

## Trabajo Fin de Grado

Titulación: Grado en Ingeniería  
Agroalimentaria y del Medio Rural.

Mención: Industrias Agrarias y Alimentarias

Título del trabajo: Eficacia de *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 y polímeros de calcio para el control de *Monilinia* spp. en frutales de hueso en cultivo y en post-cosecha.

English title: Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 and calcium polymers for the control of *Monilinia* spp. in stone fruit during the pre- and postharvest phase.

Autor/es

**Adrián Polo Zarazaga**

Director/es

Da. María Eugenia Venturini Crespo  
D. Jesús Val Falcón

## ÍNDICE:

1- RESUMEN / ABSTRACT.....	1-2
2- INTRODUCCIÓN	
2.1.    PRODUCCIÓN DE FRUTOS DE HUESO.....	3-4
2.2.    PODREDUMBRES EN FRUTAS DE HUESO.....	4-16
2.3.    CONTROL BIOLÓGICO ENFERMEDADES FÚNGICAS...	16-23
3- OBJETIVOS.....	24-25
4- MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. PROSPECCIÓN, SELECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LAS PARCELAS OBJETO DE ESTUDIO.....	26-32
4.2. APLICACIÓN DE AGENTES NATURALES DE BIOCONTROL EN POSCOSECHA.....	32-35
4.3. DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA DEL ABC A FUNGICIDAS COMERCIALES.....	35-37
4.4. APLICACIONES POSCOSECHA BASADAS EN FORMULADOS NATURALES Y BIOLÓGICOS.....	37-42
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
5- RESULTADOS	
5.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES FÚNGICAS RESPONSABLES DE LA PODREDUMBRE MARRÓN EN LOS CAMPOS EXPERIMENTALES DEL CSIC.....	43
5.2. DETECCIÓN PRECOZ DE <i>MONILINIA</i> SPP.....	43-45
5.3. APLICACIÓN DE AGENTES DE NATURALES DE BIOCONTROL EN POSCOSECHA.....	45-48
5.4. DETERMINACIÓN DE LA TOLERANCIA DEL ABC A FUNGICIDAS COMERCIALES.....	48-50
5.5. APLICACIONES POSTCOSECHA BASADA EN FORMULADOS NATURALES Y BIOLÓGICOS.....	50-56
6- CONCLUSIONES.....	57-58
7- BIBLIOGRAFÍA.....	59-64

## INDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Principales especies de <i>Monilinia spp.</i> responsables de la podredumbre parda (Oliveira Lino et al., 2016) .....	5
Figura 2. Ciclo biológico e infección del patógeno <i>Monilinia spp.</i> en frutales.....	9
Figura 3. Disposición y tratamientos de los melocotoneros en la parcela objeto de estudio.....	27
Figura 4. Imagen de las parcelas D1(melocotón) y D2 (fucsia) de la finca experimental de la EEAD-CSIC.....	28
Figura 5. Momias detectadas en la parcela de melocotonero.....	29
Figura 6. Esquema de los protocolos de detección de infecciones latentes en flor/fruto.....	31
Figura 7. Muestras de flores de melocotonero dispuestas para su incubación.....	31
Figura 8. Aplicación de los agentes antifúngicos naturales en campo mediante atomización del producto con mochila de aplicación de fitosanitarios.....	33
Figura 9. Escala de grados de severidad de podredumbre marrón en fruta de hueso: grado 0: no afectado; grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %)......	38
Figura 10. Drencher (duchadora) a escala piloto de la empresa Agrofresh-Tecnidex (Valencia, España) para aplicación de tratamientos post-cosecha.....	39
Figura 11. Sensor acústico (izquierda) y penetrómetro digital (derecha).....	40
Figura 12. Refractómetro digital para la medida de los SST.....	41
Figura 13. Titulador para la determinación de la acidez.....	41
Figura 14. Medida de color mediante el colorímetro Minolta.....	42
Figura 15. Desarrollo de <i>Monilinia spp.</i> en melocotones <i>Andros x Calante</i> tras la conservación en refrigeración y posterior simulación del periodo de comercialización. Visión general del lote control (izquierda) y detalle de podredumbre marrón (derecha).....	52

## INDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Producción de frutales de hueso Aragón 2019 (Anuario estadístico de Aragón 2019) ...3	3
Tabla 2. Manejo de la moniliasis en producción integrada de frutales de hueso (REPIFH, Orden 31 de julio de 2013) .....12	12
Tabla 3. Estado fenológico, fecha de toma de muestra, número de flores/frutos de melocotonero muestreados la detección precoz de la enfermedad en campo.....30	30
Tabla 4. Pesticidas y dosis de referencia de usos testados en el crecimiento <i>B. velezensis</i> .....35	35
Tabla 5. Escala de grados de severidad de podredumbre.....38	38
Tabla 6. Estado fenológico, fecha de toma de muestra, número de flores/frutos muestreados y estado de la detección de la enfermedad en campo.....44	44
Tabla 7. Recuento de <i>Bacillus velezensis</i> BUZ-14 (log unidades formadoras de colonia (ufc)/g) en melocotoneros <i>Andros x Calante</i> antes y después de cada tratamiento realizado en campo con las distintas formulaciones de agentes antifúngicos naturales (antes = justo momento anterior a la aplicación del tratamiento, después = 1 día tras la aplicación de los agentes antifúngicos) .....45	45
Tabla 8. Incidencia (%) de la podredumbre marrón en melocotones <i>Andros x Calante</i> en los distintos tratamientos en el momento de la cosecha (incidencia en campo) .....47	47
Tabla 9. Pesticidas, dosis de referencia de uso y concentración máxima que permite el crecimiento de <i>Bacillus velezensis</i> BUZ-14.....48	48
Tabla 10. Incidencia y severidad de la podredumbre marrón (%) en nectarinas Venus x Big Top tratadas con un formulado de <i>B. velezensis</i> BUZ-14 tras 7 y 14 d de almacenamiento en refrigeración (1°C) y posteriores periodos de simulación de la comercialización (20 °C) .....51	51
Tabla 11. Incidencia de la podredumbre marrón en melocotones <i>Andros x Calante</i> tras la conservación en refrigeración y posterior simulación del período de comercialización (10 d a 1 °C + 3 d a 20 °C) .....52	52
Tabla 12. Recuentos de <i>Bacillus velezensis</i> BUZ-14 (log unidades formadoras de colonia (ufc)/cm <sup>2</sup> o herida) en melocotones tratados con el agente de biocontrol y conservados a 1 °C durante 10 d seguidos de un periodo de simulación de la comercialización de 4 d a 20 °C.....54	54
Tabla 13. Calibre y peso de los frutos para el análisis de la calidad de los melocotones <i>Andros x Calante</i> en el momento de la recolección.....54	54
Tabla 14. Firmeza mediante método destructivo y AWETA (no destructivo), sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable de los melocotones <i>Andros x Calante</i> en el momento de la recolección.....55	55
Tabla 15. Parámetros de color en los melocotones <i>Andros x Calante</i> en el momento de la recolección.....55	55

## **1. RESUMEN**

Aragón produce el 21% de melocotones y nectarinas de nuestro país, lo que suponen 21.034 y 284.539 t, respectivamente. Estos datos reflejan la importancia de nuestra Comunidad Autónoma en la producción de frutos de hueso. Los mayores problemas en su comercialización surgen en años lluviosos cuando el riesgo de aparición de podredumbres durante su distribución y venta aumenta significativamente. *Monilinia* spp. es el moho causante de la podredumbre marrón, principal enfermedad que afecta a la fruta de hueso a nivel mundial y que, en años con climatología favorable para el desarrollo del moho, puede afectar al 80% de los frutos. El método más utilizado a lo largo de los últimos años para combatir las podredumbres ha sido el uso de fungicidas, pero actualmente sus inconvenientes y limitaciones están aumentando. Debido a ello, muchas de las investigaciones que actualmente se están llevando a cabo buscan alternativas a estos tratamientos. Entre ellas destaca el empleo de agentes microbianos antagonistas del patógeno a eliminar (lucha biológica o biocontrol).

Por tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de agente de biocontrol *Bacillus velezensis* BUZ-14 para el control de la podredumbre marrón en frutales de hueso tanto en pre- como en post-cosecha. Para ello, se seleccionó una parcela de melocotoneros *Andros* x *Calante* en los que primero se realizó una prospección para determinar el grado de infección por *Monilinia* spp. y posteriormente, fueron tratados con bioformulados de BUZ-14, sólo o combinado con goma tara. La aplicación del agente de biocontrol BUZ-14 durante el cultivo de melocotoneros redujo en un 70 % la manifestación de la podredumbre marrón en recolección. Para un adecuado control de la enfermedad se recomiendan 4 aplicaciones a lo largo del ciclo del cultivo coincidiendo la primera con el momento de plena floración. Cuando los melocotones son tratados en pre y post-cosecha con el ABC BUZ-14 se produjo un efecto sumativo ya que no se detectaron frutos afectados de podredumbre tras 10 días a 1 °C y 4 días a 20 °C (periodos de refrigeración y simulación de la comercialización). El análisis de calidad de los melocotones tras la cosecha no mostró diferencias significativas entre los frutos control y los frutos que habían recibido tratamientos precosecha con los distintos formulados por lo que se puede señalar que estos formulados no interfieren en el desarrollo habitual de los frutos.

**Palabras clave:** frutos de hueso, *Monilinia* spp., *Bacillus velezensis* BUZ-14, goma tara

## ABSTRACT

The production of peaches and nectarines in Aragon is about 21% of the total in the country, it means 21.034 y 284.539 t, respectively. This numbers reflects the importance of Aragón in terms of stone fruit production. The highest risk for commercialization appears in rainy years because this factor increases the possibility of rots in the sale and distribution period. *Monilinia spp.* is the causal agent of brown rot, main disease which affects stone fruit worldwide. In years of appropriate climate for the developing of the fungus it can cause 80% of infection in stone fruits. The most common strategy to control the disease is the application of fungicides, but nowadays their inconveniences and limitations are increasing. Due to that, currently investigations are focused in find new methods to combat the disease. Among them, the biological control stands out.

Therefore, the objective of these study was to evaluate the capacity of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* BUZ-14 to control brown rot in stone fruits in the pre- and post-harvest period. The work starts with the selection of the study area of peaches *Andros x Calante*, so first a determination of the grade of infection of *Monilinia spp.* has been made, after that we used different bio formulas, BUZ-14 alone or mixed with tara gum. The use of these bio formulates reduced the infection 70%. For the correctly infection control, the best method was the application of the bio formulates in 4 periods, starting in the flowering cycle of the fruit. It has been shown that with the use of ABC BUZ-14 in pre- and post-harvest, infection has not been shown in stone fruits during 10 days at 1°C and 4 days at 10°C (refrigeration period and simulation of commercialization period). The quality of peaches did not show significant differences between control fruits and those that have been treated with the bio formulates in preharvest, so we can conclude that these treatments do not interfere in the natural development of the fruit cycle.

**Key words:** Stone fruit, *Monilinia spp.*, *Bacillus velezensis* BUZ-14, tara gum.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Producción de frutos de hueso

Actualmente encontramos a España dentro de los 5 países más importantes mundialmente en lo que a producción de fruta de hueso se refiere, por detrás de países como China 10,7 MTon, Estados Unidos 2,9 MTon, Italia 1,9 MTon, España 1,4 Mton y Grecia 0,8 MTon (FAOSTAT, 2017). De acuerdo con los datos de producción de cultivos de frutales en España del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2021a), ha habido un aumento de la producción de frutas de hueso en los últimos años hasta alcanzar una producción total de 1.986.701 toneladas en el año 2019.

En términos de valor, España lidera con un 20 % la lista referente a los países europeos, siendo el valor medio de referencia entre los años 2013-2017 del conjunto de la Unión Europea con 65.459 millones de euros. Las frutas y hortalizas suponen el 47 % de la producción vegetal y el 29 % de la rama agraria.

En cuanto a las principales especies de frutos de hueso cultivadas en nuestro país, se encuentran el melocotón, la nectarina, el albaricoque, la cereza y el ciruelo destacando el melocotonero (incluido el nectarino) con 49.868 ha (FAO, 2018). Aragón produce el 29 % de los melocotones de nuestro país y el 31 % de las nectarinas (MAPA, 2018) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Producción de frutales de hueso Aragón 2019 (Anuario estadístico de Aragón 2019)

CULTIVO	SUPERFICIE EN PLANTACION REGULAR (ha)					ARBOLES DISEMINADOS (1)	PRODUCCION (t) (2)	DESTINO DE LA PRODUCCION EN LAS EXPLOTACIONES PRODUCTORAS (t)				Arranques en el año (ha)	Plantaciones nuevas en el año (ha)
	TOTAL			EN PRODUCCION				Reserva para consumo propio		Venta fuera de las explotaciones			
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío			Alimentación animal (3)	Alimentación humana	Para consumo o en fresco	Para transformación		
<b>DE HUESO</b>													
Albaricoquero	180	2.470	2.495	4.650	9.902	0	20.657	270	53	18.460	1.311	18	109
Cerezo y Guindo	3.336	5.611	8.810	4.281	7.723	0	41.391	158	37	38.346	2.949	46	499
Melocotonero	447	12.262	11.150	10.334	24.274	0	237.449	7.442	94	192.986	29.715	608	290
Nectarina	155	7.483	7.630	138	24.685	0	158.694	0	1	148.693	9.857	103	418
Ciruelo	140	994	1.101	5.129	11.842	0	11.044	218	21	10.884	27	95	43
Otros de hueso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Estos datos reflejan la importancia de España y de nuestra Comunidad Autónoma en lo que a producción de frutos de hueso se refiere. Sin embargo, a pesar de que España es el primer productor en Europa de fruta de hueso, más de la mitad de la producción va destinada a la exportación a países de la Unión Europea como Alemania, Inglaterra, Francia o Polonia (Costa et al., 2020).

Actualmente, España es el primer exportador europeo y tercero mundial por detrás de China y EE. UU, y los mayores problemas en su comercialización surgen en años lluviosos cuando el riesgo de aparición de podredumbres durante su distribución y venta aumentan significativamente.

Una vez analizados los números y viendo la importancia en nuestro país de la producción de estos frutales, conviene destacar que existe una gran pérdida económica debida a factores bióticos principalmente enfermedades fúngicas.

## **2.2. Podredumbres en frutas de hueso**

Numerosos patógenos son los que se han descrito y estudiado que provocan infección en frutales destacando el cribado, el oídio, la lepra, la roya y la podredumbre marrón o moniliasis como las más importantes debido a su gravedad e incidencia. Siendo esta última en la que vamos a hacer hincapié ya que ha sido nuestra infección estudiada en campo y su capacidad de infección en relación con el melocotonero.

### **2.2.1. *Monilinia* spp.: agente causal de la podredumbre parda**

La podredumbre parda del melocotonero (*Prunus persica* L. Batch) causada por hongos del género *Monilinia*, es una de las enfermedades más importantes de este cultivo y de otros frutales de hueso (cerezo, albaricoquero, ciruelo, almendro), y se encuentra presente en todas las zonas del melocotonero (De Cal y Melgarejo, 2000), causando marchitez en yemas y brotes, chancros en ramas y podredumbre en frutos (Ogawa y col., 1995; De Cal y Melgarejo, 2000). Las pérdidas más importantes se dan en los frutos, pudiendo llegar hasta un 80% en años con condiciones climatológicas favorables para el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en huertos de variedades tardías (Larena y col., 2005).

En la actualidad se conocen 35 especies diferentes del género *Monilinia*, pero 3 de ellas son las principales causantes de podredumbre parda: *Monilinia laxa* y *M. fructicola*, especialmente a frutales de hueso, y *M. fructigena* que afecta especialmente a frutas de pepita.





**Figura 1.** Principales especies de *Monilinia spp.* responsables de la podredumbre parda (Oliveira Lino et al., 2016).

La podredumbre del fruto es el síntoma más grave de la infección por *Monilinia spp.* Los frutos jóvenes son infectados a través de las flores contaminadas en los primeros estadios de su desarrollo. Mientras son verdes, éstos muestran generalmente resistencia a la infección, pero cuando empiezan a madurar se muestran más sensibles a la podredumbre marrón y es durante la post-recolección donde, generalmente, se dan las principales pérdidas en ciruelos, melocotones, albaricoques y cereza. La infección comienza con una pequeña y superficial mancha marrón que va extendiéndose progresivamente. En estas áreas epidérmicas dañadas van apareciendo conidióforos que rompen la epidermis. Generalmente, estas fructificaciones se sitúan en forma concéntrica dando bandas que toman un aspecto característico (figura 1).

