe señalar que en algunos trabajos se ha destacado la importancia de la densidad de inóculo para lograr la efectividad en la acción antagónica de diversas cepas microbianas sobre algunos patógenos. En este trabajo las concentraciones manejadas coinciden con las reportadas por Droby *et al.* (1989) y McLaughlin *et al.* (1990) quienes observaron que los microorganismos tienen una mejor actividad antagónica en una concentración de  $10^8$  UFC/ml, sin embargo podría explorarse incrementar la densidad de los inóculos empleados para ver si se obtiene un mejor efecto biocontrolador, de igual manera puede buscarse la combinación de estrategias de control e incluso la exploración del uso de ambas cepas antagonistas para determinar si son capaces de presentar un sinergismo que propiciara el incremento de dicho poder biocontrolador.

Cabe mencionar que hubo biocontrol por parte de dos cepas aisladas de tejido silvestre, y una de ellas logró reducir la incidencia de la enfermedad de ambos patógenos, por lo que podemos decir que su efecto biocontrolador se manifiesta con más de un patógeno lo cual le confiere potencial para ser usado como un biocontrolador eficaz, no obstante hay que realizar más trabajos.

Existe reporte de que bacterias aisladas de superficie de hojas y frutos de pera y manzana, una de las cepas aisladas la bacteria *Pantoea*

*agglomerans* fue usada como antagonista de *Rhizopus stolonifer* y los frutos de pera y manzana no presentaron lesiones (Nunes *et al.*, 2001b); un reporte contrario fue hecho por Francés *et al.* (2006) quienes encontraron que al utilizar otra cepa de *Pantoea agglomerans*, el biocontrol fue nulo pues el patógeno se mostró altamente agresivo con frutos de manzana, pera, nectarina, naranja y fresa. En este experimento las bacterias B2 y B1 mostraron control sobre *R. stolonifer*, siendo B1 la mejor para mantener control sobre los dos fitopatógenos tratados (*B. cinerea* y *R. stolonifer*).

En un estudio reportado por Qin *et al.* (2004), se encontró que diversas levaduras (*Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia membranefaciens*), mostraron un control efectivo de *R. stolonifer* en frutos de cereza a 25 °C. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, el cual se realizó a 26 °C, obteniéndose buenos resultados con dos de las cepas bacterianas, mismas que mostraron un control sobre *R. stolonifer* de 20 % y 8.5 % respectivamente. Cabe señalar que estos porcentaje de control fueron menores a los reportados por Zhang *et al.* (2007) quienes obtuvieron un 80 % de control de la incidencia de la enfermedad en durazno almacenado a 25 °C utilizando a *C. laurentii*. No obstante lo anterior, debe señalarse que el efecto biocontrolador de las cepas puede variar dependiendo del fruto, la cepa y las condiciones medioambientales, por lo cual los resultados obtenidos son interesantes y destacan el potencial de las cepas para biocontrolar a *B. cinerea* en fresa bajo las condiciones reportadas.

## 6. CONCLUSIÓN

En este trabajo se lograron aislar 9 cepas con potencial biocontrolador para uno o ambos patógenos *in vitro*.

La actividad biocontroladora de los patógenos presentada por las cepas bacterianas aisladas osciló entre 67.1 % a 81.7 % para *Botrytis cinerea* y 45.5 % a 73.2 % para *Rhizopus stolonifer*, a partir de cuatro aislados dos obtenidos de fresa silvestre y dos de fresa comercial con potencial para controlar ambos fitopatógenos.

El control *in vivo*, el control se logró por parte de 3 bacterias, 2 provenientes de tejido de fresa silvestre y 1 de tejido de fresa comercial con antagonismo sobre *B.cinerea* y *R. stolonifer* mostrando buen potencial biocontrolador.

Los posibles mecanismos de acción pudieron haber sido el antagonismo por nutrientes y/o antibiosis.

