

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Monilinia* spp. CON *Bacillus subtilis* Y *Trichoderma viride* BAJO MANEJO *in vitro* Y *ex vitro*

INHIBITION OF THE GROWTH OF *Monilinia* spp., WITH *Bacillus subtilis* AND *Trichoderma viride* UNDER *in vitro* AND *ex vitro* MANAGEMENT

De la Cruz-De la Cruz E.^{1*}, Mendoza-Castillo A.¹, Valera-Montero L. L.², Casanova-Pérez L.¹, Hernández-Hernández, M.¹, López-Mancilla A.³.

¹Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, Huejutla de Reyes, Hidalgo, México 43000. emigdio.delacruz@uthh.edu.mx

² Instituto Tecnológico El Llano. El Llano, Aguascalientes, México. 20330.

³ Instituto Tecnológico de Huejutla. Huejutla de Reyes, Hidalgo, México. 43000.

RESUMEN. Los frutos de Zapote Negro (*Diospyros digyna*), se ven afectados por una enfermedad fúngica que es producida por *Monilinia* spp. Este fitopatógeno es uno de los factores que limita el rendimiento, debido a que ataca en la etapa de floración y maduración de frutos, produciendo pérdidas hasta del 70%. Ante los problemas ambientales, se busca reducir el uso de fungicidas químicos para el manejo de la enfermedad, por lo que el control biológico es una de las alternativas. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto antagonista de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viride* en el crecimiento de *Monilinia* spp. en frutos frescos de Zapote Negro y de manera *in vitro*. Para ello, en frutos, se inoculó con la bacteria y el hongo, después con el patógeno; se evaluó la tasa de inhibición después de la inoculación, midiendo el tejido dañado. Para la evaluación *in vitro* se realizaron confrontaciones dentro de cajas Petri con medio de cultivo (PDA), colocando en un extremo al patógeno y en el otro el biocontrol, evaluando el porcentaje de control sobre el patógeno midiendo el halo de inhibición del microorganismo. Los resultados *in vitro* mostraron que *Bacillus subtilis* registró una tasa de inhibición del 56% y un halo de inhibición de 6 cm y *Trichoderma viride* registró una tasa de inhibición del 80% y un halo de inhibición de 2 cm. Lo cual también ha sido observado en otros cultivos y con diferentes géneros de hongos patógenos. En frutos inoculados con *Bacillus subtilis* se registró una tasa de inhibición del 66%. *Trichoderma viride* fue más eficiente para el control de *Monilinia* spp. de manera *in vitro*. En frutos no hubo un buen desarrollo de *Trichoderma*. Lo anterior mostró potencial para el control biológico de *Monilinia* spp. mediante el uso de *Bacillus subtilis* en frutos de zapote negro y en otros frutales de la región Huasteca.

Palabras claves: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma viride*, Zapote negro

ABSTRACT. The fruits of Black Sapote (*Diospyros digyna*) are affected by a fungal disease that is produced by *Monilinia* spp. This phytopathogen is one of the factors that limits yield, because it attacks in the flowering and fruit ripening stage, producing losses of up to 70%. Given the environmental problems, we seek to reduce the use of chemical fungicides to manage the disease, so biological control is one of the alternatives and the objective of this research was to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* in the growth of *Monilinia* spp. in fresh Black Sapote fruits and *in vitro*. To do this, fruits were inoculated with the bacteria and the fungus, then with the pathogen; the inhibition rate was evaluated after inoculation, measuring the damaged tissue. For the *in vitro* evaluation, confrontations were carried out inside Petri dishes with culture medium (PDA), placing the pathogen at one end and the biocontrol at the other, evaluating the percentage of control over the pathogen by measuring the zone of inhibition of the microorganism. The *in vitro* results showed that *Bacillus subtilis* recorded an inhibition rate of 56% and an inhibition zone of 6 cm and *Trichoderma viride* recorded an inhibition rate of 80% and an inhibition zone of 2 cm. Which has also been observed in other crops and with different genera of pathogenic fungi. In fruits inoculated with *Bacillus subtilis*, an inhibition rate of 66% was recorded. *Trichoderma viride* was more efficient for the control of *Monilinia* spp. *in vitro*. In fruits there was not good development of *Trichoderma*. The above showed potential for the biological control of *Monilinia* spp., through the use of *Bacillus subtilis* in black sapote fruits and other fruit trees in the Huasteca region.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma viride*, Black Sapote