Aunque existen diferencias en la sintomatología producida por estas 3 especies, su detección a simple vista en campo no es fácil de distinguir. El diagnóstico mediante las técnicas morfológicas clásicas basadas en el aspecto de la colonia, color, tasa de crecimiento, entre otros, resultan poco fiables para una correcta identificación a nivel de especie. En consecuencia, la metodología más recomendada para su identificación es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Gell et al. (2007) han diseñado una serie de primers específicos que permiten la identificación de estas tres principales especies de *Monilinia*.

Se conoce la presencia de *M. laxa* y *M. fructigena* en Europa y España desde hace años (M.-Sagasta, 1977). Hasta el año 2006, se consideraba que en España *M. laxa* o *M. fructigena* (De Cal y Megralejo, 1999) eran los principales agentes de la podredumbre parda siendo *M. laxa* la especie más frecuente llegando a acumular un 85-90 % de incidencia seguida de *M. fructigena* con el 10-15% restante (Larena et al., 2005). Sin embargo, *M. fructicola* fue registrada por primera vez en España en 2006. Por tanto, es una especie de reciente aparición y su procedencia es el Valle del Ebro (De Cal et al., 2009). Esta nueva especie, la cual posee una gran capacidad de

infección, ha llegado en pocos años a alcanzar los mismos valores de frecuencia relativa que *M. laxa* (Villarino et al., 2013) y siendo *M. fructigena* casi totalmente desplazada.

Dados estos datos se ha determinado que *M. fructicola* es la especie más virulenta en comparación con *M. laxa* y *M. fructigena*, ya que produce mayores lesiones en frutos y tiene un menor periodo de incubación y de latencia, destacar también, su capacidad de transmisión de la enfermedad debido a que su crecimiento es más rápido, produciendo tubos germinativos más largos y presenta una mayor capacidad de esporulación, así como un mayor número de esporodoquios (Villarino et al., 2016). *M. fructicola* es la especie más extendida a nivel mundial, estando presente en Asia, Norte y Sudamérica, Nueva Zelanda y Australia.

En Europa, hasta el año 2014 fue un patógeno incluido en la lista A2 de organismos en cuarentena de la UE (OEPP/EPPO, 2009). Debido a su actual expansión en diferentes países de Europa; Francia (Lichou et al., 2002), Hungría (Petróczy y Palkovics, 2006), Suiza (Bosshard et al., 2006), Alemania (Grabke et al., 2011), Republica Checa (Duchoslavová et al., 2007), Eslovenia (Munda y Viršček Marn, 2010), Italia (Pellegrino et al., 2009), Polonia (Poniatowska et al., 2013), Eslovaquia (Ondejková et al., 2010), Serbia (Hrustić et al., 2012) y España (De Cal et al., 2009), ha sido sacada de la lista A2 de organismos de cuarentena.

### 2.2.2. Ciclo de la enfermedad

Entrando a analizar más detalladamente el ciclo de infección, podemos decir que se trata de una enfermedad policíclica, es decir, que se desarrolla a través de sucesivos ciclos de infección en una misma estación. Durante cada ciclo se pueden diferenciar diferentes etapas como son la infección, esporulación, diseminación y en invierno encontraríamos la fase de supervivencia del hongo en su estado de latencia. A continuación, se detallan las diferentes etapas de la infección por este patógeno

- Infección:

Se denomina inóculo a cualquier estructura del patógeno que sea capaz de inducir la infección, por tanto, la inoculación se denomina al proceso de deposición del inóculo sobre el huésped. Podemos encontrar diferencias en los inóculos entre las especies descritas, siendo el inóculo de *M. laxa* y de *M. fructigena* esporas asexuales o conidias producidas en cadenas de conidias cuyos conidióforos están agrupados en esporodoquios. Por otro lado, encontramos que en la especie *M. fructicola* el inóculo

está formado por las esporas asexuales y las esporas sexuales o ascosporas producidas en cuerpos fructíferos denominados apotecios. Sin embargo, en España hasta ahora no se han detectado apotecios de *Monilinia* spp. Las conidias y ascosporas, deben ser dispersadas y depositadas en el huésped y deben mantenerse viables hasta que las condiciones se vuelvan favorables para la germinación (Wynn, 1981).

Una vez el inoculo se encuentra depositado sobre el huésped, debe llevar un proceso de penetración sobre el mismo que desarrolla en varias etapas. El proceso de pre-penetración se corresponde con la adhesión de la conidia a la cutícula, germinación de la conidia y el crecimiento del tubo germinativo y la formación del apresorio (Oliveira Lino et al., 2016). A continuación, se produce la penetración completa que implica, que la parte de punta del tubo germinativo denominada hifa, es capaz de segregar diferentes enzimas capaces de degradar la cutícula y penetrar a través de la pared celular del huésped, estableciéndose de esta manera una relación de parasitismo. La presencia de humedad cerca del fruto es un factor crucial para la germinación y el desarrollo de la infección de *Monilinia* spp. (Rungjindamai et al., 2014).

- Pre-penetración y penetración final en el huésped:

La capacidad de infección es elevada como ya hemos comentado y por lo tanto, encontramos diferentes métodos de penetración. La primera de ellas sería de forma directa, es decir, una vez que la conidia ha germinado, *Monilinia* es capaz de generar apresorios facilitando la penetración (Fourie y Holz, 2002). El apresorio permite una adhesión del patógeno a la superficie del fruto durante el proceso de infección (Lee y Bostock, 2006).

La penetración directa de *Monilinia* spp. implica la producción de cutinasa (Bostock et al., 1999), la cual resulta en un incremento de la virulencia de *Monilinia* spp. en la fruta de hueso (Lee et al., 2010).

El siguiente método de penetración sería a través de tricomas (vellosidad superficial del melocotón). Generalmente estas vellosidades se han descrito como barreras de defensa para el fruto, sin embargo, la fractura de los tricomas debida al aumento del volumen del fruto se convierte en grietas superficiales por las cuales la conidia puede penetrar al fruto (Gibert et al., 2007).

Seguimos con la penetración a través de los estomas. Su función principal es la de airear los gases producidos durante la fotosíntesis, pero, cuando el fruto madura estos estomas pueden convertirse en lenticelas, cerrándose y evitando la posibilidad de infección, o bien, pueden permanecer abiertos dejando libre la penetración e invasión del hongo (Roth, 1977). Sin embargo, esto solo ha sido demostrado bajo

condiciones de laboratorio y en pocos casos el centro de la lesión coincide con el estoma. Normalmente, la invasión inicial está relacionada con heridas en la superficie del fruto (Wade y Cruickshank, 1992). Otra opción es la aparición de heridas debido a agentes externos como insectos, granizadas o simplemente por partículas que puede transportar el viento.

Las infecciones latentes de *Monilinia* spp. son aquellas que se mantienen entre el proceso de pre-penetración y el siguiente de infección o penetración cuando las condiciones climáticas son desfavorables o bien el fruto todavía no ha alcanzado la madurez óptima (Luo et al., 2001). Conforme las condiciones climáticas mejoran y el fruto vaya madurando, el crecimiento del hongo se reinicia y por tanto el desarrollo de la podredumbre parda.

- Colonización

Una vez se ha producido la infección, el patógeno se establece entrando en contacto con el huésped y se alimenta de él. En esta fase, *Monilinia* spp. crece y se multiplica a través de los tejidos del huésped, invadiendo y colonizando el fruto. Los hongos se clasifican en tres grupos (necrótrofos, biótrofos y hemibiótrofos) según la estrategia que siguen para colonizar al huésped. *Monilinia* spp. es un hongo necrótrofo, ya que mata a las células del fruto y descompone el tejido obteniendo los nutrientes y utilizarlos para su crecimiento (Byrde y Willetts, 1977).

*Monilinia* spp. produce micelio y esporas justo encima de las lesiones primarias localizadas. Pero también, el micelio es capaz de penetrar en el huésped y expandirse por la parte del fruto infectado.

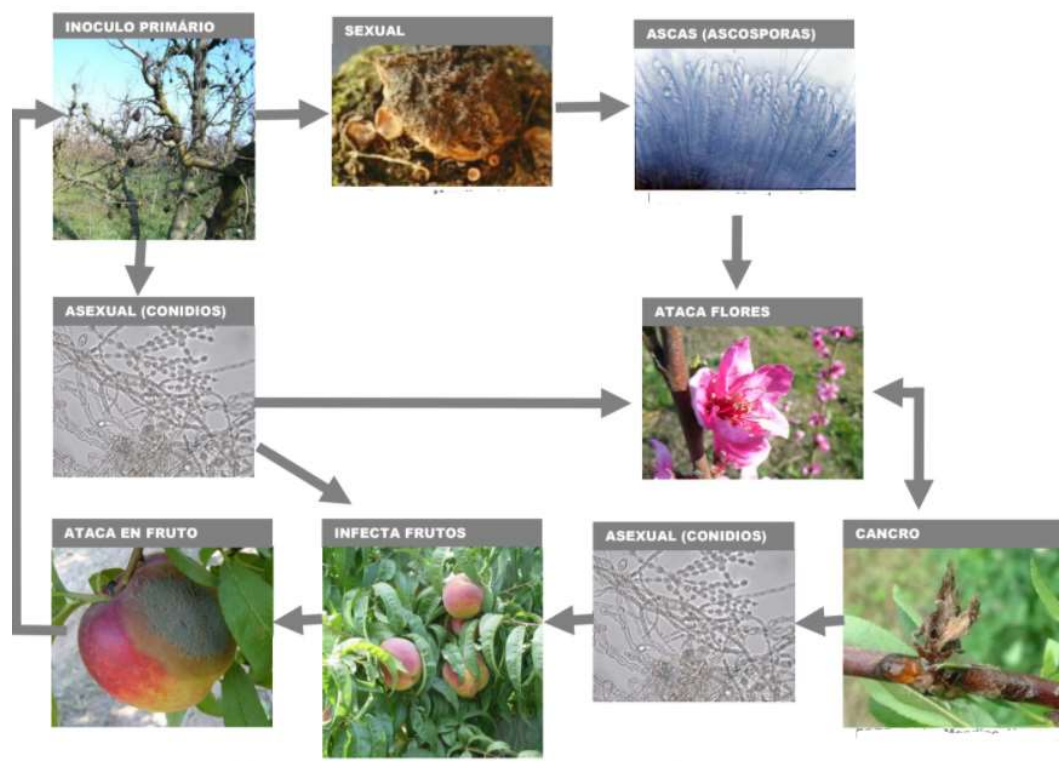
El viento es el principal agente de diseminación de las conidias de *Monilinia* spp., a corta y a larga distancia. Otros medios de dispersión de las conidias son el agua, los insectos y el hombre a través de los utensilios de poda. Otra forma de dispersión de la enfermedad, muy importante en los árboles y en las centrales hortofrutícolas, es la transmisión por contacto directo de un fruto podrido con frutos sanos. Esto provoca que un solo fruto podrido inicial infecte a los frutos vecinos que estén en contacto y así sucesivamente, acabando por infectar a todos los frutos de un ramo que estén en contacto.

- Supervivencia

El micelio vegetativo, de desarrollo únicamente interno, destruye los tejidos del mesocarpo que se ablandan y, poco a poco, van perdiendo el contenido hídrico y, tanto los frutos que caen al suelo como los que permanecen en el árbol, se momifican y

permanecen todo el invierno sin ser destruidos. Así, en invierno *Monilinia* spp, sobrevive fundamentalmente en forma de micelio en frutos momificados, tanto en los que caen al suelo como los que se quedan en los árboles, y en los chancros de la madera del árbol. Durante el invierno se puede observar el micelio esporulado después de días lluviosos y soleados. Al llegar la primavera, con el aumento de la temperatura y las primeras lluvias, se observa la presencia de abundantes esporodoquios sobre las momias esporuladas que liberan las esporas asexuales o conidias.

En la especie *M. fructicola*, las momias del suelo pueden producir en primavera tanto apotecios que darán lugar a ascosporas como cuerpos fructíferos asexuales (esporodoquios) que agrupan cadenas de conidias. En cambio, en las momias de los árboles solo se han descrito estructuras asexuales (Oliveira Lino et al., 2016, Holtz et al., 1998). En España, hasta ahora no se ha detectado la formación de apotecios sobre las momias del suelo (Gell et al., 2009).



**Figura 2.** Ciclo biológico e infección del patógeno *Monilinia* spp. en frutales.

### 2.2.3. Prevención y control de la enfermedad

#### 2.2.3.1. En la fase de precosecha

La utilización de **variedades** comerciales que presenten algún **nivel de resistencia o baja susceptibilidad** a la enfermedad se presenta como una de las alternativas a largo plazo. La variedad de melocotonero '*Bolinha*', originaria de Brasil presenta un mecanismo de resistencia que la hace menos susceptible que otras variedades (Miquel Peris Giner, 2013). En esta línea, existen al menos dos equipos de investigación en Europa (localizados en Francia e Italia) que están trabajando en la introducción de este carácter en variedades que puedan ser comercialmente interesantes en un futuro no muy lejano.

Otra práctica que se puede realizar en campo sería la de **reducción o eliminación de inóculo** del patógeno. Como se conoce, el patógeno sobrevive en el invierno en frutos momificados, flores, pedúnculos y chancros. Por tanto, la eliminación previa de aquellos generados el año anterior como los que se producen durante el mismo periodo vegetativo nos permitiría disminuir el inóculo para la siguiente cosecha. A nivel práctico y dado que el mayor reservorio de inóculo se encuentra en las momias que quedan adheridas a los árboles, es básico eliminar en el momento de la poda estos frutos momificados. La situación ideal sería retirarlos del campo, pero al menos, es imprescindible arrojarlos al suelo donde su capacidad infectiva disminuye considerablemente. Cuando los frutos están maduros sería conveniente también retirar los infectados para evitar su momificación y diseminación a otros frutos. Esta práctica reduce el nivel de inóculo, pero por sí sola no es suficiente para el control de la enfermedad.

Dos de los factores que favorecen el ciclo de la enfermedad son los ambientales, destacando la temperatura y la humedad. Se ha observado que la temperatura óptima para la germinación de las conidias de las especies de *Monilinia* se encuentra en el rango de 15 a 30 °C. En condiciones de laboratorio, se ha estimado que 25 °C es la temperatura óptima de desarrollo de *Monilinia* spp. (Papavasileiou et al., 2015).

Por tanto, otro factor a tener en cuenta es el manejo de diseño de plantación y favorecer aquellos factores que permitan unas buenas condiciones de insolación y ventilación, ya que como sabemos la alta humedad eleva el riesgo de infección. Por otro lado, una correcta gestión del riego y de la nutrición también reduce la incidencia de la enfermedad.

En esta línea, Mercier et al. (2009) obtuvieron reducciones muy significativas de

la incidencia de la enfermedad cuando se reducía la cantidad de agua aplicada y se realizaban podas de verano para eliminar los brotes que más destacaban. Además, el tipo de riego también puede ser importante ya que aquellos sistemas que puedan favorecer una elevada humedad en el campo (aspersión, microaspersión o inundación) favorecerán también un mayor desarrollo de la enfermedad.

Por último, hay que destacar que la mayoría de las infecciones se producen a través de heridas y fracturas que puedan generarse en la cutícula, es muy importante controlar un adecuado manejo de la carga frutal realizando aclareos, así como una aplicación de agua y fertilizante equilibrada para que no ocurran casos de distorsión en el desarrollo de la fruta acelerando procesos de maduración y crecimiento, ya que de esta manera se vería reducida la vida útil y favorecería la aparición de la enfermedad. Se recomienda también efectuar un prudente abonado nitrogenado que nunca debe ser excesivo ya que el nitrógeno reduce la plasticidad de los tejidos y posibilita claramente las roturas de la cutícula y epidermis, facilitando así la infección de estos hongos.

También hay que controlar otros factores que pueden favorecer la presencia de heridas sobre el fruto como son el pedrisco, la acción del viento y el control de plagas y enfermedades. En este sentido a la hora de realizar la elección varietal es importante tener en cuenta aquellas variedades de frutos que sean más proclives a presentar la alteración conocida como cracking o rajado, porque si las condiciones climáticas son favorables, la incidencia de la enfermedad será más elevada.

Por último, siempre es muy recomendable realizar una cuidadosa recolección de los frutos evitando los golpes, magulladuras y heridas y eliminando siempre los que muestren alteraciones.

