



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**EFFECTO DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES  
FÚNGICAS DE *JUGLANS REGIA* L. EN SAN NICOLÁS DE LOS RANCHOS, PUEBLA.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**Ricardo Morales Sosa**

Directora de tesis:

Dra. Lucia López Reyes



Diciembre 2024



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**



**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**EFFECTO DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES  
FÚNGICAS DE *JUGLANS REGIA* L. EN SAN NICOLÁS DE LOS RANCHOS, PUEBLA.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

Ricardo Morales Sosa

Comité tutorial:

|                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| Directora                  | Dra. Lucia López Reyes           |
| Co-Directora               | Dra. Guadalupe Medina de la Rosa |
| Tutora                     | Dra. Laura Morales Lara          |
| Integrante Comité Tutorial | M. C. Moisés G. Carcaño Montiel  |
| Integrante Comité Tutorial | Dr. Manuel Huerta Lara           |

Diciembre 2024

**Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza**  
Director General de Bibliotecas  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Presente

A través de este medio me dirijo a Usted para informarle que la tesis con título **EFFECTO DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES FÚNGICAS DE JUGLANS REGIA L. EN SAN NICOLÁS DE LOS RANCHOS, PUEBLA**; ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto, se autoriza la impresión de tesis del estudiante:

Nombre del alumno: Ricardo Morales Sosa  
Matricula: **222470324**  
Programa educativo: **Maestría**  
Posgrado en: **Ciencias Ambientales**

**ATENTAMENTE**

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z; a 30 de octubre de 2024



**Dra. Carolina Morán Raya**  
Directora  
Instituto de Ciencias



**Dra. Lucía López Reyes**  
Directora de Tesis

El presente trabajo de investigación ha sido revisado por integrantes del cuerpo académico BUAP-CA-99 del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Comité tutorial aprobado por el Posgrado en Ciencias Ambientales, por lo que se agradece su participación y contribución.

---

|                                  |                                                 |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Dra. Lucia López Reyes           | Microbiología de suelos<br>CICM-ICUAP           |
| Dra. Guadalupe Medina de la Rosa | Estancia Postdoctoral<br>CICM-ICUAP-CONAHCYT    |
| Mtro. Moisés Carcaño Montiel     | Microbiología de suelos<br>CICM-ICUAP           |
| Dra. Laura Morales Lara          | Facultad Ciencias Químicas<br>BUAP              |
| Dr. Manuel Huerta Lara           | Departamento de Desarrollo Sustentable<br>ICUAP |

---

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico del convenio 828485. Al programa de BiofertiBUAP por el financiamiento de la tesis y a VIEP por el apoyo económico con número de proyecto 100155588-VIEP2024.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la vida, al amor y a la dificultad.

Agradezco a mi mamá y papá por estar siempre a mi lado, por ayudarme a salir adelante en los peores días y ser mis grandes maestros de vida.

Agradezco a mis hermanos por ser gran motivo de superación. Así, como a Tatis, Benito, Nina, Fernando, Josué, Serena, Heidi, Mili, a mis padrinos y toda la familia.

Agradezco a la Dra. Lucía y la Dra. Guadalupe por la oportunidad que me brindaron desde el inicio, por la enseñanza y por su pasión por la investigación. Asimismo, al Maestro Moisés por su constante apoyo para mi crecimiento académico.

Agradezco a Lupita, Abraham, Magda, Anayeli, Luis y todos los que conforman al Laboratorio de Microbiología de Suelos, en especial a Leti por toda tu enseñanza, por mostrarme otra visión de la vida y sobre todo por tu amistad.

Agradezco a Miriam, Carol, Ceci y Alfredo por su incondicional amistad, por escucharme y siempre creer en mí; a mi amiga Soco por todo tu apoyo y por compartir la salsa y bachata conmigo, una de mis mayores pasiones.

Agradezco a los productores de San Nicolás de los Ranchos que hicieron posible la realización de esta investigación.

Agradezco al apoyo CONAHCYT, al recurso de VIEP-BUAP, a BiofertiBUAP, al Instituto de Ciencias y al Posgrado en Ciencias Ambientales.