INTRODUCCIÓN

El zapote negro (*Diospyros digyna*), es una planta nativa de México y América Central; que se ha introducido en Asia y se cultiva en algunos jardines

botánicos de Europa¹. El árbol es de corona amplia y llega a medir 25 m de altura, pertenece a la familia Ebenaceae, al igual que el persimon (*Diospyros kaki*)². El fruto es una baya de forma globosa de 8 a

10 cm de diámetro, la cáscara de color verde brillante y se encuentra adherida a la pulpa; la pulpa es de color café y cuando está madura es de color negro, de consistencia suave y agrídulce; contiene de 6 a 10 semillas por fruto; son gruesas, color negro, aplanadas. Su composición nutrimental incluye una gran cantidad de carbohidratos, antioxidantes y de vitaminas A y C³.

Una de las características del zapote negro, es que no suele tener plagas y enfermedades, sin embargo, en la región Huasteca se ha identificado en las flores y ramillas, presencia de tizones de color negro y los frutos en estado de momificación. La sintomatología que presenta es podredumbre parda o momificación de los frutos, enfermedad producida por hongos del género *Monilinia spp.* Este patógeno reduce la calidad y rendimiento en los frutales afectados⁴; ya que afecta los cultivos en las etapas de floración, fructificación y post-cosecha. El hongo secreta enzimas que causan una pudrición de los tejidos, sobre las lesiones y se desarrolla el micelio con gran rapidez⁵. Se han registrado pérdidas entre el 50 y 70% en los cultivos⁶ afectados.

Existen productos químicos para control de este patógeno, pero hay estudios que demuestran que el uso excesivo de estos productos, generan resistencia al patógeno y contaminación al medio ambiente. Lo que conlleva a buscar alternativas de control, mediante uso de microorganismos.

Investigaciones previas han utilizado *Bacillus subtilis* y *Trichoderma spp.* como alternativa para el biocontrol de *Monilinia spp.* Los mecanismos empleados por estos microorganismos para el control de fitopatógenos tienen un efecto directo, por parasitismo y la producción de antibióticos, sideróforos y toxinas; de manera indirecta por competencia de espacio y nutrientes⁷.

En comparación con productos sintéticos, los microorganismos utilizados presentan características específicas como tener crecimiento rápido, alta capacidad de reproducción y supervivencia, diferentes niveles de dormancia, estar libres de antagonistas naturales, alta habilidad competitiva, adaptabilidad a la planta tratada y una alta versatilidad en el ambiente. Sin contar que su

aplicación es de bajo costo⁸, ventaja económica para los productores. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo, fue evaluar, el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Monilinia spp.* en confrontación con dos organismos antagonistas, la bacteria *Bacillus subtilis* y el hongo *Trichoderma viride*, de manera *in vitro* y en frutos de zapote negro.

METODOLOGÍA

La primera parte del proyecto se realizó en la Huasteca Hidalguense y Veracruzana, e involucró la recolección de frutos sanos e infectados en el mes de enero de 2021, época de fructificación, periodo en el cual se realizó también el aislamiento de *Monilinia spp.*

Recolección de frutos sanos e infectados

Se recolectaron y seleccionaron 14 frutos por su alta infección (>80%) en frutos de zapote negro⁸. Las muestras obtenidas fueron de diversas localidades de la Huasteca Hidalguense y Veracruzana; también se eligieron 14 frutos libres de síntomas de enfermedad para pruebas en fresco.