Los tratamientos fungicidas, si son necesarios (especialmente en los cultivares sensibles y cuando los frutos vayan a ser conservados), deben ser efectuados de forma razonada con el fin de reducir lo máximo posible sus efectos secundarios (residuos, rotura del equilibrio biológico, etc.). Un plan de actuación puede ser el siguiente:

- En invierno con las yemas engrosadas, pero no abiertas, se debe tratar con mixtura sulfocálcica de unos 32°B a la dosis no mayor de 8-10 % mojando bien las ramas, especialmente las partes apicales. Este producto posee un efecto insecticida, acaricida y fungicida interesante.
- En vegetación y durante el ciclo de cultivo, se pueden realizar tratamientos con fungicidas de síntesis protectores y curativos (sistémicos). Estos últimos deben ser empleados cuando el follaje del árbol es ya considerable.

Como norma general, éstos formulados no se deben aplicar más de 2 veces en cada ciclo de cultivo. No obstante, si las condiciones meteorológicas son claramente predisponentes, calor y alta humedad, se puede aumentar el número de tratamientos (uno o dos más).

Los fungicidas deben ser empleados preferentemente en los periodos más sensibles de los árboles a la infección de *Monilinia* spp.: prefloración, postcujado y pre-recolección. Este último periodo no puede ser olvidado si los frutos van a permanecer un tiempo en conservación frigorífica.

Los fungicidas utilizados, teniendo en cuenta que no hay ninguno en el mercado que posea una eficacia mayor del 80 %, son: fludioxonil+cyprodinil (1), fenhexamida (1), tebuconazol (1), iprodiona (2), procimidona (3), difenoconazol (1) y fenbuconazol (1). Los marcados con (1) pueden ser aplicados durante todo el ciclo de cultivo. Los marcados (2) preferentemente en pre-recolección y los (3) sólo hasta la formación completa del fruto. Así, el control de esta enfermedad se basa por un lado en prácticas culturales y por otro en la aplicación de productos químicos en campo. En la tabla 2 se resumen las prácticas culturales y los métodos de control químico de la enfermedad recomendados en la producción integrada.

**Tabla 2.** Manejo de la moniliasis en producción integrada de frutales de hueso (REPIFH, Orden 31 de julio de 2013)

Criterio de intervención		Métodos de control	Limitaciones
Umbral	Época		
Preventivo en zonas de riego y condiciones favorables	De floración a recolección	<p><b>QUÍMICO</b></p> Ciproconazol (FH9) Ciprodinil (FH1) Ciprodinil + Fludioxonil (11) Clortalonil (FH1+FH10) Difenoconazol (13) Fenbuconazol (FH1) Fenhexamida Iprodiona Mancozeb (13) Maneb Metil tiofanato Metiram (FH6) Tebuconazol Tiram (13+FH1)	(1) Máximo de 3 aplicaciones (2) No en plena floración *No a ciruelo
		<p><b>CULTURALES</b></p> Eliminar brindillas infectadas en la poda de invierno Eliminar frutos momificados	



Sin embargo, en las últimas 3 décadas, el empleo de fungicidas convencionales está siendo restringido ya que son un foco de contaminación del medio ambiente, pueden suponer un riesgo para la salud humana, ya que podemos encontrar restos químicos en la superficie de las frutas y favorecen la aparición de nuevas cepas patógenas que pueden ser resistentes a estos fungicidas.

Desde el inicio de los 90, la Directiva del Consejo 91/414/EEC de 15 de Julio de 1991 sobre la puesta en el mercado interno de Productos de Protección de Plantas (PPPs), era probablemente la legislación más prominente de la Unión Europea con respecto a los pesticidas. Esta Directiva pretendía armonizar la legislación respecto a la puesta en el mercado de PPPs dentro de la UE, estableciendo criterios acordados para considerar la seguridad de las sustancias activas, así como la seguridad y efectividad de los productos (cultivos) en que pudieran ser usadas. La Directiva disminuyó el número de sustancias activas en el mercado interno y como consecuencia, el número de pesticidas individuales. Actualmente, el llamado “paquete de pesticidas” contiene el Reglamento 1107/2009, respecto a la puesta en el mercado de PPPs, así como otras tres piezas de legislación:

- Directiva Marco 2009/128/EC en el uso sostenible de los PPPs
- Reglamento (CE) N.º 1185/2009 sobre estadísticas de pesticidas. Los elementos clave de esta regulación son las provisiones de ventas anuales y de datos cada cinco años en su uso en productos que son representativos de aquellos cultivados en los Estados miembro y en los pesticidas utilizados.
- Directiva 2009/127/EC enmendando la directiva 2006/42/EC respecto a la maquinaria para la aplicación de pesticidas. Establece los estándares que los nuevos equipos deben cumplir antes de ser puestos en el mercado.

El reglamento (CE) 1107/2009 ha introducido también nuevas medidas tendentes a simplificar el proceso de autorización de pesticidas. La intención es acelerar la toma de decisiones y asegurar un nivel de actuación en la zona en términos de disponibilidad de pesticidas. Adicionalmente el nuevo reglamento (CE) N.º 1107/2009 introdujo provisiones concernientes a la “sustitución.”

Así, el 27 de enero de 2015 fue presentada para su votación en la reunión del Comité Plantas, Animales, Alimentos y Piensos (PAFF Committee) la “Lista de sustancias identificadas como ‘Candidatas para Sustitución (CfS)’”.

Esta lista:

- a) identifica sustancias activas con determinadas propiedades plaguicidas
- b) condiciona a los Estados Miembros a evaluar si estos PPPs pueden ser reemplazados (sustituídos) por otros.

En el Reglamento de Ejecución 2015/408 de la Comisión se establece esta amplia lista de sustancias candidatas a la sustitución, entre las que se incluyen materias activas de uso habitual en la agricultura. Durante el cultivo, los frutales de hueso son tratados con varias de las sustancias que aparecen en la lista de sustitución de este Reglamento. Dentro de estas sustancias se encuentran algunos compuestos a base de cobre (hidróxidos, óxidos, oxiclóruos...), los azoles (ciproconazol, tebuconazol o difenoconazol), el ciprodinilo o la bifentrina, todos ellos usados en los estadios iniciales antes y durante la floración como medidas preventivas, principalmente frente a *Monilinia* spp. y pulgones.

Aunque las especies de *Monilinia* están clasificadas como patógenos con moderado riesgo de desarrollar resistencia a los fungicidas, la aparición de aislados de *Monilinia* resistentes a benzimidazoles, dicarbosimidias y triazoles en distintas partes del mundo ha sido demostrada después de varios años de exposición a los fungicidas (Chen et al., 2013, Thomidis et al., 2009). En España también se han descrito cepas de *Monilinia* spp. resistentes a ciertos fungicidas (Egüen et al., 2015). El uso de fungicidas en la Unión Europea y en España es bastante limitado.

En este marco se hace, por tanto, indispensable la búsqueda de nuevas alternativas más sostenibles para el medio ambiente que nos puedan ayudar a controlar las enfermedades fúngicas.

#### **2.2.3.2. En la fase de post-cosecha**

Se denomina post-cosecha al periodo desde la recogida de la fruta o cosecha en campo pasando por clasificación, empaquetado, almacenamiento y transporte, hasta que el producto final llega a los consumidores. Es en esta fase donde la infección producida por *Monilinia* spp. toma una especial relevancia ya que contribuye con un 80 % a las pérdidas generadas por todos los patógenos que afectan a frutales de hueso. En lo que respecta a las pérdidas económicas, éstas son más difíciles de cuantificar, pero a nivel europeo en el 2011 se estimaron pérdidas entre los 850-900 millones de euros (Mari et al., 2014).

Las infecciones de *Monilinia* spp. normalmente ocurren en campo, aunque las podredumbres suelen aparecer durante la post-cosecha, bien durante el almacenamiento o el transporte (Tian y Bertolini, 1999) ya que durante esta etapa también existen factores ambientales y propios del fruto que van a favorecer el desarrollo de la infección.

Cuanto mayor es la maduración de los frutos en la cosecha, mayor es la susceptibilidad a la podredumbre parda (Kader y Mitchell, 1989). Como sabemos la fruta después de la cosecha es más susceptible ya que disminuyen las barreras naturales que se oponen a la infección como cambios en la textura del fruto, en sus azúcares y ácidos o también en la cantidad de los distintos fenoles que contiene.

Por otra parte, otro factor determinante es la temperatura de conservación. Se ha descrito la relación existente entre la reducción de tiempo desde la cosecha hasta el almacenamiento en refrigeración de la fruta, consiguiendo de esta manera reducir la infección (Lurie, 2002) y la no interrupción de la cadena de frío durante el almacenamiento, transporte y venta al por menor son factores clave.

Por tanto, es recomendable la adopción de buenas prácticas en el desarrollo de actividades en el procesado de la fruta como son métodos de manejo evitando golpes y heridas y condiciones óptimas de almacenamiento ya que vamos a conseguir ralentizar la maduración del fruto reduciendo su actividad metabólica.

Analizamos, a continuación, las operaciones que tienen lugar en una central hortofrutícola y cómo podemos en cada una de ellas disminuir el inóculo fúngico y la propagación y desarrollo de la podredumbre parda.

- *Volcado y selección*: en esta primera fase debemos minimizar los daños por impacto y las heridas y eliminar todos aquellos frutos con síntomas de afección fúngica.

- *Enfriamiento*: la temperatura del fruto debe disminuirse lo antes posible para disminuir tanto el metabolismo del producto como el crecimiento del hongo. Para ello los sistemas que consiguen disminuir la temperatura en el menor tiempo son el enfriamiento por aire forzado y el enfriamiento por inmersión en agua fría, más conocido por hidrocooling. En cualquier caso, la selección del método dependerá de la naturaleza del producto, así como sus requerimientos de empaquetado y de las instalaciones que disponemos.

- *Lavado y limpieza*: la fruta puede llevar adherida a su superficie partículas del suelo o restos que pueden estar contaminados por patógenos, pudiéndose desarrollar en la

etapa de almacenamiento. Para la limpieza, el método más utilizado es añadir cloro al agua de lavado, el cual también puede disminuir la presencia de *Monilinia* spp. (Phillips y Grendahl, 1973).

- *Confección*: en esta fase los productos se clasifican según sus características como pueden ser tamaño o estado de madurez. También se continúa con la eliminación de frutos en los que se aprecie visualmente podredumbre o daños externos debidos a golpes.

- *Almacenamiento*: el almacenamiento en cámaras refrigeradas para frutas de hueso debe realizarse a una temperatura de entre 0 a -1°C y una humedad relativa de entre 90-95%, no siendo recomendable superar las 5 semanas de refrigeración.

También, de forma general, dentro de las centrales frutícolas de la industria, podemos realizar diferentes buenas prácticas que pueden ayudar a reducir infecciones por *Monilinia* spp. En primer lugar, un aspecto importante es la limpieza y desinfección de las propias instalaciones (líneas de confección, volcado de la fruta, etc.), así como, lugares de almacenamiento (cámaras frigoríficas, envases donde se almacena la fruta).

Como ya sabemos, por norma general, las infecciones por *Monilinia* spp. son producidas en campo y la mayoría permanecen latentes o incipientes hasta la cosecha. Por lo tanto, los tratamientos post-cosecha para controlar la podredumbre parda, deben proporcionar tanto un efecto curativo para las infecciones ya establecidas en campo como un efecto preventivo para las posibles nuevas infecciones producidas por las conidias presentes en la superficie del fruto (Casals et al., 2012).

En lo que respecta al empleo de fungicidas, la única sustancia autorizada para el control de la podredumbre parda en post-cosecha de frutos de hueso es el fludioxonil. Actualmente es la casa comercial Syngenta la que comercializa el formulado, Scholar® con fludioxonil al 23% para su aplicación en la post-cosecha de frutos de hueso. No obstante, este fungicida se encuentra en la lista de PPPs candidatos a sustitución por lo que tanto empresas como investigadores buscan activamente estrategias para sustituir su uso.

En los últimos años se ha llevado a cabo una serie de estudios centrándose en tres líneas para el control de la podredumbre parda: los métodos de control biológico (antagonistas microbiológicos), compuestos bioactivos naturales y métodos físicos (Usall et al., 2015). De estas tres estrategias vamos a profundizar en dos de ellas: el control biológico, representado por microorganismos del género *Bacillus*, y el empleo de sustancias naturales, en concreto de la goma tara.

### 2.3 Control biológico enfermedades fúngicas

El control biológico es un componente más que forma parte de las estrategias de gestión integrada de plagas. Se define como la reducción de la población de una plaga por enemigos naturales y donde normalmente interviene la acción humana. Estas plagas pueden estar causadas por insectos, ácaros o microorganismos en plantas y hierbas. Dentro de los componentes de un control biológico, se encuentran:

-Patógeno, agentes bióticos o abióticos capaces de alterar el normal funcionamiento de la planta y de esta forma ser causante de una enfermedad.

-Antagonistas, se define como el oponente o adversario, en este caso al patógeno. Se trataría del propio agente de control biológico que tendría como misión interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Un organismo antagonista puede presentar hasta cinco modos de acción frente al patógeno: competencia, antibiosis, explotación, resistencia inducida en el huésped y lisis.

Los otros dos factores determinantes serían las características tanto del ambiente como del propio huésped.

Existen tres estrategias básicas para el control biológico de plagas: clásica (importación), donde el enemigo natural de la plaga es introducido con el objetivo de lograr el control; inductiva (aumento), en la cual una gran población de enemigos naturales es administrada para un rápido control de la plaga e inoculativo (conservación), donde las medidas son tomadas para mantener los enemigos naturales mediante un restablecimiento regular. Los enemigos naturales de las plagas de insectos, también conocidos como agentes de control biológico (ABCs), incluye depredadores, parásitos, patógenos y competidores. Por otro lado, los ABCs en enfermedades de plantas son más conocidos como antagonistas (Flint y Dreistadt, 1998).

El **control biológico clásico** consiste en la introducción de enemigos naturales de los responsables de las plagas y en un nuevo ambiente donde no se encontraban de manera natural. Durante las últimas tres décadas ha habido una clara tendencia a seleccionar microorganismos antagonistas (bacterias y levaduras, sobre todo) como agentes de biocontrol (Teixidó et al., 2011). Muchos de ellos han sido descritos como agentes efectivos en la reducción de podredumbres post-cosecha en fruta de hueso

(Guijarro et al., 2006; Larena et al., 2005), peras y manzanas (El-Ghaouth et al., 2007; Zhang et al., 2008), cítricos (Costa et al., 2001; Zheng et al., 2005) y fresas (Karabulut et al., 2004).

Sin embargo, la mayoría de las publicaciones científicas se basan en el estudio de los mecanismos de acción y la interacción ABC-patógeno y son pocas las investigaciones centradas en el desarrollo de productos comerciales de biocontrol. Es evidente que antes de desarrollar estos bioformulados que conllevan unos costes de producción elevados, es necesario conocer el comportamiento de los ABCs en contacto con los patógenos y los cultivos, pero no se debe olvidar la aplicación final (Burges et al., 1998).

Dentro de las especies del género *Bacillus*, destaca ***Bacillus velezensis***, anteriormente clasificada como *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, que se caracteriza por ser una bacteria grampositiva, móvil, catalasa-positiva, aero-anaerobia facultativa, productora de endosporos, de antibióticos y de una matriz extracelular que le permite formar biopelículas y comúnmente se encuentra en la rizosfera, por lo que su aislamiento no suele resultar complejo.

Este género bacteriano ha demostrado la capacidad para producir metabolitos secundarios, entre ellos policétidos y lipopéptidos, que destacan por su actividad fúngica (Alvarez et al., 2012), así como compuestos orgánicos volátiles (Gotor-Villa et al., 2017a) e incluso provocar resistencias sistémicas en las plantas para inducir su autodefensa (Chowdhury et al., 2015).

La cepa de *B. velezensis* BUZ-14 fue aislada de la superficie de frutos de melocotón y ha demostrado una elevada actividad antifúngica en estudios *in vitro* e *in vivo* (Calvo et al., 2017, 2019, 2020, 2021) frente a numerosos patógenos post-cosecha y especialmente frente a *M. laxa* y *M. fructicola*. Calvo et al. (2017) demostraron que la cepa de *B. velezensis* BUZ-14 controlaba totalmente el desarrollo de la podredumbre marrón causada por *M. fructicola* y *M. laxa* en la post-cosecha de melocotones, siendo el lipopéptido iturina A el principal implicado en la inhibición (Calvo et al., 2019).