Este trabajo es promisorio para el control biológico de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, sin embargo hace falta realizar más estudios para poder determinar con precisión el o los mecanismo de acción empleado por los aislados bacterianos, así como experimentar con las concentraciones del inóculo bacteriano para poder determinar la concentración con mayor eficiencia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Abdel-Mallek, A., Hemida, S.K., y Bagy, M.M. 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*. 130:109-116.
- ✓ Adaskaveg, J.E., Förster, H., y sommer, N.F. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. Pp 163-195. In: A. Kader (ed) *Postharvest Technology of horticultural Crops*. University of California. Oakland, California, USA. 535 p.
- ✓ Agrios, G.N. 2007. *Fitopatología* 2ª edición. Editorial Limusa. México 838.
- ✓ Alvarado-Hernández, A. 2009. Efecto antifúngico e *in situ* del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Instituto Politécnico Nacional, Centro de desarrollo de Productos Bióticos.
- ✓ Anderson, J.P. 1924. *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology*. 14:152-155.
- ✓ Barkai-Golan R. 2001. Attack mechanisms of the pathogen. *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Science B.V. New York, USA. 418.
- ✓ Barnett, H.L y Hunter, B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. The American Phytopathological Society. 218 pp.

- ✓ Batta, Y.A. 2004. Postharvest biological control of Apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated an invert emulsion. *Crop Protection*. 23:19-26.
- ✓ Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Díaz-Pérez, J.C., y Cano-Ochoa, C.F. 2000. Evaluation of the fungicidal proprieties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of "ciruela" fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 20:99-106.
- ✓ Bazza, Zeinab, E.M, El.,Farrag-Hala, A., Fouly Mohie, E.D.Z.EL., and Tablawy Seham, Y.M.EL. 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* sedes oil on growt, spore germination and toxin production of fungi. *Radiation Physics and Chemistry*.60:181-189.
- ✓ Blandino, A., Dravillas, K., Cantero, D., Pandiella, S.S., y Webb, C. 2001. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochemistry*. 37:497-503.
- ✓ Camacho B.G. y Sánchez B.C. 2003. *Caracterización de la cadena agroalimentaria/agroindustrial/nacional, identificación de sus demandas tecnológicas: fresa*, Morelia, Mich., CENAPROS-INIFAP.
- ✓ Castoria, R., De curtis, F., Lima, G, Pacifico, S., y DeCicco, V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 2:7-17.

- ✓ Ceballos, V.M. 2004. Control biológico de plagas. Departamento de Plagas Agrícolas en la Dirección de Protección de Plantas del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). <http://www.monografias.com/trabajos29/control-plagas/control-plagas2.shtml>
- ✓ Chaves N. y Wang A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía costarricense.
- ✓ Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier JM., Simon A., y Viaud M. 2007 *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiol Lett. 277:1-10. Review.
- ✓ Cia, P., Pascholati, F., Benato, E., Camili, E., y Santos, C.A. 2007. Effects of gamma and UV-C irradiation on the postharvest control of papaya anthracnose. Postharvest Biology and Technology. 43:366-373.
- ✓ Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. a. & Jarvis, W. R. 1980. The Biology of *Botrytis*. Ed.: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. And Jarvis, W. R. Academic Press. London.
- ✓ COEFREM, A.C. 2007. LA FRESA EN MICHOACAN RETOS DEL MERCADO. <http://www.rimisp.org/getdoc.php?docid=12398>
- ✓ CONAFRESA 2002. [http://conafresa.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=16&Itemid=32](http://conafresa.com/index.php?option=com_content&task=view&id=16&Itemid=32)

- ✓ DeBach, P. 1968. Éxitos, tendencias y posibilidades futuras. Pp 789-831. In: P. DeBach (ed) Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas CECSA, México.
- ✓
- ✓ DeBach, P. 1977. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 399 p
  
- ✓ Droby S., Chalutz E., Wilson C.L y Wisniewski M.E. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaromyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Canadian Journal of Microbiology. 35: 794-800.
  
- ✓ Elad, Y., Boyle, P. y Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma spp.* On *Rhizoctonia solani* and *rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology. 73:85-8.
  
- ✓ Espinosa, M. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis para obtener grado de Doctor en Universidad de Cádiz. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Microbiología, Medicina preventiva y Salud pública. Fisiología y Genética.
  
- ✓ Fogliata G.M., Torres L.G.J. y Ploper L.D. 2001. Detection of imazail-resistant strain of *penicillium digitatum* Sacc. In citrus packing houses of Tucuman Province (Argentina) and their behavior against current employed alternative fungicides. Revista Industrial de Agricultura Tucuman. 77:71-75.
  