# CONTENIDO

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                       | 1  |
| 2. MARCO TEÓRICO .....                                                                                                      | 3  |
| 2.1 Control biológico. ....                                                                                                 | 3  |
| 2.2 <i>Juglans regia</i> L. ....                                                                                            | 4  |
| 2.3 Mosca de la fruta. ....                                                                                                 | 5  |
| 2.4 Estrategias de control para la mosca de la fruta. ....                                                                  | 7  |
| 2.5 Hongos patógenos en <i>Juglans regia</i> L. ....                                                                        | 8  |
| 2.6 Afectaciones ambientales por el uso de plaguicidas. ....                                                                | 8  |
| 2.7 Bacterias quitinolíticas. ....                                                                                          | 10 |
| 3. TIPO Y ALCANCE DE INVESTIGACIÓN .....                                                                                    | 11 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                                                         | 12 |
| 5. JUSTIFICACIÓN .....                                                                                                      | 13 |
| 6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....                                                                                          | 14 |
| 7. HIPÓTESIS .....                                                                                                          | 14 |
| 8. OBJETIVO GENERAL .....                                                                                                   | 15 |
| 8.1. Objetivos específicos .....                                                                                            | 15 |
| 9. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                               | 16 |
| 9.1 Descripción de San Nicolás de los Ranchos .....                                                                         | 16 |
| 9.2 Fase de muestreo. ....                                                                                                  | 17 |
| 9.2.1 Suelo. ....                                                                                                           | 17 |
| 9.2.2 <i>Juglans regia</i> L. ....                                                                                          | 17 |
| 9.3 Fase de laboratorio. ....                                                                                               | 17 |
| 9.3.1 Compatibilidad entre cepas quitinolíticas bacterianas. ....                                                           | 17 |
| 9.3.2 Determinación de indoles de cepas bacterianas. ....                                                                   | 18 |
| 9.3.3 Aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos. ....                                                           | 19 |
| 9.3.4 Ensayos de antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos fitopatógenos<br>asociados a <i>J. regia</i> L. .... | 20 |
| 9.4 Fase de campo .....                                                                                                     | 20 |
| 9.4.1 Aplicación de control biológico en <i>J. regia</i> L. ....                                                            | 20 |
| 9.4.2 Mosca de la fruta. ....                                                                                               | 22 |
| 9.4.3 Identificación de la mosca de la fruta. ....                                                                          | 23 |
| 9.4.4 Evaluación del control biológico en <i>J. regia</i> L. ....                                                           | 23 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.5 Comparativa del valor comercial de la nuez de castilla. ....                                                            | 24 |
| 9.6 Análisis estadístico. ....                                                                                              | 24 |
| 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                             | 25 |
| 10.1 Fase de laboratorio.....                                                                                               | 25 |
| 10.1.1 Caracterización del suelo. ....                                                                                      | 25 |
| 10.1.2 Características de bacterias de control biológico.....                                                               | 26 |
| 10.1.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos. ....                                                                            | 28 |
| 10.1.4 Ensayos de antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos fitopatógenos<br>asociados a <i>J. regia</i> L..... | 33 |
| 10.2 Fase de campo.....                                                                                                     | 38 |
| 10.2.1 Porcentaje de daño en hojas compuestas ....                                                                          | 38 |
| 10.2.2 Características fenológicas de <i>J. regia</i> L.....                                                                | 41 |
| 10.2.3 Identificación de la mosca de la fruta. ....                                                                         | 48 |
| 10.2.4 Control biológico contra la mosca de la fruta. ....                                                                  | 49 |
| 10.2.5 Comparativa del valor comercial de la nuez de castilla.....                                                          | 53 |
| 11. CONCLUSIONES.....                                                                                                       | 56 |
| 12. PERSPECTIVAS .....                                                                                                      | 57 |