Hasta hace poco tiempo solamente *Bacillus subtilis* (Serenade Max®, Bayer CropScience) se encontraba a nivel comercial, y su uso se restringía a aplicaciones en campo. Actualmente hay una gran variedad de productos de biocontrol comerciales a base de cepas de *Bacillus* como es el caso de RhizoVital® (*B. amyloliquefaciens* FZB42; ABiTEP, GmbH, Berlin, Germany), Amylo-X® WG (*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747; Certis Europe BV, Netherlands), RhizoPlus® (*B. amyloliquefaciens* FZB24; ABiTEP, Berlín, Alemania), Sonata® (*B. pumilus* QST2808; AgraQuest, Inc.,

Davis, California, USA) y Taegro® (*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24; Novozymes Biologicals, Inc., Salem, Virginia, USA) (Rabbee et al., 2019).

Entre ellos, hay algunos registrados en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA) como fitosanitarios, en concreto Amylo-X WG®, Serenade AS® y Florbac®.

El **control biológico natural**, se refiere al control biológico que ocurre naturalmente en los diferentes agroecosistemas. Este tipo de control se observa cuando el ambiente no es afectado por prácticas culturales erróneas, principalmente con el uso indiscriminado de productos químicos, que afecta tanto a las plagas, como a los enemigos naturales disponibles en el medio ambiente (Huaker & Messenger, 1976). Por otro lado, puede ser favorecido cuando las prácticas agronómicas se realizan con el fin de conservar los enemigos naturales presentes o cuando se utilizan agroquímicos selectivos para el manejo integrado de plagas (MIP) (Barbosa, 1998), siendo importante por ser responsable de la mortalidad natural en el agroecosistema y, consecuentemente, por el mantenimiento del nivel de equilibrio de las plagas (Parra et al., 2002).

Por último, **el control biológico aplicado** (CBA) se trata de liberaciones en masa de parasitoides o depredadores (después de la creación masiva en laboratorio), buscando la reducción de la población de la plaga hasta su nivel de equilibrio. Este tipo de control es bien aceptado por el usuario, ya que presenta un tipo de acción rápida, similar a la aplicación de insecticidas convencionales. El CBA se refiere al concepto básico de control biológico conocido como multiplicación (creaciones de masas), que presentó gran desarrollo con la utilización de dietas artificiales para insectos, especialmente a partir de la década del 70 del siglo pasado (Capalbo, 2006). Para la producción masiva y eficiente de los predadores en laboratorio, se deben tener en cuenta los factores extrínsecos, que son las técnicas utilizadas para la multiplicación de los insectos, materiales empleados, la manipulación de las fases de desarrollo, el control de calidad y los costos de producción. Los factores intrínsecos están relacionados con la fisiología del insecto, como la adaptabilidad a la dieta, el potencial reproductivo, la fecundidad y la fertilidad (Carvalho & Souza, 2000).

### 2.3.1 Aplicación en precosecha

Los estudios científicos basados en aplicaciones de productos de control biológico durante la precosecha son bastante escasos en comparación con la post-

cosecha. En este caso, es indispensable determinar la manera y los momentos de aplicación.

El modo de acción estudiado previamente es el principal factor a tener en cuenta durante esta última fase, ya que, en función de la manera de interacción entre los dos microorganismos y la planta, las fenologías en las que aplicar y el número de tratamientos pueden variar significativamente. Este tipo de productos son aplicados como los pesticidas convencionales, ya sea mediante pulverización o de manera sistémica a través del riego o radicularmente, y aunque no son tan eficaces como los fitosanitarios químicos (Bardin et al., 2015), una combinación adecuada entre ambos podría hacer que aumentase su eficacia considerablemente. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en probar productos biológicos por sí solos, confiando toda la actividad antimicrobiana en un solo microorganismo (Calvo-Garrido et al., 2019; Carbó et al., 2019). Sin embargo, los resultados siguen sin ser todavía demasiado positivos como para poder prescindir de los pesticidas de síntesis. Por ello, las nuevas tendencias del biocontrol se basan en combinar diferentes antagonistas, extractos antimicrobianos, otros métodos físicos sostenibles, e incluso con químicos en dosis mucho más bajas que las actuales con el fin de disminuir la cantidad de residuos que se acumulan en plantas y medioambiente (Gotor-Vila et al., 2017b; Ji et al., 2019). Para esto, son imprescindibles estudios que demuestren la compatibilidad de los ABCs con todas estas sustancias con las que se van a combinar, y además, con aquellos fitosanitarios que se apliquen en parcelas cercanas ya que, por la acción de viento, podrían desplazarse a la zona de aplicación biológica e influir en la supervivencia de los agentes.

Como ya se ha comentado anteriormente, el efecto antagónico de las cepas de *B. velezensis* podría estar asociado a la actividad de los metabolitos secundarios, Sin embargo, en las plantas, pocos estudios han encontrado estos metabolitos en las inmediaciones de las raíces o en otros lugares que no sea el propio fruto, exceptuando la surfactina (Chowdhury et al., 2015; Nihorimbere et al., 2012). Por ello, un modo de acción muy estudiado actualmente y que ha demostrado formar parte de la interacción entre patógeno-ABC-planta es la estimulación de las propias resistencias de la planta, ya sea por la surfactina, compuestos orgánicos volátiles u otros compuestos todavía no identificados. La RSI se define como la mejora de la capacidad defensiva de toda la planta frente a un amplio espectro de patógenos, adquirida mediante la inducción local,



por ejemplo, en raíces por microorganismos beneficiosos (Pieterse et al., 2014). La inducción de resistencias fue inicialmente demostrada por *Pseudomonas* spp. y otras bacterias gramnegativas asociadas a las raíces, pero poco después también se asoció a especies del G<sup>o</sup> *Bacillus*, incluyendo *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Kloepper et al., 2004).

Normalmente, las rizobacterias inducen defensas a las plantas a través de la estimulación de los genes que expresan la producción de ácido jasmónico y/o etileno.

### **2.3.2 Aplicación en post-cosecha**

Aunque la aplicación post-cosecha de productos de biocontrol todavía no está permitida se deben ir concretando los protocolos de empleo de estos agentes. En cuanto a la forma de aplicación de este biocontrol, se ha concretado que lo más adecuado sería poder aplicar el bioformulado mediante drencher o ducha, al igual que con los fitosanitarios tradicionales. Los formulados comerciales de biocontrol no tienen periodo de seguridad, por lo que la aplicación tras la recolección asegura mantener el agente actuando durante el transporte y distribución.

Al estar incluidos como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe), la ingesta de este tipo de microorganismos no supone un riesgo para el consumidor.

Pero la realidad es que no existe un protocolo capaz de determinar el grado de infección latente en nuestro producto y poder diseñar el tratamiento que sea más adecuado a nuestras circunstancias a partir simplemente de un muestreo en campo. Si no que para poder elegir el método adecuado que debemos aplicar, hay que estudiar y conocer la capacidad de interacción de estos agentes de biocontrol y los agentes patógenos.

La hipótesis que está cobrando actualmente más fuerza y la cual es caso de estudio en este trabajo de investigación, ha sido la inducción de resistencias de los ABCs en las plantas, provocando la inducción de sus propios mecanismos de defensa (Cawoy et al., 2014).

### **2.3.3 Combinación de los agentes de biocontrol con otros productos**

Algunos ABCs son capaces de desarrollarse directamente en la planta y producir antibióticos durante su crecimiento, pero las propias características intrínsecas de algunos frutos hacen difícil su proliferación. Además, estos formulados deben ir

acompañados de coadyuvantes o “carriers” que permitan un buen mojado y mantenerse en la planta durante las aplicaciones, ya sea en pre- o post-cosecha. En la actualidad, hay un interés creciente en el desarrollo de materiales termoplásticos a partir de polímeros biodegradables, en particular los derivados de recursos renovables.

Las biopelículas contienen materias primas procedentes de fuentes agrícolas, es decir, se producen a partir de materias primas biológicas renovables como el almidón y los monómeros biodescendidos. La goma tara se usa en la industria agroalimentaria como agente espesante y estabilizador y se obtiene moliendo el endospermo de las semillas del árbol *Caesalpinia spinosa* (Fam. Leguminosae). Dicha goma está compuesta de polisacáridos de alto peso molecular, principalmente galactomananos y tiene una relación 3:1 de manosa a galactosa. Este aditivo cumple con los estándares científicos requeridos para su clasificación como ingrediente alimentario.

La harina de semillas de tara o más sencillamente la **goma de tara**, es un aditivo natural obtenido del endosperma molido de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, una planta de la familia de las leguminosas. La goma tara, conocida también con el nombre de carruba peruana, es un polvo blanco-amarillento, soluble en agua caliente y parcialmente soluble en agua fría.

Desde el punto de vista químico, la goma de tara está constituida por polisacáridos, principalmente galactomananos de alto peso molecular. En 1986, el Comité Mixto de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) / Organización Mundial de la Salud (OMS) de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) evaluó la seguridad de la goma de tara (E417) y la clasificó como un aditivo alimentario dentro de los límites de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP). En los alimentos la goma tara se usa principalmente para espesar soluciones acuosas y para controlar la movilidad de materiales dispersados o disueltos. Esta goma posee las características propias de las gomas vegetales, actuando como espesante, aglomerante, estabilizador, coloide y capa protectora.

Estudios realizados en el seno del Grupo de Investigación “Alimentos de Origen Vegetal” liderados por el Dr. Jesús Val han demostrado que puede regularse la nutrición cálcica a los frutos de especies leñosas como el melocotón mediante el uso de distintas mezclas de goma tara y calcio (Val et al., 2010, 2011, 2018). La goma tara en presencia de iones calcio forma un polímero con características de gel elástico y termorresistente y forma geles estables que perduran en la superficie de los frutos varios meses (Fernandez et al., 2010). La naturaleza del polímero reticulado goma tara-calcio permite

secuestrar otros compuestos e incluso formas de vida simples como podrían ser los agentes de biocontrol asegurando así su permanencia en las distintas superficies de las plantas como hojas y frutos.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La limitación o prohibición del uso de fungicidas para el control de enfermedades tanto en precosecha como en post-cosecha de fruta es una problemática de elevada magnitud en el sector frutícola actual, por lo que el desarrollo de estrategias alternativas como el control biológico es fundamental para la producción de fruta de calidad. La implementación de programas de biocontrol eficaces, requiere de un profundo conocimiento de la capacidad de control y los mecanismos de acción usados por el agente microbiano que se pretende emplear, así como de la factibilidad para que éste pueda ser producido y formulado a nivel comercial.

Por lo tanto, el objetivo general del presente proyecto es el estudio del potencial de la cepa *Bacillus velezensis* BUZ-14 como agente de biocontrol de la podredumbre marrón en frutos de hueso tanto en pre- como en post-cosecha empleando para ello dos parcelas experimentales de melocotón y nectarina situadas en la Estación Experimental Aula Dei (Montañana, Zaragoza).

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) **Identificación de las especies de *Monilinia* spp.** que afectan a las plantaciones experimentales de fruta de hueso de la Estación Experimental de Aula Dei (Montañana, CSIC)

El primer paso, y de vital importancia, fue determinar las especies de *Monilinia* spp. que afectan a las plantaciones en cuestión. Su identificación además de que permitirá establecer la eficacia de los tratamientos sobre cada una de ellas también aportará datos sobre la prevalencia de las distintas especies fúngicas en las distintas variedades frutales.

- b) Aplicación del **protocolo de detección precoz** de las principales cepas de *Monilinia* spp. identificadas

La detección precoz de las cepas de *Monilinia* spp. nos informa de aquellos estados fenológicos donde el cultivo es más sensible a la infección por estos patógenos. Esta información combinada con recuentos microbiológicos convencionales y muestreos de expresión de la enfermedad permite concretar los momentos del ciclo fenológico donde el cultivo es más sensible a la infección.

c) **Aplicación del agente de biocontrol BUZ-14 en precosecha: optimización de los formulados y estudio de su tolerancia a pesticidas químicos**

El agente de biocontrol se aplicará en aquellos momentos del ciclo fenológico que se hayan identificado como más sensibles a la infección. En este punto es necesario establecer la necesidad de la combinación del agente de biocontrol con un “carrier” formulado con goma tara que garantice tanto su fijación al material vegetal como su nutrición y, en caso de aplicación de productos fitosanitarios lo proteja de un contacto directo. Una vez aplicado el agente o el agente combinado con goma tara se realizarán muestreos para contabilizar las poblaciones de BUZ-14, lo que nos informará de su supervivencia en el cultivo y por tanto evaluar la necesidad del “carrier” empleado.

Paralelamente, se determinará la tolerancia *in vitro* del agente de biocontrol a diversos productos fitosanitarios empleados en el cultivo de frutos de hueso para establecer su posible combinación.

d) Desarrollo de una **estrategia de aplicación del agente de biocontrol en post-cosecha**

La eficacia de BUZ-14 para controlar la aparición de la podredumbre marrón en post-cosecha de melocotón ya ha sido evaluada y con excelentes resultados (Calvo et al., 2017). Sin embargo, estos ensayos fueron realizados mediante inoculación artificial de *M. laxa* y *M. fructicola* por lo que es necesario realizar estudios piloto en los que la eficacia se determine ante una infección natural. Para ello, una vez los frutos sean recolectados, el agente es aplicado mediante drencher simulando las condiciones de una aplicación práctica en una central hortofrutícola. Durante la conservación se determina la incidencia de podredumbres (identificando la especie o especies responsables) y la dinámica poblacional del agente de biocontrol.

En cuanto a la contribución del TFE a los Objetivos de Desarrollo sostenible (ODS), este proyecto contribuye al **Objetivo 2** (Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible), ya que el empleo de métodos no químicos para el control de las enfermedades fúngicas contribuye al desarrollo de una agricultura más sostenible, promoviendo la regeneración del microbioma tanto de los árboles como del suelo de cultivo. Además, la producción de frutas con menos residuos de pesticidas contribuye a la seguridad alimentaria ya que reduce la ingesta de estas sustancias en uno de los grupos de alimentos con mayor volumen de consumo per capita.

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. Prospección, selección y seguimiento de las parcelas objeto de estudio**

#### **4.1.1. Selección de las parcelas**

La primera de las tareas se centró en la selección de las parcelas en las que se va a llevar a cabo el proyecto. Las parcelas seleccionadas se encuentran en las instalaciones del CSIC en la Estación Experimental de Aula Dei. Tras la prospección de las parcelas presentes en la Estación se seleccionaron dos de ellas, una cultivada con una variedad de melocotón (Andros x Calante) y otra con una variedad de nectarina (Venus x Big Top). Para la selección de las parcelas y el seguimiento de estas se contó con la colaboración del Dr. Jesús val y su equipo, así como de la Dra. María Ángeles Moreno.

Ambas parcelas han mostrado durante los años anteriores elevada incidencia de podredumbre marrón, en especial la parcela de melocotón, la cual al tener una fecha de recolección más tardía permite un mayor desarrollo de la enfermedad. En la prospección de las parcelas se detectaron abundantes momias y chancros que, en el caso del melocotón afectaban al 100 % de los árboles y en la nectarina al 73% de individuos.

En la parcela de melocotonero coexisten árboles con flor rosácea y campanulácea (según la expresión de los individuos parentales). En este caso se seleccionaron 36 árboles en los que, como se detallará posteriormente, se aplicaron los distintos tratamientos precosecha. Todos ellos eran melocotoneros de flor campanulácea cuya recolección se completa en 15 días.

Además, teniendo en cuenta las características de cada árbol (fecha de recolección, tipo de flor, cosecha media anual, etc.) se ha intentado dejar árboles a no contemplar en este estudio para evitar posibles cruces de tratamientos entre los árboles de los distintos lotes.

En la figura 3 se puede observar la disposición de los árboles empleados en el estudio siendo aquellos marcados con “X” los que, bien por poseer flor rosácea o bien para evitar cruces de tratamientos, no fueron empleados en el estudio.