Aislamiento de *Monilinia spp.*

La segunda parte del proyecto, consistió en el aislamiento de *Monilinia spp.* del fruto de zapote negro; para ello, con un palillo esterilizado se tomaron las esporas del área infectada del fruto y se inoculó en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (5 g de peptona especial, 20 g de dextrosa, 7.5 g agar-agar y 500 mL de agua destilada), se incubaron durante cinco días a temperatura ambiente⁸. Se hicieron 6 aislamientos y se caracterizaron como MF (*Monilinia* del fruto). De estos aislamientos se eligieron tres con el mejor crecimiento (muestras A, B y C) y de cada muestra se hicieron cuatro aislamientos en medio SDA, incubándose durante 5 días a temperatura ambiente. Asimismo se hizo una caracterización preliminar del patógeno, mediante sus caracteres morfotaxonomícos⁹. Después se purificaron, para ello, se seleccionaron colonias que se asemejaran más a la morfología de *Monilinia spp.* y con un palillo estéril se tomaron colonias y se inocularon en medio SDA (Figura 1).

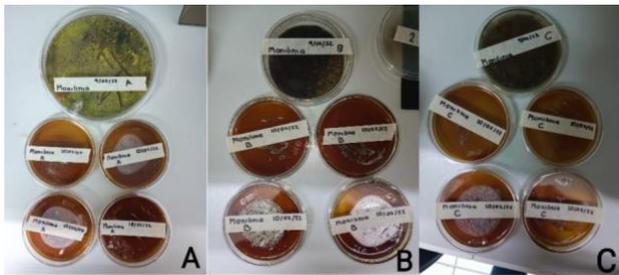


Figura 1. Aislamiento de *Monilinia* spp. Se realizaron repeticiones hasta purificar el hongo; se seleccionaron colonias y se inocularon nuevamente en medio SDA.

Aislamiento de *Bacillus subtilis*

En el Instituto Tecnológico El Llano (ITEL), se aisló *Bacillus subtilis* a partir del producto comercial SERENADE, se tomaron 0.5 g y se diluyó en 1 mL de agua destilada y se cultivó en agar bacteriológico, colocando 1 mL de muestra. También se aislaron de manera directa, se pesaron 0.5 g y con un palillo se tomó muestra y se cultivó en el agar bacteriológico por estría y puntos. Se dejaron por siete días a temperatura ambiente.

Aislamiento de *Trichoderma viride*.

En el caso de este organismo, se realizó una reactivación de un cultivo conservado en aceite vegetal del año 2008. Para llevar a cabo la reactivación, primero se prepararon 2 cajas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (125g de papa, 7.5 de glucosa, 7.5 de agar-agar y 500 mL de agua destilada), para después dejarlas en incubación por una semana. Una vez reactivado, se purificó el microorganismo en nuevas cajas Petri con PDA.

Aislamiento de *Monilinia* spp. y *Bacillus subtilis*

Se preparó agar bacteriológico para confrontar *Monilinia* spp. y *Bacillus subtilis*. Se observó que *Monilinia* spp. no creció en el agar bacteriológico, ya que después de 7 días no mostró cambios en el tamaño de la colonia. Por lo que se inoculó nuevamente en medio SDA. Se tomó el fruto y con un palillo esterilizado se aisló micelio de *Monilinia* spp. y se inoculó; fueron 6 repeticiones; 3 por estría y 3 por punto. También se reaclaron colonias de *Monilinia* spp. de muestras que se habían cultivado previamente en enero-abril 2021 (Muestras A, B y C).

Formulación de medios de cultivo

Para realizar las confrontaciones *in vitro*, se formularon medios de cultivo de acuerdo con los nutrientes requeridos para que ambos microorganismos crezcan en el mismo medio.

Se formularon 7 medios con distinta composición en 300 mL de agua destilada:

- PDA (3.5 g papa, 6 g dextrosa y 4.5 g agar-agar).
- PAA (3.5 g papa, 4.63 g azúcar y 4.5 g agar-agar).
- DAA (6 g dextrosa, 4.5 g azúcar y 4.5 g agar-agar).
- PDSA (3.5 g papa, 6 g dextrosa, 1.084 g sulfato de amonio y 4.5 g agar-agar).
- PASA (3.5 g papa, 4.63 g azúcar, 1.084 g sulfato de amonio y 4.5 g agar-agar).
- PSAA (10 g peptona, 1.084 g sulfato de amonio, 4.63 g azúcar y 4.5 g agar-agar).
- PSDA (10 g peptona, 1.084 g sulfato de amonio, 6 g dextrosa y 4.5 g agar-agar).