| 13. REFERENCIAS .....                                                                                                       | 58 |
| 14. ANEXOS .....                                                                                                            | 70 |
| 14.1 Glosario.....                                                                                                          | 70 |
| 14.2 Diagrama general de materiales y métodos.....                                                                          | 73 |
| 14.3 Curva de calibración de producción de indoles conforme del ácido indon-3-acético...                                    | 74 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Etapas fenológicas de <i>J. regia</i> L. y la mosca de la fruta.....                    | 6  |
| Cuadro 2. Tratamiento en <i>J. regia</i> L. de San Nicolás de los Ranchos, Puebla.....            | 21 |
| Cuadro 3. Análisis fisicoquímico del suelo de San Nicolás de los Ranchos. ....                    | 25 |
| Cuadro 4. Análisis microbiológico del suelo de la zona de estudio. ....                           | 26 |
| Cuadro 5. Bacterias seleccionadas en el control biológico de <i>J. regia</i> L.....               | 27 |
| Cuadro 6. Hongos aislados y asociados a <i>J. regia</i> L.....                                    | 29 |
| Cuadro 7. Antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos asociados a <i>J. regia</i> L.... | 34 |
| Cuadro 8. Porcentaje de daño foliar por enfermedades fúngicas en <i>J. regia</i> L. ....          | 40 |
| Cuadro 9. Características fenológicas de <i>J. regia</i> L. de los tratamientos foliares.....     | 43 |
| Cuadro 10. Población de la mosca de la fruta en <i>J. regia</i> L.....                            | 52 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo de la mosca de la fruta en <i>J. regia</i> L. (Elaboración propia).                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 7  |
| Figura 2. Ubicación satelital de San Nicolás de los Ranchos, Puebla (Elaboración propia).                                                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| Figura 3. Trampa tipo McPhail para la captura de la mosca de la fruta                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 22 |
| Figura 4. Escala de daño en folíolos de <i>J. regia</i> L.                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| Figura 5. Indoles totales de bacterias quitinolíticas para el control biológico.                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 27 |
| Figura 6. Productos de PCR de hongos asociados a <i>J. regia</i> L., los carriles representan:<br>1) Marcador de peso molecular (100 pb), 2) <i>F. oxysporum</i> , 3) <i>N. nonquaesitum</i> , 4) <i>A. alternata</i> , 5) <i>C. trifolii</i> , 6) <i>A. ustus</i> , 7) <i>Epicoccum nigrum</i> , 8) <i>A. niger</i> , 9) <i>A. alternata</i> y 10) Blanco negativo. | 28 |
| Figura 7. Porcentaje de inhibición de control biológico <i>in vitro</i> contra hongos aislados de <i>J. regia</i> L.                                                                                                                                                                                                                                                 | 36 |
| Figura 8. Prueba de antagonismo de A) <i>A. alternata</i> testigo y contra <i>Bacillus mycoides</i> (BUAP- P3N) y B) <i>E. nigrum</i> testigo y contra <i>Serratia proteamaculans</i> (BUAP-PIR).                                                                                                                                                                    | 37 |
| Figura 9. Aplicación de tratamiento en <i>J. regia</i> L. de San Nicolas de los Ranchos.                                                                                                                                                                                                                                                                             | 38 |
| Figura 10. Comparativa de tratamientos A: Testigo y B: Tratamiento <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>Pseudomonas fluorescens</i> .                                                                                                                                                                                                     | 39 |
| Figura 11. Comparativa de área foliar A) Fungicida, B) <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> y C) Testigo.                                                                                                                                                           | 42 |
| Figura 12. Comparativa de diámetro de nuez de A) Control y B) <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> .                                                                                                                                                                                                                                           | 44 |
| Figura 13. Porcentaje de aumento de área foliar de los tratamientos en <i>J. regia</i> L. con respecto al testigo.                                                                                                                                                                                                                                                   | 46 |
| Figura 14. Porcentaje de aumento del diámetro y masa seca del fruto con respecto al testigo.                                                                                                                                                                                                                                                                         | 47 |
| Figura 15. Moscas de la fruta asociadas a <i>J. regia</i> L. A) <i>Drosophila</i> sp., B) <i>Bactrocera zonata</i> y C) <i>D. longicornis</i> .                                                                                                                                                                                                                      | 49 |
| Figura 16. Efecto del tratamiento sobre el tamaño y precio en el mercado de la nuez.                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 55 |