ANDOS X CALANTE DISEÑO EXPERIMENTAL (CAMPAÑA2019)							
Nº árbol	TTO	Nº árbol	TTO	Nº árbol	TTO	Nº árbol	TTO
D1F10A1	X	D1F9A16	X	D1F8A40	T2	D1F7A48	X
D1F10A2	X	D1F9A17	X	D1F8A41	X	D1F7A49	X
D1F10A3	T3	D1F9A18	T3	D1F8A42	X	D1F7A50	T4
D1F10A4	X	D1F9A19	X	D1F8A43	X	D1F7A51	X
D1F10A5	X	D1F9A20	X	D1F8A44	T1	D1F7A52	X
D1F10A6	T1	D1F9A21	T4	D1F8A45	T3	D1F7A53	X
D1F10A7	X	D1F9A22	X	D1F8A46	T4	D1F7A54	X
D1F10A8	X	D1F9A23	T1	D1F8A47	X		
D1F10A9	T4	D1F9A24	X	D1F8A48	T1		
D1F10A10	T3	D1F9A25	X	D1F8A49	T2		
D1F10A11	X	D1F9A26	T3	D1F8A50	X		
D1F10A12	X	D1F9A27	X				
D1F10A13	X	D1F9A28	T2				
D1F10A14	T2	D1F9A29	X				
D1F10A15	X	D1F9A30	T4				
D1F10A16	T2	D1F9A31	X				
D1F10A17	T4	D1F9A32	X				
D1F10A18	X	D1F9A33	X				
D1F10A19	X	D1F9A34	T1				
D1F10A20	X	D1F9A35	T2				
D1F10A21	T1	D1F9A36	X				
D1F10A22	X	D1F9A37	X				
D1F10A23	X	D1F9A38	T3				
D1F10A24	X	D1F9A39	T2				
D1F10A25	T3	D1F9A40	X				
D1F10A26	X	D1F9A41	X				
D1F10A27	T4	D1F9A42	T1				
D1F10A28	X	D1F9A43	T3				
D1F10A29	T2	D1F9A44	T4				
D1F10A30	X	D1F9A45	X				
D1F10A31	X						
D1F10A32	T1						
D1F10A33	T3						
D1F10A34	T4						
D1F10A35	X						
D1F10A36	T2						
D1F10A37	T1						
D1F10A38	X						
D1F10A39	X						
D1F10A40	X						
D1F10A41	X						
D1F10A42	X						
D1F10A43	X						

Nº TTO	Producto
T1	Testigo
T2	BUZ-14
T3	GT+Ca
T4	BUZ+(GT+Ca)

**Figura 3.** Disposición y tratamientos de los melocotoneros en la parcela objeto de estudio.

\*Los árboles marcados con una “x” no son amparados en el estudio de aplicación de formulados pre- y post-cosecha.

Del mismo modo, se ha realizado un seguimiento de estos 36 árboles desde el inicio de la floración para la toma y análisis de material vegetal sospechoso de estar infectado.

En el caso de la parcela de nectarina, se realizó un muestreo para la detección precoz de la enfermedad, pero no se aplicaron tratamientos de biocontrol.

A continuación, la figura 4 muestra una imagen de la finca experimental donde se sitúan las parcelas de melocotón (marcado en naranja) y de nectarina (marcado en fucsia). Se puede apreciar como los melocotoneros se distribuyen en 4 filas de distinta longitud mientras que los nectarinos se disponen en una única fila.



**Figura 4.** Imagen de las parcelas D1 melocotón (naranja) y D2 nectarina (fucsia) de la finca experimental de la EEAD-CSIC.

#### **4.1.2. Identificación de las especies fúngicas responsables de la podredumbre marrón en las parcelas seleccionadas**

Para la determinación de las cepas fúngicas causantes de la podredumbre marrón, en las parcelas de estudio se procedió a la toma de muestras de material vegetal en las “momias” (figura 5) y ramas para, posteriormente, proceder al aislamiento y detección mediante técnicas microbiológicas y moleculares de las cepas de *Monilinia* spp. existentes en cada parcela. Se tomaron un total de 18 muestras de la parcela de



melocotoneros y 12 de la parcela de nectarina.



**Figura 5.** Momias detectadas en la parcela de melocotonero

Las muestras seleccionadas fueron analizadas por microbiología clásica y las colonias aisladas fueron identificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las momias seleccionadas se diluyeron en agua de peptona al 0,1 % (Merck, Darmstadt, Alemania) y se homogenizaron en un stomacher 400 Circulator (Seward Laboratory, Londres) durante 2 minutos. Una vez homogeneizadas, se realizaron las correspondientes diluciones decimales que se sembraron por extensión en superficie en placas de agar patata dextrosa (PDA, Merck) y en placas de agar dicloran rosa bengala y cloranfenicol (DRBC, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 5 días. Tras la incubación se procedió al aislamiento de las colonias de *Monilinia* spp. y a su posterior identificación por técnicas de biología. La identificación se realizó en las instalaciones de Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón con la ayuda del Dr. Pedro Marco.

#### **4.1.3. Detección precoz de *Monilinia* spp.**

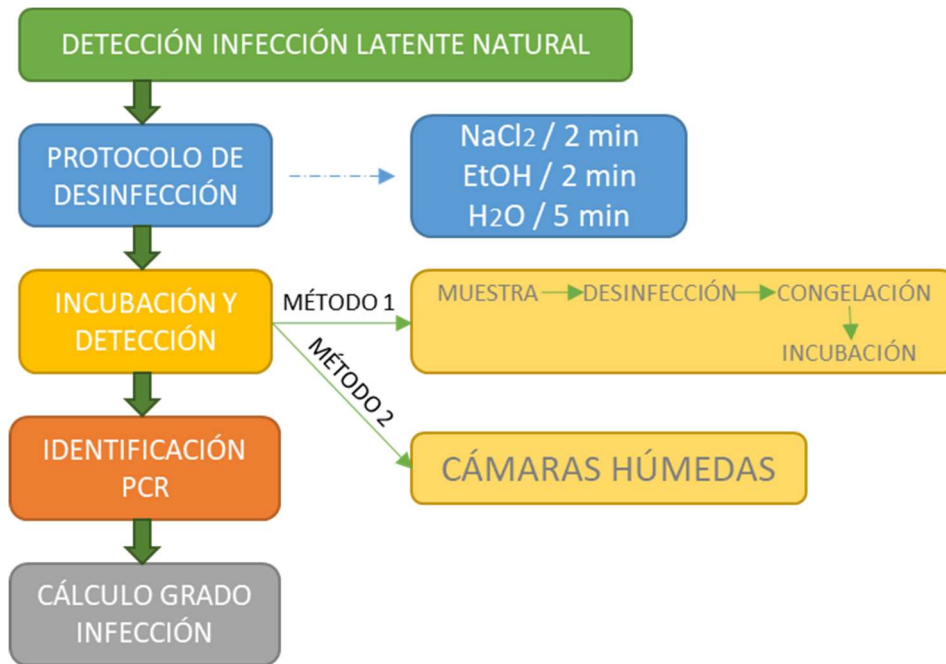
El objetivo fundamental de esta actividad fue determinar el estado fenológico más susceptible de infección por *Monilinia* spp. y aquel en el que la detección precoz puede ser más representativo del estado sanitario de nuestra parcela.

Para ello se tomaron muestras al inicio de floración, plena floración, cuajado del fruto, fruto verde y frutos en madurez comercial (listo para recolección) (tabla 3).

**Tabla 3.** Estado fenológico, fecha de toma de muestra, número de flores/frutos de melocotonero muestreados la detección precoz de la enfermedad en campo.

Estado fenológico	Fecha toma muestra	Nº de individuos muestreados
 Plena floración (F)	11.03.2019	25 flores/lote
 Cuajado (H)	04.04.2019	25 frutos/lote
 Fruto en crecimiento (I)	09.05.2019	25 frutos/lote
 Evolución maduración (J)	19.09.2019	10 frutos/lote
 Fruto Maduro	29.08.2019	5 frutos/lote

La toma de muestras se realizó de forma aleatoria y posteriormente se estableció un protocolo de detección de infección latente natural (figura 6). En todos los estados fenológicos se realizaron en paralelo dos métodos (método 1 y método 2) para comprobar cuál es el más adecuado según el estado de evolución de los frutos.



**Figura 6.** Esquema de los protocolos de detección de infecciones latentes en flor/fruto.

Para la desinfección previa de las muestras se empleó un procedimiento común a los 2 métodos consistente en una inmersión de 2 minutos en hipoclorito sódico al 0,5 % seguida de otra inmersión de 2 minutos en etanol al 96 %. Finalmente, las muestras se sumergieron en agua destilada durante 5 minutos y se dejaron secar sobre papel de filtro.

Posteriormente las muestras se dividieron en 2 grupos a los que se aplicaron 2 procedimientos de incubación

- Método 1: las muestras fueron congeladas a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 5 días y posteriormente incubadas. Para esta incubación cada muestra fue individualmente envuelta en algodón previamente humedecido (figura 7).



**Figura 7.** Muestras de flores de melocotonero dispuestas para su incubación.

- Método 2: las muestras fueron individualmente envueltas en algodón previamente humedecido e incubadas como en el método 1.

Tras la incubación, las muestras fueron analizadas por PCR para determinar la presencia de infección latente. La detección por PCR se realizó en las instalaciones del Parque Científico Aula Dei con la ayuda de la Dra. Yoko Higaki. Para ello se procedió a la extracción de ADN, amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos y detección de ADN de *Monilinia* por electroforesis de agarosa.

Paralelamente se realizó un análisis microbiológico clásico para determinar cuál de las dos estrategias consigue detectar un mayor porcentaje de infecciones latentes. Para ello, se siguió idéntico procedimiento al detallado en el apartado 4.1.2.

## **4.2. Aplicación de agentes naturales de biocontrol en precosecha**

### **4.2.1. Formulación y aplicación de los tratamientos de biocontrol**

Los tratamientos de biocontrol aplicados en la parcela de melocotonero fueron:

- ***Bacillus velezensis* BUZ-14**
- **Goma tara + sal de calcio**
- ***Bacillus velezensis* BUZ-14 y goma tara + sal de calcio**

El **bioformulado del agente de biocontrol** *B. velezensis* BUZ-14 fue producido por la empresa Arvensis Agro (Zaragoza, España) siguiendo las recomendaciones establecidas para este microorganismo en estudios anteriores del Grupo de Investigación. El formulado cuya concentración celular fue de  $10^{10}$  -  $10^{11}$  bacterias/mL se recibió refrigerado en contenedores plásticos de 25 L de capacidad. El producto se mantuvo en refrigeración ya que en estudios anteriores se había constatado que el producto así conservado mantenía su viabilidad y eficacia.

La formulación con goma tara se preparó y aplicó de acuerdo con las recomendaciones del Dr. Jesús Val. Dichas especificaciones se encuentran registradas bajo secreto industrial.

Los formulados conjuntos de goma tara y BUZ-14 se prepararon por dilución de este último en proporción 1:5 (BUZ-14: goma tara).

En base a la bibliografía existente y la experiencia previa dado el alto índice de infección de las parcelas, las aplicaciones con los formulados naturales comenzaron coincidiendo con la floración, momento considerado de alto riesgo para la penetración del patógeno. Así, en el melocotón se aplicó desde la fase final de plena floración hasta 15 días antes de la madurez comercial y se realizaron un total de **cuatro aplicaciones** de los tratamientos:

- 1ª aplicación: 15.03.2019
- 2ª aplicación: 16.04.2019
- 3ª aplicación: 20.06.2019
- 4ª aplicación: 28.08.2019

Como ya se ha detallado en la figura 4, se emplearon 36 árboles de la parcela de melocotoneros divididos en:

- 9 árboles para el grupo **control** (no recibirá ningún tratamiento) (T1).
- 9 árboles para el tratamiento con ***Bacillus velezensis* BUZ-14** (T2).
- 9 árboles para el tratamiento con **goma tara + sal de calcio** (T3).
- 9 árboles para el tratamiento con mezcla en proporción 1:5 de ***Bacillus velezensis* BUZ-14 en la solución de goma tara + sal de calcio** (T4)

Los productos se aplicaron mediante atomización con ayuda de unas mochilas de aplicación de fitosanitarios en campo (figura 8).



**Figura 8.** Aplicación de los agentes antifúngicos naturales en campo mediante atomización del producto con mochila de aplicación de fitosanitarios.

#### 4.2.2. Viabilidad del agente de biocontrol

En el momento anterior a las aplicaciones e inmediatamente después de éstas se realizó un **seguimiento del crecimiento/mantenimiento del ABC en los frutos**. Para ello se tomaron aleatoriamente 20 flores o frutos (dependiendo del estado fenológico del cultivo en el momento de la toma de muestra) y se llevó a cabo su dilución en agua de peptona 0,1 %, homogeneización en Stomacher, siembra de las diluciones decimales en agar triptonsoja (TSA, Merck) e incubación a 30 °C durante 24 horas. Tras la incubación se determinó el número de *Bacillus* presente en las muestras. Dichos resultados permitieron conocer la distribución del agente en los frutos y su supervivencia en el cultivo.

También se depositaron pequeños restos de ramas directamente en placas de agar TSA para ver si el agente de biocontrol es capaz de crecer y expresarse en condiciones óptimas de crecimiento en presencia de otros géneros microbianos presentes de forma natural en la muestra.

#### 4.2.3. Determinación de la incidencia de podredumbres en recolección

Los árboles empleados en este estudio varían en su fecha de recolección ya que proceden de parentales con fechas de cosecha muy distintas. Las fechas de recolección para el parental 'Andros' comienza la segunda semana de agosto, pasando por un pico de máxima cosecha sobre el 20 de agosto y terminando a mitad de la primera quincena de septiembre. Por el contrario, el parental 'Calante' alcanza su madurez comercial la primera semana de octubre y se extiende hasta finales de mes. Así, los primeros fueron recolectados el 30 de agosto y se realizaron dos cosechas posteriores, la segunda cosecha se realizó el 9 de septiembre y la tercera (última) el 18 de septiembre de 2019. Hay que destacar que en esta anualidad la recolección de los frutales se adelantó entre 15 y 20 días respecto a las fechas de recolección de la campaña anterior.

Se recolectaron todos los frutos presentes en los árboles seleccionados para el estudio y se determinó la incidencia de la podredumbre en los melocotones sometidos a los distintos tratamientos con los agentes antifúngicos naturales de biocontrol frente a los melocotones control. Para ello se tuvo en cuenta todos los frutos presentes en los árboles de cada tratamiento. Dicha incidencia se calculó tanto en cada tiempo de recolección como para todos los tratamientos una vez finalizada la campaña de recolección.

Para el cálculo del porcentaje de incidencia (DI) se utilizó la siguiente fórmula:

$$DI (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ frutos infectados}}{N^{\circ} \text{ frutos totales}} \times 100$$

#### 4.3. Determinación de la tolerancia del ABC a pesticidas comerciales

El uso de pesticidas en precosecha está destinado a eliminar organismos como mohos, bacterias fitopatógenas, parásitos, ácaros e insectos. El objetivo de esta actividad fue determinar la concentración de fungicida a la que nuestra cepa BUZ-14 podría ver inhibido su crecimiento y así establecer cuando sería viable su combinación en los cultivos en una posible aplicación precosecha.

Los pesticidas utilizados se clasificaron según el organismo contra el que actúan (fungicidas o insecticidas). El nombre comercial, principio/s activo/s y la dosis recomendada se recogen en la tabla 4.

**Tabla 4.** Pesticidas y dosis de referencia de usos testados en el crecimiento *B. velezensis* BUZ-14.

Nombre comercial	Principio activo	Tipo de pesticida	Dosis recomendada
<b>Luqsol 98</b>	ACEITE MINERAL	Insecticida	0,75 mL/100 mL
<b>Atominal 10 EC</b>	PIRIPROXIFEN	Insecticida	0,005 mL/100 mL
<b>Teppeki</b>	FLONICAMID	Insecticida	0,013 g/100 mL
<b>Armicarb</b>	CARBONATO DE HIDRÓGENO DE POTASIO	Fungicida	0,7 g/100 mL
<b>Droxicuper-50</b>	HIDRÓXIDO CÚPRICO	Fungicida	0,2-0,4 g/ 100 mL
<b>Luna Experience</b>	FLUOPIRAM + TEBUCONAZOL	Fungicida	0,026 mL/100 mL
<b>Tiram Flow</b>	TIRAM	Fungicida	0,3 mL/100 mL

En el caso de los insecticidas fueron estudiados tres: Luqsol Premium EC (Luqsa, Sudanel, Lleida), Atominal 10 EC (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Alemania) y Tepeki (Belchim Crop Protection, Alcobendas, Madrid).

Luqsol Premium EC está formulado a base de aceite de origen mineral (aceite de parafina 79 % p/v), compuesto principalmente por moléculas hidrocarbonadas saturadas. Este concentrado emulsionable está diseñado para maximizar su eficacia y minimizar cualquier fitotoxicidad potencial. Su uso más común es para el control de cochinillas, pulgones y ácaros en almendros, caqui, avellanos y granado, contra ácaros y pulgones en cítricos y contra ácaros en frutales de hueso y de pepita, entre otros.