También se utilizaron tres medios de cultivo comercial: agar bacteriológico, agar dextrosa sabouraud y agar de sangre.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 repeticiones (Figura 2).



Figura 2. Medios de cultivo formulados en un diseño completamente al azar.

Se inocularon cinco cajas con *Bacillus subtilis* y cinco con *Monilinia* spp. por cada medio de cultivo. Se seleccionó el medio PDA porque demostró ser mejor medio y ambos microorganismos crecieron de manera adecuada; se realizaron nuevamente las confrontaciones, colocando en cada extremo *Bacillus subtilis* y *Monilinia* spp. Se sellaron para conservar la humedad y se dejaron desarrollar durante 8 días a temperatura ambiente. Cada día, con una regla se midió el crecimiento del halo de cada microorganismo, dentro de la caja Petri.

Actividad antagonista *in vitro*

Para determinar la actividad antagonista de *Bacillus subtilis* contra *Monilinia* spp., se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y se inició con cajas Petri con medio PDA, a las que se les transfirió un disco de micelio de *Monilinia* spp. en un extremo con la ayuda de un palillo esterilizado y en el otro extremo se transfirió *Bacillus subtilis*¹⁰. Para medir la actividad antagonista se comparó el crecimiento del patógeno: una donde estaba con el biocontrol y el otro donde sólo estaba presente el patógeno (testigo). Durante siete días, se midió el diámetro del crecimiento del micelio y zonas de inhibición del patógeno. El porcentaje de inhibición se determinó utilizando la Ec.1¹¹:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de inhibición *in vitro*

D.C.C: Diámetro de la colonia control (cm). D.C.P: Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas en cm)

Se usó el mismo método de confrontación para *Trichoderma viride* contra *Monilinia* spp.

Actividad antagonista en frutos de zapote negro

Los frutos de zapote negro sanos, libres de enfermedades y plagas, fueron desinfectados superficialmente con agua jabonosa, agua destilada estéril y secados en una cabina de flujo laminar, para después ser colocados en una suspensión con cepa de *Bacillus subtilis* y otra de *Trichoderma viride* (1 g / L de agua), adicionando fécula de maíz (3g/L) para mejorar la adherencia al fruto y se dejaron por un lapso de 2 horas¹². El testigo se sumergió en agua estéril. Con un cúter estéril de 2 cm de diámetro, se realizaron perforaciones en la zona ecuatorial de los

frutos inoculados con las cepas de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viride*. En cada perforación se depositó un disco de micelio de *Monilinia* spp. del mismo tamaño, se dejaron en cámaras húmedas en condiciones controladas a una temperatura de 24°C por espacio de siete días. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones (Figura 3).

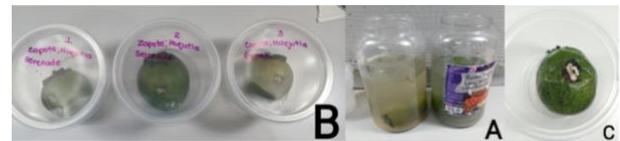


Figura 3. Inoculación de *Monilinia* spp. en frutos de zapote negro. A) Inoculación con las cepas bacterianas B) Montaje de cámaras húmedas con *Bacillus subtilis* C) Fruto inoculado con el aislamiento de *Monilinia* spp.

Durante el experimento se registró el porcentaje de severidad, que correspondió al área de tejido afectado por la enfermedad y la tasa de inhibición que evalúa la efectividad del control de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viride* en *Monilinia* spp, mediante la fórmula de Van Den Heuvel (Ec 2)¹³.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * \frac{(R - r)}{R}$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición *ex vitro*

R: Medida de diámetro del crecimiento de los micelios del patógeno testigo. r: Medida de diámetro del crecimiento del patógeno en enfrentamiento con el antagonista.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con los medios de cultivo formulados para el crecimiento *Monilinia* spp. se muestra en la tabla 1.