## 1. INTRODUCCIÓN

*Juglans regia* L. o nuez de castilla, árbol que habita en climas templados, semi templados o húmedos es una planta exógena que subsiste a diferentes condiciones de temperatura, pH, precipitaciones, calidad y textura del suelo. Se encuentra dentro de lista de las plantas prioritarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por sus propiedades nutricionales y dietéticas (FAO, 2015). México es uno de los principales productores y exportadores a nivel mundial, con el estado de Puebla como líder en este ámbito (SADER, 2020). *Juglans regia* L. es importante en municipios como San Nicolás de los Ranchos, puesto que aporta beneficios alimenticios, medicinales y posee un alto impacto económico y cultural a través de su gastronomía y algunas tradiciones mexicanas. Sin embargo, *Juglans regia* L. es atacado por plagas y enfermedades fitosanitarias que perturban tanto la salud de la planta como la producción de nuez, lo que afecta la producción del fruto y la economía de los fruticultores. separa contrarrestar esta problemática se utilizan diversos métodos químicos como los plaguicidas, que disminuyen la densidad poblacional de las plagas y reducen los daños ocasionados por los hongos patógenos e insectos como la mosca de la fruta, una de las principales plagas en los nogales; no obstante, pese a que los plaguicidas reducen el impacto de la problemática, estos son altamente contaminantes y representan un peligro en la salud de los productores y del ambiente.

Las bacterias degradadoras de quitina, principal componente de la pared celular de hongos y exoesqueleto de la mosca de la fruta, son una alternativa para manejar la problemática en el nogal, fruto seco de mayor consumo a nivel mundial por sus propiedades nutritivas. Por lo que el objetivo fue evaluar el control biológico con bacterias quitinolíticas sobre la mosca de la fruta y hongos asociados a *Juglans regia* L. en San Nicolás de los Ranchos, Puebla. Para ello, se procedió al aislamiento e identificación de hongos presentes en el nogal, y se seleccionaron bacterias productoras de quitinasa de los géneros *Bacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, evaluando su capacidad antagonista *in vitro* contra los hongos identificados. Se implementaron

tratamientos foliares, incluyendo siete biológicos con cepas bacterianas, dos químicos (fungicida e insecticida) y un control sin aplicación. Posteriormente, se recolectaron moscas de la fruta para su identificación y cálculo de incidencia en cada tratamiento, adicionalmente, se evaluaron el área foliar y el tamaño del fruto.

Los resultados mostraron la presencia de los hongos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Neofusicoccum nonquaesitum*, todos ellos patógenos del nogal. Todas las cepas bacterianas lograron inhibir el crecimiento fúngico *in vitro*, lo cual indica su potencial para controlar los daños en el nogal. Se identificaron también las especies de mosca *Bactrocera zonata*, *Drosophila* sp., *Drosophila longicornis* (en estado adulto), y *Rhagoletis completa* (en estado larval), siendo esta última la de mayor impacto económico en el cultivo de nogal.

Los tratamientos foliares con una combinación de los cuatro géneros bacterianos redujeron la incidencia de la mosca de la fruta, mientras que la combinación de *Bacillus* + *Peribacillus* + *Pseudomonas* aumentó el área foliar y el tamaño del fruto. En conclusión, el control biológico con bacterias quitinolíticas se presenta como una alternativa viable para reducir las enfermedades fúngicas y la incidencia de la mosca de la fruta, además de contribuir al desarrollo del nogal.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Control biológico.

Las enfermedades por patógenos y las afectaciones por plagas en las plantas es un limitante para la producción agrícola, capaz de dañar hasta en un 25% de los cultivos a nivel mundial (Lugtenberg, 2014). El control biológico ofrece una alternativa natural para combatir plagas y enfermedades en cultivos, aprovechando depredadores y competidores naturales, al mismo tiempo que reduce la probabilidad de brotes, además que se evita la resistencia de las plagas y patógenos ante este tipo de prácticas (Wyckhuys *et al.*, 2013). Asimismo, el biocontrol previene infecciones para las plantas, además de tener mecanismos específicos para los patógenos, lo que evita afectaciones ante otro tipo de especies (O'Brien, 2017).