Atominal 10 EC es el insecticida de la empresa química BASF derivado de la piridina. Actúa por contacto e ingestión, actuando sobre el crecimiento de los insectos al comportarse como una hormona juvenil. Está autorizado en el control de cochinilla, mosca blanca, piojo de San José y otros insectos chupadores en diferentes cultivos, entre los frutales de hueso.

Teppeki® es un aficida sistémico (50 % de Flonicamid), que pertenece a la familia de las piridinocarboxamidas. Actúa como inhibidor de la alimentación, tanto por contacto como por ingestión. Teppeki® es altamente eficaz frente a un amplio rango de especies de pulgones diferentes.

El resto de los pesticidas empleados destacan por su acción fungicida siendo estos, Armicarb® (Certis, Alicante, España), Droxicuper-50 (Trade Corporation International, Madrid, España), Luna Experience® (Bayer Crop Science, Quart de Poblet, Valencia, España) y Tiram Flow (Brant Europe, Carmona, Sevilla).

Armcarb® es un fungicida con acción preventiva y curativa para el control de oídio, botritis, monilia, moteado y sarna en varios cultivos. Su ingrediente activo es de origen mineral y se puede encontrar en la naturaleza. Posee un doble modo de acción: por un lado, es preventivo ya que eleva el pH de la superficie foliar inhibiendo la acción de las enzimas hidrolíticas del hongo patógeno y por otro actúa como secante provocando una deshidratación y destrucción de las células del hongo.

Droxicuper-50 es un fungicida formulado con hidróxido cúprico 50 % (p/p). Su actividad es preventiva, con un amplio campo de actividad y buena persistencia. Se piensa que, debido a su capacidad de quelación, el cobre sustituye a otros metales esenciales para la vida de los organismos en cantidades infinitesimales produciendo una intoxicación y consecuentemente la muerte. Su actividad la ejerce por contacto fundamentalmente durante la etapa de germinación de las esporas.



Luna® Experience es un fungicida que combina fluopiram (200 g/L) con tebuconazol (200 g/L) empleado para el control de monilia y oídio en frutales de hueso.

Tiram Flow, compuesto por tiram al 50 % p/v (500 g/L), es un fungicida de contacto, no sistémico, para aplicación foliar y al suelo, de amplio espectro y aplicación preventiva con actividad sobre enfermedades producidas por endoparásitos y hongos del suelo empleado para combatir el moteado, monilia, cribado, chancro y antracnosis en frutales de hueso.

Para determinar la interacción de la cepa BUZ 14 con los pesticidas, se estableció la concentración de estas sustancias que permite su crecimiento mediante la técnica del agar enriquecido, a partir de una concentración de referencia (dosis recomendada por el fabricante).

Para ello, distintas cantidades de pesticida se mezclaron con agar extracto de levadura y dextrosa (Merck) y se dispusieron en placas de Petri. Tras ello, la cepa BUZ-14, previamente cultivada en caldo 863 (10 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura y 20 g/L de glucosa) durante 24 horas a 30 °C en un agitador rotatorio a 150 rpm (revoluciones por minuto), se sembró por agotamiento. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas. El rango de concentraciones testadas de dichos fungicidas e insecticidas fue desde concentración de referencia dividido entre 10 (/10) hasta concentración de referencia multiplicado por 10 (x 10).

#### **4.4. Aplicaciones post-cosecha basadas en formulados naturales y biológicos.**

##### **4.4.1. Aplicación de los tratamientos**

###### **4.4.1.1. En nectarina**

En nectarina se aplicó el formulado a base de *B. velezensis* BUZ-14 en dos concentraciones: 1:5 (TTO 1:5) y 1:10 (TTO 1:10) durante 5 minutos. Tras la aplicación de dicho formulado, las nectarinas se conservaron en refrigeración durante 7 y 14 días a 1 °C seguido de un periodo de simulación de la comercialización de 3 y 4 días a 20 °C, tras el cual se determinó el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad. Estas condiciones simulan el proceso de conservación y comercialización que los frutos seguirían en una central hortofrutícola.

La incidencia se expresa como porcentaje de frutos afectados de podredumbre respecto del total de frutos recolectados mientras que la severidad se estableció en función de la superficie del fruto afectada de podredumbre mediante la escala: grado 0 (no afectado); grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %) (tabla 5 y figura 9)

**Tabla 5.** Escala de grados de severidad de podredumbre.

Grado de severidad de podredumbre	% de superficie afectada
0	0
1	1-25
2	26-50
3	51-75
4	76-100



**Figura 9.** Escala de grados de severidad de podredumbre marrón en fruta de hueso: grado 0: no afectado; grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %).

#### 4.4.1.1. En melocotón

Tras la recolección, una fracción de los frutos de cada uno de los lotes se almacenó directamente en refrigeración durante 10 días a 1 °C y un posterior periodo de simulación de la comercialización de 3 días a 20 °C. Tras la simulación de la comercialización se determinó la incidencia de podredumbres.

El otro lote de frutos fue tratado con el bioformulado de BUZ-14 en dilución 1:5. El tratamiento se aplicó con ayuda de un drencher para 3 cajas de la empresa Agrofresh-Tecnidex (figura 10). Con este equipo, se estandariza el proceso de aplicación de los productos post-cosecha, pudiendo controlar de forma automática el tiempo y volumen/min de producto en contacto con la fruta (66 L/min durante 2 minutos). Además, este equipo permite el correcto escurrido de producto sobrante tras el tratamiento, facilitando el manejo de los distintos lotes objeto de estudio. Tras la aplicación de dicho

formulado, los melocotones se almacenaron en refrigeración durante 10 días a 1 °C y posterior simulación del período de comercialización de 3 días a 20 °C.



**Figura 10.** Drencher (duchadora) a escala piloto de la empresa Agrofresh-Tecnidex (Valencia, España) para aplicación de tratamientos post-cosecha.

#### 4.4.2. Determinación de la capacidad de desarrollo del agente de biocontrol en la superficie del fruto

Paralelamente a los ensayos de conservación se realizaron **recuentos de BUZ-14** en la superficie de los frutos para determinar si el microorganismo era capaz de desarrollarse. Para ello se dispusieron dos lotes distintos: un lote de frutos en el que tras el tratamiento con BUZ-14 se les realizó dos pequeñas heridas y otro lote sin dañar. El objetivo de este ensayo era doble, por un lado, comprobar si BUZ es capaz de proteger frente al ataque de patógenos cuando el fruto es dañado (situación que puede suceder durante la manipulación post-cosecha) y, por otro, determinar si el microorganismo se multiplica en la superficie del fruto o precisa de una herida donde pueda acceder a los nutrientes.

El bioformulado (concentración celular  $10^{10}$ - $10^{11}$  ufc/mL) fue aplicado mediante pulverización sobre la superficie de los frutos. Tras el tratamiento, a los 2, 4, 7 y 10 días en refrigeración (2 °C) y tras 2 y 4 días a 20 °C se procedió al recuento de *B. velezensis*. Para ello, se tomaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> mediante escisión laminar en los frutos intactos (sin herida) y de 1 g de piel y pulpa en la zona adyacente a la incisión en los frutos con herida. Ambas porciones se llevaron a homogenizar con agua de peptona al 0,1% y

posteriormente se realizaron diluciones seriadas para poder sembrar en placas de agar TSA. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 24 horas tras lo cual se procedió al recuento de las colonias presentes. Se muestrearon 3 frutos por lote en cada uno de los puntos de control y los resultados se expresaron en ufc/g o ufc/cm<sup>2</sup>.

#### 4.4.3. Determinación de la calidad fisicoquímica post-cosecha de los frutos

Además de realizar los tratamientos post-cosecha con el agente de biocontrol, 25 melocotones de cada lote se destinaron al **análisis de calidad de fruto** en el momento de la cosecha. Se realizaron las siguientes determinaciones:

- **Peso** (gramos), con ayuda de una balanza se midió el peso de los frutos y se determinó el peso medio por lote
- **Calibre** (milímetros): con un pie de rey se realizó la medida longitudinal y transversal de los frutos, permitiendo conocer el calibre medio los distintos lotes.
- **Firmeza**: La firmeza se evaluó por dos procedimientos diferentes: uno no destructivo empleando el sensor acústico AFS (AWETA, Pijnacker, Países Bajos) (figura 11) y mediante otro destructivo utilizando un penetrómetro digital modelo AGROSTA 100 (Agro Technologie, Forges les Eaux, Francia) (figura 10) usando una sonda de 8 mm. Los resultados se expresan en unidades AWETA y en Kg, respectivamente.



**Figura 11.** Sensor acústico (izquierda) y penetrómetro digital (derecha)

- **Sólidos solubles**: El contenido en sólidos solubles totales (SST) se determinó en zumos elaborados a partir de porciones de 4 melocotones diferentes mediante refractometría con un equipo digital (ATAGO, modelo DBX 55) (figura 12), con un corrector automático de temperatura. Los resultados se expresan en ° Brix a 20 °C.



**Figura 12.** Refractómetro digital para la medida de los SST

- **Acidez:** El contenido total en ácidos orgánicos se determinó en zumos elaborados a partir de porciones de 4 melocotones diferentes, mediante valoración con una solución de NaOH 0,1N, con un equipo automático modelo CRISON Compact Titrator (figura 13). Para ello 10 mL de zumo se mezclaron con 90 mL de agua destilada. El valor de la acidez se expresó como gramos de ácido málico/Kg.



**Figura 13.** Titulador para la determinación de la acidez

- **Color:** La medida instrumental de color se realizó con un colorímetro Minolta (modelo CR400) (figura 14). El colorímetro mide la cantidad de luz que se refleja sobre una superficie. Se basa en una esfera integradora donde se hace incidir un haz de luz, parte de la luz se absorbe y parte se refleja y el equipo analiza es la luz reflejada. Se utiliza un iluminante D65 y un observador CIE 31 con un 10° de campo visual.

El sistema utilizado es el HUNTER CIELAB, que transforma la representación tridimensional gráfica del espectro de colores en ejes de coordenadas. Los parámetros que nos ofrece el equipo son los siguientes:

-Luminosidad ( $L^*$ ): cantidad de luz reflejada, claridad, luminosidad o brillo

0= negro; 100= blanco.

-Cromaticidad: definen el color

a = índice de rojo:  $a^*$  positivo (0-50) = rojo;  $a^*$  negativa (-50-0) = verde

b = índice de amarillo:  $b^*$  positivo (0-50) = amarillo;  $b^*$  negativa (-50-0) = azul

-Tono ( $h^*$ ) =  $\arctg(b^*/a^*)$ . Si el resultado es negativo hay que sumar 360.L



**Figura 14.** Medida de color mediante el colorímetro Minolta

#### 4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico a los resultados obtenidos utilizando el software PSPP versión 1.2.0 (GNU PSPP, Boston, EE. UU.). Las diferencias en los valores medios de los resultados obtenidos se analizaron con un ANOVA (Análisis de Varianza) de una vía y se separaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Identificación de las especies fúngicas responsables de la podredumbre marrón en los campos experimentales del CSIC.**

Los análisis realizados nos permitieron conocer la presencia de cepas de *Monilinia laxa* y *Monilinia fructicola*. En un 83,3 % de las muestras analizadas mediante técnicas de microbiología clásica se detectó la presencia de *Monilinia* spp. de las cuales un 60 % se identificaron molecularmente como *M. laxa* y un 40 % como *M. fructicola*. En el caso de la parcela de nectarina *Venus x BigTop* en el 75% de las muestras se detectó la presencia de *M. fructicola* mientras que *M. laxa* se detectó en el 25 % restante.

Como hemos comentado anteriormente, *M. laxa* y *M. fructigena* habían sido las principales especies causantes de esta enfermedad en España. Sin embargo, desde el año 2006, una tercera especie, *M. fructicola* se ha ido introduciendo en diferentes zonas frutícolas de Europa (Villarino et al., 2012), por lo que ya se ha retirado de la lista de enfermedades de cuarentena de la UE. *M. fructicola* degrada la cutícula y la epidermis, coloniza inter e intracelularmente las células epidérmicas y mesocárpicas del fruto, provocando el colapso y rotura de las mismas (García-Benitez et al., 2016). Por tanto, de las tres especies citadas, *M. fructicola* es la que causa mayores lesiones sobre la fruta de hueso y la que presenta un menor periodo de incubación y latencia, seguida de *M. laxa* y por último de *M. fructigena* (Villarino et al., 2016). *M. fructigena* se presenta como la especie menos agresiva sobre la fruta de hueso y prácticamente ha desaparecido como patógeno del melocotón en el Valle del Ebro desde la irrupción de *M. fructicola* (Villarino et al., 2013).






Se puede constatar que en ambas parcelas coexisten las dos especies de *Monilinia* que afectan mayoritariamente a los frutales de hueso de nuestra comunidad autónoma: *M. fructicola* y *M. laxa*, prevaleciendo la primera sobre la segunda

### **5. 2. Detección precoz de *Monilinia* spp.**

La detección precoz de *Monilinia* en las parcelas frutales es una herramienta muy útil para determinar la posible afectación posterior de nuestro cultivo. En el presente trabajo se ha comparado la detección por microbiología clásica con dos procedimientos de detección precoz, uno con congelación previa de la muestra y otro sin ella, y confirmación por técnicas de biología molecular.

Se ha obtenido como resultado que la detección precoz con congelación acompañada de identificación por PCR presenta una mayor capacidad de detectar muestras positivas que la microbiología clásica (tabla 6) y, además, era capaz de detectar esta positividad a partir de estado fenológico (fruto en crecimiento) y no en los estadios anteriores de plena floración y cuajado.

**Tabla 6.** Estado fenológico, fecha de toma de muestra, número de flores/frutos muestreados y estado de la detección de la enfermedad en campo.

Estado fenológico	Detección microbiología clásica	Detección PCR
 Plena floración (F)	Negativa	Negativa
 Cuajado (H)	Negativa	Positiva
 Fruto en crecimiento (I)	Negativa	Positiva
 Evolución maduración (J)	Positiva	Positiva
 Fruto Maduro	Positiva	Positiva

La aplicación en precosecha, especialmente en los momentos de mayor probabilidad de infección como la floración, es vital para poder asegurar un control de las infecciones en post-cosecha (Ippolito and Nigro, 2000; Moretto et al., 2014).



De hecho, Spadaro et al. (2014) ya distinguieron dos maneras de aplicar los ABCs en el campo para conseguir esa protección en fases posteriores; una de ellas consistía en aplicar el agente justo antes de la cosecha para que las posibles heridas ocasionadas fueran colonizadas por el antagonista antes de ser infectado por el patógeno; y la otra consistía en aplicar el agente durante todo el desarrollo del fruto, de manera que las infecciones latentes originadas incluso antes de la formación de botones florales pudieran ser reducidas.

Por ello, y a pesar de que no se detectó positividad en los estadios de plena floración y cuajado, pero si ya en el fruto en crecimiento, se estableció el momento de plena floración como el primer momento de aplicación del agente de biocontrol (ABC).

### 5.3. Aplicación de agentes naturales de biocontrol en precosecha

El objetivo de esta actividad fue optimizar la aplicación del agente de biocontrol en aplicaciones precosecha y profundizar en los posibles mecanismos de acción de este agente.

#### 5.3.1. Optimización de la aplicación

Se estableció un protocolo de tratamiento con 4 momentos de aplicación en el melocotonero desde la fase final de plena floración hasta 15 días antes de la madurez comercial y tanto del ABC aplicado sólo como combinado con un agente de recubrimiento (goma tara).

Para comprobar la correcta aplicación y supervivencia del ABC en los cultivos (colonización) periódicamente se realizaron recuentos microbiológicos (tabla 7).

**Tabla 7.** Recuento de *Bacillus velezensis* BUZ-14 (log unidades formadoras de colonia (ufc)/g) en melocotoneros *Andros x Calante* antes y después de cada tratamiento realizado en campo con las distintas formulaciones de agentes antifúngicos naturales (antes = justo momento anterior a la aplicación del tratamiento, después = 1 día tras la aplicación de los agentes antifúngicos)

Tratamiento	Recuento de <i>B. velezensis</i> BUZ-14 (log ufc/g)							
	1ª aplicación		2ª aplicación		3ª aplicación		4ª aplicación	
	antes	después	antes	después	Antes	Después	antes	después
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	8,2	4,2	6,9	5,0	6,2	3,5	5,9
Goma tara	-	2,0	1,8	2,4	-	1,5	-	1,7
<i>B. amyloliquefaciens</i> + goma tara	-	4,9	3,2	4,8	3,9	5,5	3,7	5,5

Inmediatamente tras los tratamientos con el agente de biocontrol sin combinar con goma tara, los recuentos fueron elevados (6-8 ufc/g) sobre todo en el caso de la primera aplicación en flor. La falta de follaje en esta primera aplicación permitió una aplicación más intensa en las flores que va disminuyendo conforme aumenta la vegetación y el tamaño del fruto. Un mes tras la primera aplicación se observa que el agente de biocontrol disminuye 4 unidades logarítmicas situándose en 4 unidades. No es de extrañar este resultado ya que en este intervalo las flores se transforman a frutos con lo cual el agente tiene muchas probabilidades de disminuir e incluso de no ser detectado. En las siguientes aplicaciones, separadas dos meses entre ellas, la disminución fue de 2-3,5 unidades logarítmicas. Sin embargo, siempre detectamos recuentos en torno a las 4 unidades, lo que garantiza la supervivencia del tratamiento objeto de estudio en las condiciones del cultivo.