- ✓ Föster, H., Driever, G.E., Thompson, D.C., and Adaskaveg, J.E. 2007. Postharvest decay management for stone fruit crops in

California using the "reduced-risk" fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Diseases*. 91:209-215.

- ✓ Fraire C. M., Yañez M.M., Nieto A.D., y Vázquez G.G. 2003. Hongos Patógenos en Frutos de Fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 285-291.
- ✓ Francés, J., Bonaterra, A., Moreno. M.C., Cabrefiaga, J., Badosa, E., y Montesinos, E. 2006. Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*. 39:299-307.
- ✓ Fundación Para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura. 2009. Productos Agroindustriales Ricos en Antioxidantes, a base de Berries Nativos. 34P. <http://bibliotecadigital.innovacionagraria.cl/gsd/collect/publicacion/index/assoc/HASH0151.dir/51%2526%2523095%253BLibro%2526%2523095%253BBerriesNativos.pdf?ie=UTF-8&oe=UTF-8&q=prettyphoto&iframe=true&width=90%&height=90%>
- ✓ Gabler, F.M., Mansour, M.F., Smilanick, J.L., y Mackey, B.E. 2004. Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 96:1354-1360.
- ✓ Genoscope. 2005. Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions. <http://genoscope.cns.fr>.

- ✓ Groves, J.W. y Loveland, C.A. 1953. The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Micologia*. 45:415-425.
- ✓ Guédez C., Cañizález L., Castillo C. y Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp*). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29:34-38.
- ✓ Guerrero-Prieto, V.M., Treviso-Enriquez, M.G., Gardea-Béjar, A.A., Figueroa-Valenzuela, C., Romo-Chacón, A., Blanco-Pérez, A.C. y Curry, E. 2004. Identificación de levaduras epifitas obtenidas de manzana [*Malus sylvestris* (L.) Mill var. *Domestica* (Borkh.) Mansf.] para el control biológico poscosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22:223-230.
- ✓ Hernández, A.N. y Santander J. L. 1999. Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443. *Cultivos Tropicales*. 20(1):21-25.
- ✓ Hernández-Lauzardo, A., Hernández-Martínez, M., Velázquez-del Valle M., Guerra Sánchez M. y Melo Giorgana, G. 2007. Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. (Ex Fr.) vuill. Y *Mucor spp*. *Revista Mexicana de fitopatología*. 25: 109-113.
- ✓ Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M.J. y Gavara, R. 2006. Effect of calcium dips and chitosan coating on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*. 39:247-253.

- ✓ Hokkanen, H.M. 1985. Success in classical biological control. CRC Critical Reviews in Plant Science. 3:35-72.
- ✓ Holcroft, D.M., Kader, A.A. 1999. Controlles atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology. 17:19-32.
- ✓ Holmes G. J. y Eckert J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology. 89:716-721
- ✓ Holmes, G y Stange, R. 2002. Influence of wound type and storage duration on susceptibility of sweet potatoes to *Rhizopus soft rot*. Plant diseases. 86:345-348.
- ✓ Howard, C., J. Mass, C. Chandler y E. Albrechts. 1992. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Diseases. 76:976-981.
- ✓ INFOAGRO 2002. <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis2.htm>
- ✓ INFOCIR, 2006. **Producción de Fresa en México.** Boletín Mensual de Inteligencia Agroindustrial No. 8 Vol. II. **Producción de Fresa en México.**
- ✓ Ingeniería Agrícola. 2008. La frutilla, Manejo Básico del cultivo. Pp 43. <http://www.ingenieriaagricola.cl/downloads/frutillas.pdf>

- ✓ Janisiewicz W y Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual review of Phytophology. 40, 411-441.
- ✓ Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M y Rengifo, T. 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas. Gobernación de Antioquía, MANA, CORPOICA, Centro de Investigación "La Selva". FAO 2007.
- ✓ Kader, A.A. 1991. Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. Pp. 145-151. In: J.J. Luby, and A. Dale (eds.). The strawberry into the 21<sup>st</sup>. Century. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 288p.
- ✓ Kapat, A., Zimand, G. y Elad, Y. 1998. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycologi Research*. 102: 1017-1024.
- ✓ Ke, D., Zhou, L., Kader, A.A. 1994. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *Journal of the American society for Horticultural Science*. 19:971-975.
- ✓ Lara Rodríguez E. 2006. Aislamiento y caracterización de levaduras antagonistas de hongos fitopatógenos postcosecha de cítricos. Tesis en Ciencias en Biotecnología Genómica. 78 P.
- ✓ León G. 2009. Disminuyó considerablemente la producción de fresa en los últimos años; requiere tecnificarse. La jornada Michoacán.