Se ha demostrado que el uso de estos métodos es similar o con mejores rendimientos comparándolos con pesticidas, logrando reducir las enfermedades en los cultivos (Alexander & Stewart, 2001; Hao *et al.*, 2011). Además, un efecto que produce la aplicación del control biológico, es el crecimiento acelerado hacia las plantas, esto se debe a que los microorganismos segregan hormonas que estimulan a la planta que provoca aumento en el rendimiento (Santoyo *et al.*, 2012) induce la respuesta sistémica inducida por la planta (Cai *et al.*, 2013) y ayuda al estrés hídrico (Brader *et al.*, 2014).

Las bacterias benéficas cuentan con diferentes mecanismos de acción como: antibiosis, producción de sideróforos, generación de metabolitos inhibitorios, competencia por sitios de colonización y nutrientes, inducción a mecanismos de resistencia inducida en la planta y producción de enzimas líticas como quitinasa o glucanasa (Whipps 2001), estos mecanismos sugieren una alternativa para el sector frutícola a disminuir los daños producidos por plagas y patógenos, y verse reflejado en su economía, además de beneficiar el desarrollo de las plantas como el caso del nogal.

## 2.2 *Juglans regia* L.

*Juglans regia* L. es un árbol perteneciente a la familia Juglandaceae y cuenta con una gran importancia alimenticia, medicinal y comercial (Çiçek, 2022). Es una especie originaria de Turquía, los Balcanes e Himalaya Oriental, extendiéndose al Sureste de Europa, Asia Menor, India y China. El nogal común o nuez de castilla, como es conocido en México, es un árbol caducifolio, con una altura de entre 12 a 25 metros y puede superar los 2 metros de diámetro, con un tronco liso grisáceo o marrón que cuenta, además, con valor económico maderero (Iannamico, 2009). Habita en regiones templadas, semi templadas o húmedas, mientras que en temperaturas bajas (-5 a -10 °C) y en climas elevados (38°C) la planta muere (Lemus, 2010). Requiere de precipitaciones anuales de entre 700 y 800 mm para un crecimiento adecuado, con una textura de suelo ideal corresponde a los francos (>25% arcilla, 30-50% limo y 30-50% arena) y tolera un pH del suelo entre 6.1 hasta 7.8 (Wani *et al.*, 2016).

Es una planta rica en nutrientes, proteínas, grasas, vitaminas y minerales, y alto contenido de ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6) y polifenoles antioxidantes que ayudan a reducir el colesterol y ciertos problemas cardiovasculares, (Gandev, 2007). El aceite de la nuez de castilla y los extractos de las hojas se utilizan para contrarrestar algunas enfermedades como la sinusitis, resfriados o dolor de estómago; asimismo, se ha demostrado que sus extractos pueden tener efectos neuro protectores y que ayudan a la memoria y salud cerebral, lo que puede ser beneficioso en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Liu *et al.*, 2019). También, se ha demostrado que la flor de la planta muestra propiedades antiinflamatorias, anti hipóxicas y antidepresivas, por su contenido de flavonoides y fenoles, especialmente de quercetina (Nabavi *et al.*, 2011).

*J. regia* L. también cuenta con propiedades alelopáticas, lo que evita el crecimiento y desarrollo de otras especies botánicas cercanas al nogal, dichos efectos se le atribuyen a la juglona, compuesto alelo químico que se libera por la raíz de la planta. Este compuesto que tiene actividad antifúngica, antiparasitaria y contra insectos; además de ser aplicado en algunos usos medicinales; sin embargo, la capacidad eficiencia de

este compuesto dependen del espécimen y de condiciones ambientales como el pH del suelo, textura, materia orgánica y otras características del suelo, así como de condiciones climáticas y de su entorno (Islam *et al.*, 2020).

México es el séptimo país de mayor producción de la nuez de castilla a nivel mundial, después de China, E.E.U.U, Irán, Turquía, Chile y Burkina Faso (FAOSTAT, 2024). El nogal en México se produce principalmente en los estados de Chihuahua, Sonora, Coahuila y Puebla, los cuales destinan aproximadamente 1,008 hectáreas para el cultivo y producen más de 1,556 toneladas al año de nuez (SADER, 2020). En el estado de Puebla, la producción y consumo de nuez de castilla son extensos, siendo de gran relevancia gastronómica, alimentaria y económica al ser parte de platillos tradicionales del país, de igual manera, es consumida como bocadillo y tiene algunos usos medicinales, (González, 2012). Sin embargo, el nogal es vulnerable a diversas plagas y enfermedades fúngicas que pueden comprometer su producción y, por ende, su impacto socioeconómico.