En la combinación de BUZ-14 con goma tara las concentraciones iniciales inmediatamente tras la aplicación fueron menores ya que en este caso el bioformulado había sido diluido 5 veces. En el primer mes la concentración disminuyó en 1,7 unidades logarítmicas, 1 en los dos siguientes meses y 1,8 en los dos últimos, pero manteniéndose siempre en torno a las 3,5-4 unidades logarítmicas lo que también garantiza su supervivencia.

Se incluyó también en estos análisis los árboles tratados sólo con el formulado de goma tara. A pesar de que los árboles se separaron para evitar contaminaciones entre tratamientos, se quiso comprobar si esta medida había sido totalmente efectiva. Se observa que, tras la aplicación de algunas unidades del agente se depositan en los árboles no tratados con concentraciones en torno a las 2 unidades logarítmicas y también que 2 meses después de las últimas aplicaciones, los recuentos son indetectables.

La colonización es una característica esencial en los ABCs durante la aplicación en el campo. Esto favorece la persistencia de los agentes durante un tiempo prolongado en la rizosfera, pudiendo ejercer así su acción antimicrobiana sin la necesidad de aplicar el producto en periodos de tiempo muy cortos. Esta es una de las principales razones por las que el género *Bacillus* está siendo tan estudiado. La producción de endosporos permite su supervivencia en ambientes extremos durante un largo periodo de tiempo, a diferencia de lo que ocurre con otros microorganismos como levaduras y bacterias esporógenas. Por otra parte, esto podría evitarse si las células no formaran parte del modo de acción, es decir, que fueran los metabolitos producidos los responsables de ese antagonismo.

Cuando se habla de precosecha, normalmente se asocia a un campo abierto donde las condiciones climatológicas son incontrolables por el ser humano. Sin embargo, hay muchos estudios que se han centrado en testar estos productos en invernaderos, lugares cerrados con condiciones controladas por el agricultor y donde los efectos del tiempo no pueden estropear los resultados de toda una campaña (Ji et al., 2019). Generalmente, estos estudios se realizan en productos hortícolas, ya que son los que más se cultivan en este tipo de terreno. Los resultados obtenidos en estos cultivos muestran como el control biológico es una alternativa prometedora que en condiciones controladas como invernaderos o tras la recolección han demostrado cierta consistencia en los resultados, a diferencia de los obtenidos en la precosecha, donde muy pocos estudios han mostrado unas eficacias consistentes (Calvo-Garrido et al., 2019)

Cabe destacar por tanto la supervivencia de BUZ-14 en los cultivos de melocotonero en las distintas condiciones ambientales tanto en primavera como en el periodo estival y que su combinación con goma tara facilita su adhesión a los frutos.

### 5.3.2. Incidencia de podredumbres en recolección

Tras la recolección de los frutos se determinó la incidencia de la podredumbre en los melocotones sometidos a los distintos tratamientos con los agentes antifúngicos naturales de biocontrol frente a los melocotones control (tabla 8). Cabe recordar que los árboles empleados en este estudio varían en su fecha de recolección ya que proceden de parentales con fechas de cosecha muy distintas. Así, los primeros fueron recolectados el 30 de agosto y se realizaron dos cosechas posteriores, la segunda cosecha se realizó el 9 de septiembre y la tercera (última) el 18 de septiembre de 2019.

**Tabla 8.** Incidencia (%) de la podredumbre marrón en melocotones *Andros x Calante* en los distintos tratamientos en el momento de la cosecha (incidencia en campo)

Tratamiento <sup>a</sup>	Incidencia 1 <sup>a</sup> recolección (30/08/2019)	Incidencia 2 <sup>a</sup> recolección (09/09/2019)	Incidencia 3 <sup>a</sup> recolección (18/09/2019)	Incidencia global en campo
<b>Control</b>	25,2	-	21,4	23,5 ± 2,7
<b><i>B. velezensis</i></b>	6,9	13,7	-	8,1 ± 5,7
<b>Goma tara</b>	8,5	-	11,1	8,9 ± 1,8
<b><i>B. velezensis</i>+ goma tara</b>	8,6	-	7,4	6,9 ± 0,8

Como se puede observar, la disminución de la incidencia fue notable en todos los lotes tratados siendo la menor para los frutos tratados con la combinación del agente de biocontrol y la goma tara con tan sólo un 6,9 % de incidencia frente al 23,5 del control sin tratamiento (tabla 8). Cabe también destacar el efecto protector tanto del *Bacillus* como de la goma tara aplicados individualmente con incidencias de 8,1 y 8,9 %, respectivamente. Resaltar también que no se ha detectado ninguna otra patología fúngica en los cultivos.

La aplicación del agente de biocontrol BUZ-14 durante el cultivo de melocotoneros reduce en un 60-70 % la manifestación de la podredumbre marrón en campo. Para un adecuado control de la enfermedad se recomiendan 4 aplicaciones a lo largo del ciclo del cultivo coincidiendo la primera con el momento de plena floración. También puede apreciarse un efecto protector de la goma tara tanto en solitario como aplicada juntamente con el ABC.

#### **5.4. Determinación de la tolerancia del ABC a fungicidas comerciales**

Estudiar la compatibilidad del ABC con los pesticidas de síntesis habitualmente utilizados en el cultivo es indispensable para saber si el antagonista puede ser mezclado con químicos para aumentar su espectro de acción. El control biológico todavía no ha sido suficientemente estudiado como para poder aplicar agentes microbianos por sí solos. Lo ideal es comenzar a disminuir las dosis y la cantidad de pesticidas mezclándolos con sustancias que no comprometan la salud humana ni la contaminación ambiental. En el estudio realizado, se comprueba si es viable la combinación con la mayoría de los pesticidas (fungicidas e insecticidas) que se emplean en el cultivo de los frutales de hueso. Así, se buscó ejercer un efecto simbiótico entre ambos productos tratando de evitar la enfermedad causada por estos dos fitopatógenos.

Los pesticidas utilizados se clasificaron según el organismo contra el que actúan (fungicidas o insecticidas). El nombre comercial, principio/s activo/s, la dosis recomendada por el fabricante y la dosis máxima que puede tolerar BUZ-14 se muestran en la (tabla 9).

**Tabla 9.** Pesticidas, dosis de referencia de uso y concentración máxima que permite el crecimiento de *Bacillus velezensis* BUZ-14.

Nombre comercial	Principio activo	Tipo de pesticida	Dosis recomendada	Dosis máxima
<b>Luqsol 98</b>	ACEITE MINERAL	Insecticida	0,75 mL/100 mL	Referencia x 10
<b>Atominal</b>	PIRIPROXIFEN	Insecticida	0,005 mL/100 mL	Referencia x 2,5
<b>Teppeki</b>	FLONICAMID	Insecticida	0,013 g/100 mL	Referencia x 10
<b>Armicarb</b>	CARBONATO DE HIDRÓGENO DE POTASIO	Fungicida	0,7 g/100 mL	Referencia/10
<b>Droxicuper-50</b>	HIDRÓXIDO CÚPRICO	Fungicida	0,2-0,4 g/ 100 mL	Referencia/10
<b>Luna Experience</b>	FLUOPIRAM + TEBUCONAZOL	Fungicida	0,026 mL/100 mL	Referencia/4
<b>Tiram Flow</b>	TIRAM	Fungicida	0,3 mL/100 mL	Referencia/10

Como se puede observar en la tabla 9, todos los fungicidas precisaron de la dilución de la dosis recomendada para permitir el crecimiento de BUZ-14, 4 veces en el caso de Luna Experience y 10 veces en el caso de Tiram Flow, Droxicuper y Amicarb.

El grupo de los fungicidas poseen mecanismos de acción que afectan a estructuras celulares comunes entre los microorganismos. Así, Droxicuper 50 está diseñado también para tener acción bactericida, y se define como “fungicida-bactericida polivalente” según el fabricante. Por otro lado, el producto Amicarb posee un método de acción triple colapsando esporas y deshidratando hifas, además de bloquear procesos enzimáticos (destrucción de hidrolasas). Por tanto, cuando el tratamiento de biocontrol se desea combinar con tratamientos fungicidas se deberá o bien, disminuir la dosis del producto químico, o bien, espaciar las aplicaciones en el tiempo. No sucede lo mismo con los insecticidas en los que esta dosis incluso se puede ver incrementada sin afectar al crecimiento de nuestra cepa.

Sin embargo, el ABC BUZ-14 presenta una elevada compatibilidad con los insecticidas habitualmente empleados en el cultivo de los frutales de hueso. Ninguno de ellos precisó de dilución para permitir el crecimiento de esta cepa e incluso en el caso de Teppeki y Luqsol esta puede verse aumentada 10 veces, lo que garantiza una aplicación segura. Esto permite combinar la aplicación de los bioformulados antifúngicos con productos insecticidas para mantener el estado óptimo de la parcela. Respecto a su combinación con materias activas fungicidas, se recomienda reducir la dosis de fungicida o espaciar ambas aplicaciones ya que a las dosis recomendadas afectan a la supervivencia del agente de biocontrol.

## **5.5. Aplicaciones post-cosecha basadas en formulados naturales y biológicos**

Los resultados que se recogen en este epígrafe se centran en el desarrollo de aplicaciones post-cosecha del agente de biocontrol optimizando las condiciones de aplicación mediante vía húmeda o drencher. Estas actividades se han realizado tanto en los melocotones como en las nectarinas y se presentan divididos para cada una de las frutas.

### **5.5.1. En nectarina Venus x Big Top**

Esta actividad se realizó en nectarina *Venus x Big Top* con el objetivo de **optimizar la dosis de aplicación post-cosecha** del ABC previamente a la realización del estudio en melocotones.

Para ello, se aplicó mediante baño un formulado a base de *B. velezensis* BUZ-14 en dos concentraciones: 1:5 (TTO 1:5) y 1:10 (TTO 1:10) durante 5 minutos. Tras la aplicación de dicho formulado, las nectarinas se conservaron en refrigeración durante 7 y 14 días a 1 °C seguido de un periodo de simulación de la comercialización de 3 y 4 días a 20 °C, tras el cual se determinó el porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad (tabla 10). Estas condiciones simulan el proceso de conservación y comercialización que los frutos seguirían en una central hortofrutícola. La incidencia se expresa como porcentaje de frutos afectados de podredumbre respecto del total de frutos recolectados mientras que la severidad se estableció en función de la superficie del fruto afectada de podredumbre mediante la escala: grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %).

**Tabla 10.** Incidencia y severidad de la podredumbre marrón (%) en nectarinas *Venus x Big Top* tratadas con un formulado de *B. velezensis* BUZ-14 tras 7 y 14 días de almacenamiento en refrigeración (1°C) y posteriores periodos de simulación de la comercialización (20 °C).

D	Tratamiento <sup>a</sup>					
	Control		1:10		1:5	
	Incidencia <sup>b</sup>	Severidad <sup>c</sup>	Incidencia	Severidad	Incidencia	Severidad
7 (1 °C) + 3 (20 °C)	68,8	2,5	63,8	2,4	43,8	1,5
7 (1 °C) + 4 (20 °C)	93,8	3,6	91,2	3,1	62,5	2,1
14 (1 °C) + 3 (20 °C)	87,5	3,1	75,0	3	75,0	2,2
14 (1 °C) + 4 (20 °C)	100	4	100	4	93,8	3,3

<sup>a</sup>Control: lote sin tratamiento; 1:10. %: frutos tratados con el bioformulado diluido en agua en proporción 1:10; 1:5: frutos tratados con el bioformulado diluido en agua en proporción 1:5.

<sup>b</sup>Porcentaje de frutos afectados de podredumbre respecto al total de frutos recolectados

<sup>c</sup>Superficie del fruto con síntomas de podredumbre marrón: grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %).

Como se puede observar, la incidencia de la enfermedad en los frutos control (no tratados con el bioformulado en post-cosecha) alcanzó un 70 % tras 7 días de refrigeración y 3 días a 20 °C, cifra que prácticamente alcanza el 100 % tras 4 días a temperatura ambiente. Estas cifras reflejan el elevado grado de infección natural de la parcela de nectarina con lo cual es una candidata ideal para la continuidad del estudio en precosecha. Los frutos tratados con el formulado diluido 1:10 muestran prácticamente la misma incidencia y severidad que los frutos no tratados. En el caso del tratamiento 1:5 sí que se observó una disminución de la incidencia y la severidad especialmente durante el primer periodo de conservación con un 44 y 62 % de los frutos afectados de podredumbre tras 7 días a 1 °C y 3 y 4 días a 20 °C, respectivamente. En el segundo periodo de conservación este efecto protector se diluyó y las cifras fueron muy similares a las del lote control y el tratado con el formulado diluido 1:10.

Tras estos primeros resultados se estableció la concentración efectiva del agente de biocontrol siendo ésta 1:5 de la concentración inicial del bioformulado.

## **5.5.2. En melocotón Andros x Calante**

### **5.5.2.1. Incidencia de podredumbres durante la frigocervación**

En el caso del melocotón, la incidencia de la podredumbre marrón también se calculó tras la conservación de los frutos en refrigeración durante 10 días a 1 °C y

posterior simulación del período de comercialización (4 días a 20 °C).

Los resultados se reflejan en la tabla 11 y en la figura 8 donde se muestra el aspecto de un lote tras el periodo de simulación de la comercialización con varios frutos afectados de podredumbre. Como se puede observar, la incidencia en post-cosecha aumenta considerablemente estando el 80 % de los frutos control (sin tratamiento en campo) afectados de podredumbre marrón. Esta incidencia se ve enormemente disminuida en los frutos procedentes de árboles tratados con BUZ-14, 18,9 % en el lote tratado sólo con BUZ y 20,9 % cuando el agente fue combinado con goma tara. También es destacable el efecto protector de la goma tara ya que solo el 27 % de los frutos mostraron síntomas de podredumbre.

**Tabla 11.** Incidencia de la podredumbre marrón en melocotones Andros x Calante tras la conservación en refrigeración y posterior simulación del período de comercialización (10 días a 1 °C + 3 días a 20 °C).

Tratamiento <sup>a</sup>	Incidencia en post-cosecha (%)	Severidad <sup>a</sup>
<b>Control</b>	79,7	3,1
<b><i>B. velezensis</i></b>	18,9	1,2
<b>Goma tara</b>	27,2	1,6
<b><i>B. velezensis</i> + goma tara</b>	20,9	1,4

<sup>a</sup>Superficie del fruto con síntomas de podredumbre marrón: grado 1 (1-25 % superficie afectada); grado 2 (26-50 %), grado 3 (51-75 %) y grado 4 (76-100 %).



**Figura 15.** Desarrollo de *Monilinia* spp. en melocotones *Andros x Calante* tras la conservación en refrigeración y posterior simulación del periodo de comercialización. Visión general del lote control (izquierda) y detalle de podredumbre marrón (derecha).



### 5.5.2.2. Incidencia de podredumbres tras el tratamiento post-cosecha con el agente de biocontrol y frigo conservación

Con los melocotones previamente tratados en precosecha con el ABC y una vez recolectados también se procedió a reforzar el tratamiento mediante la **aplicación mediante baño de un formulado a base de *B. velezensis* BUZ-14 en una concentración 1:5 durante 5 minutos**. Tras la aplicación de dicho formulado, los melocotones se almacenaron en refrigeración durante 10 días a 1 °C y posterior simulación del período de comercialización de 3 días a 20 °C. Tras 3 días a temperatura ambiente **ninguno de los melocotones tratados con BUZ-14 presentó signos de podredumbre**.