En la tabla 2 se muestra la respuesta en crecimiento de *Bacillus subtilis* en diferentes medios de cultivo.

Con base en estos resultados se seleccionó el medio PDA, debido a que sólo en este medio pudo crecer *Bacillus subtilis*, mientras que en los otros medios se deshidrató en un lapso de 3 días. Permitiendo que *Monilinia* spp tuviera ventajas.

Tabla 1. Respuesta obtenida con *Monilinia* spp. en cada medio de cultivo

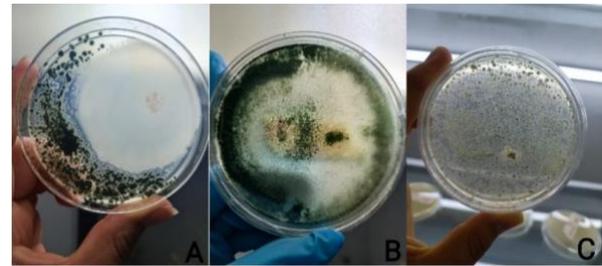
Medio de cultivo	Respuesta del hongo
PDA (papa, dextrosa y agar)	Positivo, el micelio tiene forma de flor. Algunas partes crecieron puntos. Sus colores fueron beige, blanco y verde.
PAA (papa, azúcar y agar)	Positivo, el crecimiento fue medio abundante. El micelio es de color beige y verde.
DAA (dextrosa, azúcar y agar)	Sin crecimiento.
PDSA (papa, dextrosa, sulfato de amonio y agar)	Positivo, crecimiento similar al PSDA .
PASA (papa, azúcar, sulfato de amonio y agar)	Positivo, crecimiento similar al PSDA.
PSAA (peptona, sulfato de amonio, azúcar y agar)	Positivo; creció con micelio y puntos de color blanco y beige.
PSDA (peptona, sulfato de amonio, dextrosa y agar)	Positivo, crecimiento abundante de micelio con puntos blancos y verdosos.

Nota: Los resultados mostraron que, en cada medio de cultivo, *Monilinia* spp tiene una morfología distinta de acuerdo a las diferentes soluciones y su mejor crecimiento fue en PDA.

Tabla 2. Respuesta obtenida para *Bacillus subtilis* en cada medio de cultivo

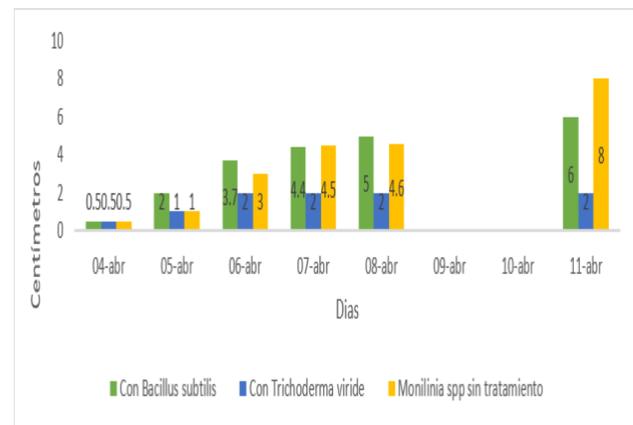
Medio de cultivo	Respuesta bacteriana
PDA (papa, dextrosa y agar)	Positivo, creció en abundancia.
PAA (papa, azúcar y agar)	Positivo, pero creció poco
DAA (dextrosa, azúcar y agar)	Sin crecimiento.
PDSA (papa, dextrosa, sulfato de amonio y agar)	Positivo, creció en abundancia.
PASA (papa, azúcar, sulfato de amonio y agar)	Sin crecimiento.
PSAA (peptona, sulfato de amonio, azúcar y agar)	Positivo, poco crecimiento.
PSDA (peptona, sulfato de amonio, dextrosa y agar)	Positivo, creció en abundancia

Respecto a la actividad antagonista *in vitro*, los resultados mostraron que *Trichoderma viride*, presentó inhibición mayor en el crecimiento micelial de *Monilinia* spp. (80%) a diferencia de *Bacillus subtilis* que registró una tasa de inhibición promedio de 56% (Figura 4)¹⁴.