### **2.3 Mosca de la fruta.**

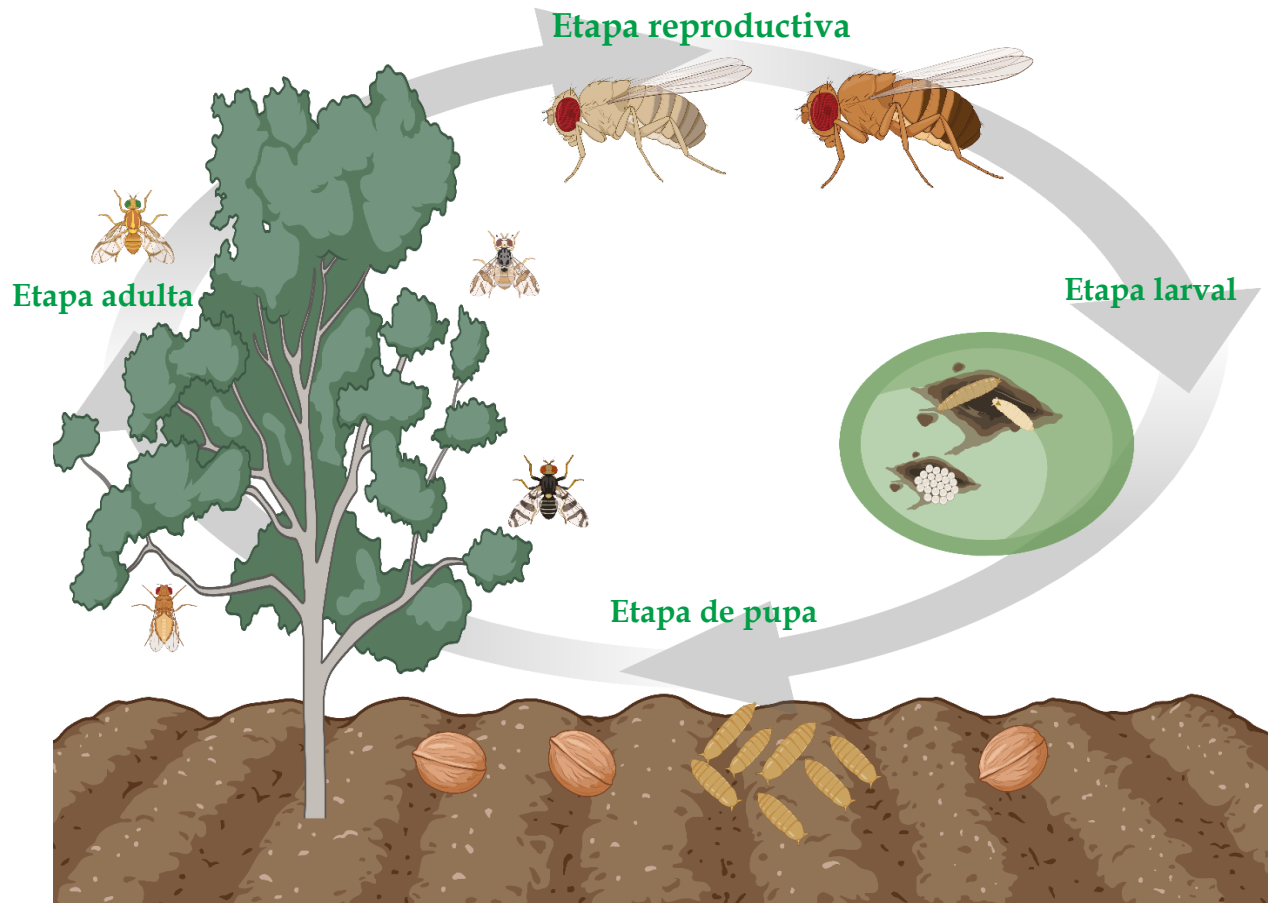
La mosca de la fruta es un insecto del orden Diptera de la familia Tephritidae (Diptera: Tephritidae), es considerada una plaga invasora en diversos frutales como manzana, cereza, tomate, entre otras, y de las cuales destacan los géneros: *Anastrepha* sp., *Bactrocera* sp., *Ceratitis* sp. y *Rhagoletis* sp. (Gutierrez *et al.*, 2021), esta última de mayor impacto en *Juglans regia* L., en las cuales se encuentran *Rhagoletis zoqui*, *R. suavis* y *R. completa*, también conocidas como moscas del nogal o moscas de la cascara del nogal, las cuales en su estado larval se alimentan del pericarpio, tejido verde y carnoso que cubre al fruto y evita el desarrollo de la nuez (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2010). El ciclo de la mosca de la fruta en los cultivos inicia cuando los adultos se reproducen, la hembra pone sus huevecillos debajo de la parte superficial del fruto, pericarpio, al cabo de cuatro días eclosiona la larva y se alimenta de ella provocando, en ciertos casos, la entrada de hongos y bacterias patógenas que afectan a la nuez (Ramírez-Camejo *et al.*, 2017). Al caer la cáscara al suelo, las larvas se entierran y permanecen en etapa de pupa