- ✓ Li, C. y Kader, A.A. 1989. Residual effects of controlled atmospheres on postharvest physiology and quality of strawberries. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 114:629-634.
- ✓ Lisker, N., Karen-Shacham, Z., Saring P., Zutkhi, Y., y Ben-Arie, R. 1996. The biology and pathology of the fungus *Rhizopus stolonifer* cause of black mould diseases of table grapes in Israel. *Plant Pathology* 45:1099-1109.
- ✓ Maas, J.L. 1998. Compendium of strawberry diseases. Second edition. The American Phytopathological Society. Pp 98. (41)
- ✓ Mari, M., Gregori, R. y Donati, I. 2004. Postharvest control of *Monilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by paracetic acid. *Postharvest Biology and Technology*. 33:319-325.
- ✓ McLaughlin R. J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., y Chalutz E. 1990. Effect of inoculums concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida sp.* *Phytopathology*. 80:456-461.
- ✓ Muñoz P. C. y Ávila F. S. 2005. Los efectos de un impuesto ambiental a los plaguicidas en México. *Gaceta ecológica*. 74:43-73.
- ✓ Neri, F., Mari, M y Brigati, S. 2006. Control de *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*. 55:100-105.
- ✓ Northover, J., y Zhou, T. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and

- Pseudomonas syringe*. Canadian Journal Plant Pathology. 24:144-153.
- ✓ Nunes, C., Usall, J., Teixodó, N., y Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. International Journal of Food Microbiology. 70:53-61.
  - ✓ Nunes, C., Usall, J., Teixodó, N., Ochoa de Eribe, X., y Viñas, I. 2001<sup>a</sup>. Control of post-harvest decay of apples by preharvest and post-harvest application of ammonium molybdate. Pest Management Science. 57:1093-1099.
  - ✓ Nunes, C., Usall, J., Teixodó, N., y Viñas, I. 2001<sup>b</sup>. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. International Journal of Food Microbiology. 70:53-61.
  - ✓ Obagwu, J. y Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest biology and technology. 28: 187-194.
  - ✓ Pelayo, C., Ebeler, S.E., y Kader, A.A. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5°C in air or air + 20kPa CO<sub>2</sub>. Postharvest Biology and Technology. 27:171-183.
  - ✓ Pérez, M.N., Flores, P.J., García, V.L., y Lozano, V.C. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y

- efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 13:1-9.
- ✓ Ponton, J., Moragues, M.D., Gené, J., y Quindos, G. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos; *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Vuillemin. *Revista Iberoamericana de Micología*. Pp38.
  - ✓ Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. & Van Kan, J. A. L. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *En: J. W. Kronstad, (Ed), Fungal Pathology, Kluwer Academic Publishers*.33-64.
  - ✓ Qadir, A., y Hashinaga, F. 2001. Inhibition of postharvest decay of fruits by nitrous oxide. *Postharvest Biology and Technology*. 22:279-283.
  - ✓ Qin, G., Shiping, T., y Xu, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeast in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 31:51-58.
  - ✓ Rivera Coto German. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. Primera reimpresión: editorial universidad estatal a distancia san José Costa Rica, 2007. Pps 44-45.
  - ✓ Rivera C., J.M. 2008. Deterioro postcosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. Departamento de protección vegetal, Honduras. Hoja técnica.