Figura 4. Inhibición de *Monilinia* spp. A) *Monilinia* spp. x *Bacillus subtilis*. B) *Trichoderma viride* x *Monilinia* spp. C) Testigo

Los resultados mostraron que la cepa de *Bacillus subtilis* presentó un halo de inhibición de 6 cm y la cepa de *Trichoderma viride* presentó un halo de inhibición de 2 cm. Por tanto, se observó que hay una diferencia en el crecimiento de los halos de inhibición, *Trichoderma viride* demostró una mayor disminución en el crecimiento y esporulación de *Monilinia* spp. Esto se debe a la producción de sideróforos y lipopéptidos que liberan los microorganismos y evitan el crecimiento del fitopatógeno. Otro factor es la competencia por espacio^{14, 15}.

En la figura 5 se muestra la tasa de crecimiento de *Monilinia* spp junto con los tratamientos durante 8 días.


Figura 5. Tasa de crecimiento de *Monilinia* spp. junto con los biocontroladores

De acuerdo con lo anterior, el mejor biocontrol contra este fitopatógeno fue *Trichoderma viride*, ya que demostró que inhibe en mayor porcentaje el crecimiento, en comparación con *Bacillus subtilis*.

Para la actividad antifúngica en frutos de zapote negro, los resultados mostraron que el fruto inoculado por *Monilinia* spp. sin tratamiento, la enfermedad se desarrolló muy rápido afectando el 70% de la superficie de los frutos en menos de 7 días. En los frutos con el tratamiento de *Bacillus subtilis* la enfermedad sólo afectó un 20%. La tasa de inhibición (Figura 6), fue del 65-80 %. El tratamiento de *Trichoderma viride* no se pudo realizar.

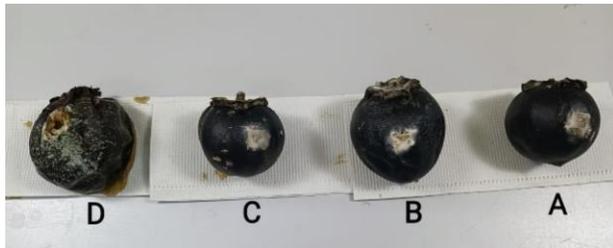


Figura 6. Efecto antifúngico de *Bacillus subtilis*. A,B,C) *Bacillus subtilis* contra *Monilinia* spp. y D) Testigo.

Con base en los resultados obtenidos, se arguye que la elección de un medio de cultivo responde a las exigencias del microorganismo involucrado y la finalidad que se persigue con su multiplicación; por tanto, la selección y la concentración adecuada de los nutrientes es un factor de vital importancia^{10,14}. En esta investigación, al realizar el aislamiento y las confrontaciones con los microorganismos, se observó que solamente uno crecía o se secaba. Esto se debió a que ciertos organismos se desarrollan en los medios de aislamiento con mayor rapidez por ser menos exigentes o tienen el nutriente adecuado en su alimentación, mientras que otros no se desarrollan o lo hacen con dificultad por no tener los nutrientes necesarios^{15, 16}. Por ello, se formularon diferentes medios de cultivo que fueran adecuados para ambos microorganismos. Se realizó, la combinación entre diferentes componentes químicos que varió de acuerdo a las características nutricionales de cada microorganismo a cultivar¹⁵. En este caso, de todos los medios formulados el más adecuado fue PDA.