hasta el siguiente periodo de lluvias, en algunos casos hasta dos años, donde salen los adultos y se reproducen (SENASICA, 2015). El impacto de esta plaga es sumamente importante para los fruticultores ya que puede disminuir la producción de la nuez hasta en un 50%; además, puede causar manchas negras y posteriormente podredumbre, y deformidades en la nuez (Khan *et al.*, 2018). El impacto de esta plaga se ve reflejado en la economía de los fruticultores, en California y Florida se estima que se invierten millones de dólares al año en disminuir la densidad poblacional de la mosca de la fruta en los frutales (Carey *et al.*, 2017), mientras que en la Generalitat Valenciana gasta 9.5 de millones de euros en el control de la plaga (Plá *et al.*, 2021), asimismo, en Europa se cree que la invasión de *Rhagoletis* sp. en los nogales aumenta los costos de producción de la nuez desde un 13% hasta 430% dependiendo del grado de infestación de la mosca de la fruta y los planes de manejo de la plaga (Verheggen *et al.*, 2017).

Las especies de *Rhagoletis* sp. se pueden encontrar en diferentes variantes de *Juglans* sp. que habitan en México, entre ellas *Juglans regia* L., la mosca de la fruta en estado adulto aparece principalmente en la época de lluvias, entre los meses de junio a septiembre; que al mismo tiempo es la etapa de fructificación de la planta (Rull *et al.*, 2013) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Etapas fenológicas de *J. regia* L. y la mosca de la fruta.**

| Estación                          | Primavera                          |      |      | Verano                                  |      |      | Otoño                     |      |      | Invierno |      |      |
|-----------------------------------|------------------------------------|------|------|-----------------------------------------|------|------|---------------------------|------|------|----------|------|------|
|                                   | Mar.                               | Abr. | May. | Jun.                                    | Jul. | Agt. | Sep.                      | Oct. | Nov. | Dic.     | Ene. | Feb. |
| Fenología de la Planta            | Floración y crecimiento vegetativo |      |      | Crecimiento de frutos y cosecha         |      |      | Caída de hojas y/o reposo |      |      |          |      |      |
| Fenología de la mosca de la fruta | Pupas                              |      |      | Adultos y reproducción/ larvas y huevos |      |      | Pupas                     |      |      |          |      |      |



**Figura 1.** Ciclo de la mosca de la fruta en *J. regia* L. (Elaboración propia).

## 2.4 Estrategias de control para la mosca de la fruta.

Las moscas del nogal es una de las plagas de mayor riesgo en la fruticultura a nivel mundial. Existen diversas técnicas para el control de este tipo de plagas para favorecer el umbral económico de la producción de los nogales. Entre las técnicas más frecuentes está la aplicación de insecticidas como O,O-Dimetil-S-metilcarbamoil metilfosforoditioato, O, O-dimetil O-(3-metil-4-nitrofenil) fosforotioato y (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanodioato de dietilo), los cuales logran reducir gran parte de la densidad poblacional de insectos, lo que los convierte en un método económicamente viable pero ambientalmente dañino a la salud humana y a la de los ecosistemas (Medic *et al.*, 2022).