- ✓ Rodríguez, L. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- ✓ Rubio, V.S., y Fereres, C.A. CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LOS CULTIVOS. Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC). Dpto. Protección Vegetal. Serrano 115 Dpto. 28006 Madrid. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres,%202005.pdf>
- ✓ SAGARPA 2005. PLAN RECTOR SISTEMA NACIONAL FRESA SEGUNDA FASE: DIAGNÓSTICO INICIAL BASE DE REFERENCIA ESTRUCTURA ESTRATÉGICA DOCUMENTO VALIDADO POR EL COMITÉ SISTEMA PRODUCTO FRESA EN SESIÓN DEL 18 DE MARZO DE 2005 SAGARPA, MÉXICO D.F.
- ✓ SAGARPA 2008.
- ✓ SAGARPA 2009. SIAP, 2009. Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=173&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Fresa.html>
- ✓ SAGARPA 2010. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=197](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=197)

- ✓ Sandoval, B.C. 2004. Manejo Integrado de Enfermedades en cultivos Hidropónicos. Manual técnico. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación oficina regional para América Latina y el Caribe.
- ✓ Schipper, M.A. 1984. A Revision of the Genus *Rhizopus*. Studies in Mycology. Serie No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baam, The Netherlands. 34 P.
- ✓ Sertox.2004. Revista de Toxicología en línea.  
<http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>
- ✓ SIAP 2010.  
[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351)
- ✓ Singh, G. 2003. Studies on essential oils. Chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. Flavour and Fragrance Journal. 18:62-65.
- ✓ Smilanick, J.L., Denis-Arrue, R., Bosch J.R, Gonzales, A.R., Henson D.J., y Janisiewicz, W.J. 1993. Biocontrol of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. Crop Protection. 2:513-520.
- ✓ Spadaro D., Garibaldi A., y Lodovica Gullino M. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. Postharvest Biology and Technology. 33: 141-151.

- ✓ Stevens, C., Liu, J., Khan, V., Lu, J., Kabwe, M., Wilson, C., Igwegbe, E., Chalutz, E., y Droby, S. 2004. The effects of low-dose ultraviolet light-C treatment on polygalacturonase activity, delay ripening and *Rhizopus* soft rot development of tomatoes. *Crop Protection*. 23:551-554.
- ✓ Summy, K.R y French, J.V. 1988. Biological control of agricultural pest: concepts every producer should understand. *J.Rio Grande Valley Horticultural Society*. 41: 119-133.
- ✓ Tejeda, L.O. 1982. *Apuntes de control biológico*. ITESM.
- ✓ Tripathi, P., Banerji, N.K., y Chansouria, J. 2004. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20:317-321.
- ✓ Tripathi P. y Dubey N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.
- ✓ Velázquez-del Valle M.G., Bautista-Baños, Hernández-Lauzardo, Guerra-Sánchez y Amora-Lazcano. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26:49-55.
- ✓ Vero, S. y Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*. 7:1-10.

- ✓ Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., and Wisniewski, M. 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*. 26:91-98.
- ✓ Visintin, G., Fáiico L., y García B. 2010. Manejo de mohos postcosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos. *Ciencias exactas e Investigación*. (40):187-214.
- ✓ Wickerham, L.J. 1966. Validation of the Species *Pichia guilliermondii*, J. *Bacteriol*. 1262.
- ✓ Wilson, C.L y Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27:425-441.
- ✓ Xuan, T.D., Yuichi, O., Yunko, C., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, T.D., y Huu Hong, N. 2003. Kava root (*piper methysticum* L) as a potential natural herbicide and fungicide. *Crop protection*. 22:873-881
- ✓ Yunis, H. y Elad, Y. 1989. Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica*. 17: 13-21.
- ✓ Zaccari, F. 2003. Una Introducción a las pérdidas en postcosecha. En la actualización técnica en fisiología y manejo postcosecha de frutas y hortalizas. Seminario-Taller: 6 al 14 de Octubre. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estación experimental INIA las brujas Canelones. Uruguay. Pp 1-4.

- ✓ Zhang, D., y Quantick, P. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *Journal of horticultural Science and Biotechnology*. 73:763-767.
  
- ✓ Zhang, H., Zheng, X., y Yu, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 18:287-291.
  
- ✓ Zoffoli, J.P., Latorre, B.A., Daire, N., y Viertel, S. 2005. Effectiveness of chlorine dioxide as influenced by concentration, pH, and exposure time on spore germination of *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*. *Latinoamerican Journal of Agricultural and Enviroment Sciences*. 32:127-196.