En cuanto al antagonismo, al evaluar dos cepas de *Bacillus subtilis* (CB10 y CB11) contra *Monilinia fructicola*, los resultados de manera *in vitro* fueron los siguientes: la cepa CB10, presentó mayor inhibición en el crecimiento micelial (90%) de *M. frutícola*, a

diferencia de la cepa CB11 que registró una tasa de inhibición de 70%⁶.

En este trabajo *Bacillus subtilis* mostró una tasa de inhibición de 56% en el crecimiento micelial de *Monilinia* spp.

Otros estudios han mostrado que *Bacillus* es efectivo en el control de *Monilinia fructicola*, de manera *in vitro* con una tasa de inhibición del 81.57% al 90 %^{13, 14, 15}. De manera *ex vitro* en almendras de cacao, con *Bacillus subtilis* se obtuvo una reducción en el daño fúngico al interior de la almendra de 71.69 %^{13, 16, 16}. En frutos, hojas y brotes de melocotoneros infectados con *M. fructicola*, utilizando *Bacillus*, la tasa de inhibición alcanzó el 64,31 %, 97,34 % y 64,28 %, respectivamente¹⁷.

Hay variaciones en los estudios, debido a factores como la cepa de *Bacillus*, el tipo de tejido, la especie vegetal, pero la bacteria posee capacidades antagonistas que pueden contribuir al manejo integrado de *Monilinia* spp. en zapote negro.

En el caso del género *Trichoderma*, también ha sido reportado ampliamente como un organismo antagonista contra diversos géneros de hongos. Para control de *Botrytis cinerea*, observaron entre 80-100 % de control atribuido a la competencia por sustrato y antibiosis¹³. En el mismo sistema *in vitro* y en manejo postcosecha de fresa¹⁸, observaron control mediante micoparasitismo de *T. harzianum* sobre los hongos *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Phytium*. También es efectivo contra patógenos del suelo a nivel *in vitro*¹⁹.

A nivel *in vitro*, la efectividad de *Trichoderma* ha sido confirmada, al igual que en el presente trabajo, pero, hacen falta trabajos de campo. Ya que, bajo dichas condiciones, sólo *B. subtilis*, fue efectivo; mientras que *T. viride*, no se adaptó y no pudo reproducirse en los frutos de zapote negro.

Cuando se compara la efectividad de *Bacillus* y *Trichoderma*, los resultados dependen del microorganismo contra el que se evalúa; contra *Fusarium*, la bacteria tuvo una efectividad de control del 90 % y el hongo del 75 %²⁰; contra hongos como *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis* y *Fusarium*, la bacteria, alcanzó niveles de control del

69 %, mientras que *Trichoderma*, tuvo fluctuaciones de control del 43 al 71 %²¹, lo cual contrasta con el presente estudio, donde *Trichoderma* fue más efectivo que *Bacillus*.

CONCLUSIONES

Bajo el sistema *in vitro*, la efectividad antagonista de *Bacillus subtilis* frente al fitopatógeno *Monilinia* spp. tuvo una tasa de inhibición de 56%, mientras que *Trichoderma viride* inhibió al hongo en 80 %. Mientras que en frutos de zapote negro (*ex vitro*), *Bacillus subtilis* frente al fitopatógeno *Monilinia* spp. tuvo una tasa de inhibición del 65%, en tanto que *Trichoderma viride*, no se desarrolló. Por lo anterior, *Bacillus subtilis* es una alternativa para el control biológico del *Monilinia* en frutos de zapote negro. El hongo *Trichoderma* requiere más evaluaciones de manera *ex vitro*.