Es destacable, por tanto, el efecto sumativo que ejerce el tratamiento post-cosecha a la protección adquirida durante los tratamientos precosecha que también fue muy elevada (tan sólo 18,9 % de frutos afectados de podredumbre frente al 80 % en los no tratados).

### 5.5.2.3. Crecimiento del ABC en los frutos recolectados

Paralelamente a este ensayo se realizaron **recuentos de BUZ-14** en la superficie de los frutos para determinar si el microorganismo **era capaz de desarrollarse**. Para ello se dispusieron dos lotes distintos: un lote de frutos en el que tras el tratamiento con BUZ-14 se les realizó dos pequeñas heridas y otro lote sin dañar.

El objetivo de este ensayo era doble, por un lado, comprobar si BUZ es capaz de proteger frente al ataque de patógenos cuando el fruto es dañado (situación que puede suceder durante la manipulación post-cosecha) y por otro determinar si el microorganismo se multiplica en la superficie del fruto o precisa de una herida donde pueda acceder a los nutrientes. Estos recuentos se realizaron tras el tratamiento, a los 2, 4, 7 y 10 días en refrigeración y tras 2 y 4 días a 20 °C. En la tabla 12 se recogen los resultados de los recuentos expresados en unidades logarítmicas por cm<sup>2</sup> para los frutos intactos y en unidades por herida en los frutos dañados.

Los recuentos de BUZ-14 durante los 10 días de conservación a 1 °C en los frutos sin herida disminuyen ligeramente, desde 7,5 a 6,9 ufc/cm<sup>2</sup> y aumentan en 0,5 unidades durante el periodo a 20 °C. En los frutos con herida el microorganismo no disminuye sus recuentos durante la conservación en frío y éstos también se mantienen durante la simulación de la comercialización.

**Tabla 12.** Recuentos de *Bacillus velezensis* BUZ-14 (log unidades formadoras de colonia (ufc)/cm<sup>2</sup> o herida) en melocotones tratados con el agente de biocontrol y conservados a 1 °C durante 10 días seguidos de un periodo de simulación de la comercialización de 4 días a 20 °C

Tiempo (d)	T <sup>a</sup> (°C)	Frutos intactos (log ufc/cm <sup>2</sup> )	Frutos con herida (log ufc/g)
<b>0 (tras tratamiento)</b>	-	7,5 ± 0,0	7,8 ± 0,1
<b>2</b>	1	7,3 ± 0,1	7,7 ± 0,0
<b>4</b>	1	7,3 ± 0,1	7,9 ± 0,0
<b>7</b>	1	7,1 ± 0,0	8,2 ± 0,1
<b>10</b>	1	6,9 ± 0,0	8,1 ± 0,1
<b>10 + 2</b>	1 + 20	7,4 ± 0,0	8,2 ± 0,1
<b>10 + 4</b>	1 + 20	7,3 ± 0,0	8,0 ± 0,1

#### 5.5.2.4. Calidad fisicoquímica

En el momento de la recolección se llevaron a cabo distintas **determinaciones de calidad** (peso, calibre, firmeza, sólidos solubles totales y acidez) para evaluar el efecto de los distintos tratamientos.

En cuanto a los parámetros de calibre y peso (tabla 13) se puede observar que los frutos del lote control presentan un menor tamaño y peso. Sin embargo, el estudio estadístico no revela diferencias significativas entre estos y el resto de los lotes.

**Tabla 13.** Calibre y peso de los frutos para el análisis de la calidad de los melocotones *Andros x Calante* en el momento de la recolección.

Tratamiento	Calibre (cm)		Peso (g)
	Longitudinal	Transversal	
<b>Control</b>	65,9 ± 4,1a	71,3 ± 5,3a	180,5 ± 13,3a
<b><i>B. velezensis</i></b>	67,3 ± 5,6a	74,4 ± 3,9a	216,3 ± 25,8a
<b>Goma tara</b>	70,1 ± 3,7a	75,6 ± 5,5a	207,9 ± 30,6a
<b><i>B. velezensis</i> + goma tara</b>	69,5 ± 4,9a	70,9 ± 7,4a	213,4 ± 18,7a

\*Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de 25 determinaciones. Los valores seguidos de iguales letras minúsculas no presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Los dos métodos empleados para la determinación de la firmeza (penetrometría

e impacto acústico) (tabla 14) revelan una menor dureza en los melocotones del lote control, aunque sin diferencias significativas con ninguno de los tratamientos no encontrándose tampoco diferencias entre ellos. En cuanto a los valores de azúcares y acidez el lote control obtuvo los valores más y menos elevados (9,2 °Brix y 4,9 g ac. málico/kg), respectivamente, lo que nos informa de que su grado de madurez era ligeramente, aunque no significativamente, mayor.

**Tabla 14.** Firmeza mediante método destructivo y AWETA (no destructivo), sólidos solubles totales (°Brix) y acidez titulable de los melocotones Andros x Calante en el momento de la recolección.

Tratamiento <sup>a</sup>	Firmeza (Kg)	Firmeza (AWETA)	°Brix	Acidez (g ac.málico/Kg)
<b>Control</b>	2,2 ± 0,3a	12,8 ± 3,4a	9,2 ± 0,2a	4,9 ± 0,3a
<b><i>B. velezensis</i></b>	3,1 ± 0,7a	14,9 ± 3,2a	8,9 ± 0,2a	5,1 ± 1,6a
<b>Goma Tara</b>	2,9 ± 0,5a	14,5 ± 1,4a	8,7 ± 0,5a	5,6 ± 0,8a
<b><i>B. velezensis</i> + goma Tara</b>	2,7 ± 0,2a	14,1 ± 1,7a	9,0 ± 0,3a	6,2 ± 2,4a

\*Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de 25 determinaciones. Los valores seguidos de iguales letras minúsculas no presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Respecto a los parámetros de color se observan valores similares de luminosidad (en torno a 65), de índice de rojo (entre 11 y 15) siendo el más elevado el índice de amarillo con valores alrededor de 50 (tabla 15).

**Tabla 15.** Parámetros de color en los melocotones Andros x Calante en el momento de la recolección

Tratamiento	Parámetros de color*		
	L*	a*	b*
<b>Control</b>	67,2 ± 2,3a	15,1 ± 4,9a	51,7 ± 4,0a
<b><i>B. velezensis</i></b>	66,9 ± 2,4a	11,5 ± 4,8a	50,8 ± 3,4a
<b>Goma tara</b>	67,9 ± 2,4a	15,3 ± 3,6a	51,1 ± 3,6a
<b><i>B. velezensis</i> + goma tara</b>	66,8 ± 3,0a	14,6 ± 3,8a	49,9 ± 4,9a

\*Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de 25 determinaciones. Los valores seguidos de iguales letras minúsculas no presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Tras el análisis de la calidad de los melocotones de los distintos lotes, no se observaron diferencias notables entre los frutos control y los frutos que habían recibido tratamientos precosecha con los distintos formulados naturales, por lo que se puede señalar que estos formulados no interfieren en el desarrollo habitual de los frutos. Además, cabe destacar que no se han detectado síntomas de fitotoxicidad en ningún melocotón de los lotes analizados.

## 6. CONCLUSIONES

1. En las parcelas de nectarina y melocotón estudiadas coexisten las dos especies de *Monilinia* que afectan mayoritariamente a los frutales de hueso de nuestra CCAA: *M. fructicola* y *M. laxa*, prevaleciendo la primera sobre la segunda.
2. El procedimiento de detección precoz con congelación acompañada de identificación por PCR presenta una mayor capacidad de detectar muestras positivas de *Monilinia* spp. que la microbiología clásica ya que esta última solo es capaz de detectar esta positividad a partir de estado fenológico (fruto en crecimiento) pero no en los estadios anteriores de plena floración y cuajado.
3. Se ha constatado la supervivencia del agente de biocontrol *B. velezensis* BUZ-14 en los cultivos de melocotonero en las distintas condiciones ambientales tanto en primavera como en el periodo estival y que la combinación del agente con goma tara facilita su adhesión a los frutos.
4. El ABC BUZ-14 presenta una elevada compatibilidad *in vitro* con los insecticidas habitualmente empleados en el cultivo de los frutales de hueso. Ello nos permite combinar la aplicación de los bioformulados antifúngicos con productos insecticidas para mantener el estado óptimo de la parcela. Respecto a su combinación con materias activas fungicidas se recomienda reducir la dosis de fungicida o espaciar ambas aplicaciones ya que a las dosis recomendadas afectan a la supervivencia del agente de biocontrol.
5. La aplicación del agente de biocontrol BUZ-14 durante el cultivo de melocotoneros reduce en un 70 % la manifestación de la podredumbre marrón en recolección. Para un adecuado control de la enfermedad se recomiendan 4 aplicaciones a lo largo del ciclo del cultivo coincidiendo la primera con el momento de plena floración. También puede apreciarse un efecto protector de la goma tara tanto en solitario como aplicada juntamente con el ABC.
6. Para la aplicación de tratamientos con BUZ-14 en post-cosecha tanto en melocotones como en nectarinas se recomienda emplear una dilución 1/5 del formulado inicial.

7. Cuando los melocotones son tratados en pre y post-cosecha con el ABC BUZ-14 se detecta un efecto sumativo ya que no se detectan frutos afectados de podredumbre tras 10 días a 1 °C y 4 días a 20 °C (periodos de refrigeración y simulación de la comercialización).
8. Los recuentos del ABC BUZ-14 durante la conservación en frío y posterior simulación de la comercialización se mantienen en torno a 8 unidades logarítmicas e incluso aumentan ligeramente a 20 °C, lo que informa de la capacidad de supervivencia del microorganismo en los frutos, incluso en condiciones de refrigeración.
9. El análisis de calidad de los melocotones tras la cosecha no muestra diferencias notables entre los frutos control y los frutos que habían recibido tratamientos precosecha con los distintos formulados por lo que se puede señalar que estos formulados no interfieren en el desarrollo habitual de los frutos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ali, S. S., y Vidhale, N. N. 2013. Bacterial siderophore and their application: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 303-312. <http://www.ijcmas.coma>

Arora, N. K., y Verma, M. 2017. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>

Azizoglu, U. 2019. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76, 1379-1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>

Badii, M.H. & Abreu, J.L. (2006) Control biológico una forma sustentable de control de pla-gas (Biological control a sustainable way of pest control). *International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.

Baysal, T., Demirdöven, A., 2007. Lipoxigenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.025>

Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Aveline, N., Davidou, L., Dupin, S., Fermaud, M., 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00105>

Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology* 63: 101-110.

Capalbo, D.M. (2006). Comercialização de agentes microbiológicos para controle de pra-gas: experiencias de países da América Latina. En E.C. Oliveira Filho & R.G. Monnerat (Eds.). *Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.* (p.279-292). Planaltina: Embrapa Cerrados.

Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 4193-4198

Carvalho, C.F. & Souza, B. (2000). Métodos de criação e produção de crisopídeos. En V.H.P. Bueno (Ed). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. (pp. 91–109). Lavras, Brasil: UFLA.

Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., Ongena, M., 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 27: 87–100.

Chen, X.H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mügel, G., Kunz, S., Borriss, R., 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.015>

De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., Gell, I., Melgarejo, P. La revista profesional de sanidad vegetal, ISSN 1131-8988, Nº 189, 2007, págs. 63-66

Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498-1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>

EFSA. 2013. Scientific support, literature review and data collection and analysis for risk assessment on microbial organisms used as active substance in plant protection products –Lot 1 Environmental Risk characterisation.

Egüen, B., Melgarejo, P. & De Cal, A. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. *Eur J Plant Pathol* 141, 789–801 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0579-2>

Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C., Dorey, S., 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol. Plant Pathol.* 16, 177–187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <https://www.fao.org/faostat/en/#data>

García-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A., Fontaniella, B., 2016. Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. *PLoS One* 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160675>



- Gibert C, Chadœuf J, Vercambre G, Génard M, Lescourret F, 2007. Cuticular cracking on nectarine fruit surface: spatial distribution and development in relation to irrigation and thinning. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132, 583–91.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., Mari, M., 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology* 64: 219–225.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42, 462–468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Huffaker, C.B. & Messenger, P.S. (1976). *Theory and practice of biological control*. New York: Academic Press.
- Ippolito, A., Nigro, F., 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Prot.* 19, 715–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00095-8)
- Ji, X., Li, J., Meng, Z., Zhang, S., Dong, B., Qiao, K., 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. *Plant Disease* 103, 1991-1997.
- Kawagoe, Y., Shiraishi, S., Kondo, H., Yamamoto, S., Aoki, Y., Suzuki, S., 2015. Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.143>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator –Siderophore: A review. *En Microbiological Research* (Vols. 212-213, pp. 103-111). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J., 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Larena, I., R. Torres, A. De Cal, M. Linan, P. Melgarejo, P. Domenichini, A. Bellini, J. F. Mandrin, J. Lichou, X. O. de Eribe, and J. Usall. 2005. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control* 32: 305-310.

Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., Kulabuhova, D., & Maksimov, I. (2019). *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants*, 8(4), 1-24. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>

Leandro Oliveira Lino, Igor Pacheco, Vincent Mercier, Franco Faoro, Daniele Bassi, Isabelle Bornard, and Bénédicte Quilot-Turion *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016 64 (20), 4029-4047 DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00104

Luo, Y., and Michailides, T. J. 2001. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 91:864-872. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.9.864> Link, ISI, Google Scholar

Martínez-García PJ, Parfitt DE, Bostock RM, Fresnedo-Ramírez J, Vazquez-Lobo A, Ogundiwin EA, et al. (2013) Application of Genomic and Quantitative Genetic Tools to Identify Candidate Resistance Genes for Brown Rot Resistance in Peach. *PLoS ONE* 8: e78634.

Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., Dubery, I.A., 2018. The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Front. Plant Sci.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>

Miessner, S., Stammler, G. *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences. *J Plant Dis Prot* **117**, 162–167 (2010). <https://doi.org/10.1007/BF03356354>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). <https://www.mapa.gob.es/es/>

Moretto, C., Cervantes, A.L., Batista Filho, A., Kupper, K.C., 2014. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 165, 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.019>

Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T. J., and Karaoglanidis, G. S. 2015. Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. *Plant Pathol.* 64:416-424. <https://doi.org/10.1111/ppa.12264> Crossref, ISI, Google Scholar

P. Melgarejo, R. Carrillo, E.M. Sagasta, Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*, *Transactions of the British Mycological Society*, 10.1016/S0007-1536(85)80194-7, **85**, 2, (313-317), (1985).

P.H. Fourie and G. Holz, 2002. Fitness on Grape Berries of *Botrytis cinerea* Isolates Belonging to Different Dicarboximide Sensitivity Classes.

Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Raza, W., Wei, Z., Ling, N., Huang, Q., Shen, Q., 2016. Effect of organic fertilizers prepared from organic waste materials on the production of antibacterial volatile organic compounds by two biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *J. Biotechnol.* 227, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.014>

Reig, G.; Mestre, L.; Betrán, J.A.; Pinochet, J.; Moreno, M.A. 2016. Agronomic and physicochemical fruit properties of 'Big Top' nectarine budded on peach and plum based rootstocks in Mediterranean conditions. *Scientia Horticulturae* 210: 85-92.

R.J.W. Byrde, H.J. Willetts, *The Brown Rot Fungi of Fruit*, Pergamon, 1977, ISBN 9780080197401, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-019740-1.50003-4>.

R.M. Bostock, S.M. Wilcox, G. Wang, J.E. Adaskaveg, Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 54, Issues 1–2, 1999, Pages 37-50, ISSN 0885-5765, <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0189>.

Rungjindamai, N., Jeffries, P. & Xu, XM. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *Eur J Plant Pathol* 140, 1–17 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0452-3>

Sayed, R. Z., y Chincholkar, S. B. 2006. Purification of siderophores of *Alcaligenes faecalis* on Amberlite XAD. *Bioresource Technology*, 97(8), 1026-1029. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.045>

Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2014. Discovery, development and technology transfer of biocontrol agents for postharvest disease control. II International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management 1053, 23-36.

Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Vol-2, nº 2. Páginas 70-78

Van Loon, J.C., Bakker, P.A., Pieterse, C.M., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>

Villarino, M., Egüen, B., Lamarca, N., Segarra, J., Usall, J., Melgarejo, P., De Cal, A., 2013. Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 137, 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0292-6>

Villarino, M., Melgarejo, P., De Cal, A., 2016. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *Int.*

WK Wynn (1981) Tropic and toxic responses of pathogens to plants *Annual Review of Phytopathology* **19** 237–255 [10.1146/annurev.py.19.090181.001321](https://doi.org/10.1146/annurev.py.19.090181.001321)

Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 103.