REFERENCIAS

1. Jiménez, M. (2002). Aprovechamiento de Frutas Exóticas a través de Nuevos Productos: Un Estudio sobre Pulpa de Zapote Negro. Tesis de maestría. ITESM. Nuevo León, México. 72 p. Recuperado de: https://repositorio.tec.mx/bitstream/handle/11285/567409/DocsTec_934.pdf?sequen
2. Merino, L. (2011). Evaluación de propiedades físico-químicas y actividad antioxidante de zapote negro (*Diospyros digyna* Jacq.). Tesis de maestría. UV. Veracruz, México. 87 p. Recuperado de: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46806/MerinoSanchezLiliana1d2.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
3. Arellano-Gómez, A., Saucedo-Veloz, C. y Arévalo-Galarza, L. (2005). Cambios bioquímicos y fisiológicos durante la maduración de frutos de Zapote Negro (*Diospyros digyna* Jacq.). *Agrociencia*, 39(2): 173-181.
4. Guarín-Torres, C. Y., Patiño-Pacheco, J. M. y Martínez, W. J. (2019). Identificación del agente causal de la pudrición parda en frutos de duraznero (*Prunus pérsica*, L. Batsch) en Boyacá. *Entramado*, 15(1): 298-309. <https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.1.5418> Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-38032019000100298
5. Agrios, G. (2005). *Fitopatología*. Ed. LIMUSA. México. 838 p.
6. Patiño, P. J. M. (2020). Control biológico de la pudrición parda (*Monilinia fructicola*) (G. Winter) Honey, con dos cepas de *Bacillus subtilis* en duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch). Tesis de Licenciatura. ENAD. Colombia. 79 p. Recuperado de: <https://repositorio.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/35153/mjpatinop.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, L., Hul, L., & Chun, L. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(1): 128-134. Recuperado de: <http://cjche.cip.com.cn/EN/Y2011/V19/I1/128>
8. Cambero, A. B., Esquivel, L. G., Rios, V. C., Estrada, V. O., Betancourt, A. A. y Camnero, C. J. (2020). Evaluación *in vitro* de antagonistas contra patógenos de fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Rev. Bras. Frutic.* 42 (2): e-147. Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/7xTHcVjkBNf9mBkVt7rDSyL/?lang=es&format=pdf>
9. Mejía-Bautista, A. M., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, M. J. y Reyes-Ramírez, A. (2016). Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* Y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*, 50: 1123-1135. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801123
10. Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, C. y Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA*: 147-153.
11. Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., y Peréz, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileña de Agroecología*: 90-99.
12. Robles, P. B. (2008). Validación de biopesticidas en base a bacterias epífitas para el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y Par. Evans et al.) en el cultivo de cacao híbrido CCN-51 en santo domingo, provincia santo domingo de los tsáchilas. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2500/1/T-ESPE-IASA%20II-002061.pdf>
13. Calvo-Araya, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S. y Orozco-Rodríguez R. (2012). Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en Mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23 (2): 225-231.
14. Gómez, G. y Bautista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos tropicales*, 27(3): 17-24.. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>
15. Curvelo, G. L. y Rojas, B. J. (2010). Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums ascomycetes, deuteromycetes y oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas. Tesis de Licenciatura. Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 89 p. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8741/tesis680.pdf>
16. Xue, Y., Xu, H., Haotian, C., Rui, Y., & Fang, W. (2019). *Bacillus methylotrophicus* has potential applications against *Monilinia fructicola*. *Open Life Sci.*, 14:410-419. Recuperado de: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/biol-2019-0046/html>
17. Yáñez, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., De Vicente, A., and Teixidó, N. (2012). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides.

- European Journal of Plant Pathology, 132 (4): 609-619.
Recuperado de: [DOI: 10.1007 / s10658-011-9905-0](https://doi.org/10.1007/s10658-011-9905-0)
18. Guédez, C., Cañizales, L., Castillo C. y Olivar R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos de la fresa (*Fragaria* spp.). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29:34-38.
 19. Gato-Cárdenas., Y., Pérez B., Y., Carreras S., B., Baró R., Y., Quesada M., Y. y Ramírez O. R. (2014). Actividad anatómica de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp., frente a fitopatógenos del suelo. Fitosanidad, 14 (1): 45-48.
 20. Pérez, D. y García-Godos, P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* "tara" y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. Ecología Aplicada, 18 (1): 51-57.
 21. Ríos-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruíz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Salas-Marina, M. A., Villalobos-Pérez, E. y Guerrero-Prieto, V. M. (2016). Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., contra hongos fitopatógenos comunes. Revista Mexicana de Fitopatología, 34(1): 84-99.