Otro método es el uso de trampas tipo Multilure o McPhail, las cuales utilizan una base de proteína hidrolizada como atrayente para la mosca de la fruta, una vez que ingresa el insecto a la trampa, es incapaz de escapar; lo que las convierte en una alternativa para el control y monitoreo de esta plaga, práctica utilizada en el manejo integral de plagas (Aparicio-Del Moral *et al.*, 2015).

## **2.5 Hongos patógenos en *Juglans regia* L.**

La identificación de hongos patógenos en plantas como *J. regia* L. ha cobrado mayor relevancia en los últimos años ya que pueden causar enfermedades y daños al fruto, raíces, tronco y a las hojas de la planta (Chen *et al.*, 2014). En México no existen registros de detección y aislamiento de hongos patógenos en cultivos de *J. regia* L. Por otra parte, en otras regiones del mundo como en China, Europa y Norteamérica se han realizado estudios para la identificación de hongos y las enfermedades que estos causan en la planta. En el caso de Xu *et al.* (2022), destacaron la presencia de *Ophiognomonia leptostyla* el cual provoca pérdidas de cultivos de *J. regia* L. ubicados en China, de modo similar, detectaron a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Dothideomycetes) y *Juglanconis appendiculata* (Sordariomycetes), involucradas con el tizón y cancro, esta última se consideró de importancia ya que fue capaz de propagarse fácilmente en distancias cortas, afectando a gran parte del cultivo. En República Checa, Eichmeier *et al.* (2020), encontraron especies de *Cadophora* causante de la enfermedad de Petri, la cual obstruye el transporte hídrico y de nutrientes. Mientras que el segundo grupo predominantes de hongos fueron especies de las familias Botryosphaeriaceae y Diatrypaceae asociados con la necrosis de las hojas del árbol. De igual manera, se ha encontrado que Botryosphaeriaceae y Diaporthe son causantes de la muerte regresiva de ramas de la planta (López-Moral *et al.*, 2022).

## **2.6 Afectaciones ambientales por el uso de plaguicidas.**

El ser humano depende de la naturaleza y los servicios que ella le brinda, sin embargo, la sobreexplotación de los recursos limita el progreso de las metas de los Objetivos del

Desarrollo Sostenible (ODS). En la actualidad las plagas y enfermedades fitosanitarias son una problemática de gran envergadura que afecta la salud de las plantas y calidad de los alimentos; por ello, se ha intensificado el uso de plaguicidas para proteger los cultivos de insectos, hongos u otro tipo de microorganismos patógenos. No obstante, son una alternativa que causa contaminación, afecta la calidad de los ecosistemas y efectos en la salud humana, algunos de ellos son persistentes en el suelo o agua, lo que los convierte en una fuente puntual y severa de contaminación (OMS, 2022). Si bien se han realizado acciones para restringir el uso de ciertos plaguicidas considerados como altamente peligrosos, esto no sugiere una solución a la problemática, ya que no han sido suficientes para reducir la exposición a estos compuestos. Una vez aplicado el plaguicida sobre los cultivos, este puede permanecer en el fruto o en la planta, por lo que los agricultores y consumidores están expuestos a los químicos ya sea por inhalación o ingesta. Se ha comprobado que los plaguicidas afectan a las plantas en su desarrollo, inhibiendo el proceso fotosintético y producción enzimática, evita el crecimiento adecuado de las hojas y raíces, reduce el porcentaje de germinación, afecta el rendimiento y producción de las plantas, inclusive causa interferencia en la síntesis de proteínas y del ADN (Parween *et al.*, 2016). Por otra parte, los pesticidas se acumulan en el suelo y en cuerpos de agua cercanos a ella, lo que altera su composición natural y los ecosistemas aledaños por las diversas interacciones del ambiente (Sadeghnezhad *et al.*, 2020). Por ejemplo, uno de los insecticidas con mayor presencia, son los organofosforados, cuya exposición supone una acción altamente tóxica, que afecta el sistema nervioso, cardiovascular o pulmonar, además, de que es un contaminante del suelo, que provoca acidificación, pérdida de fertilidad, lixiviación de nitratos y pérdida de la biodiversidad (Mulla *et al.*, 2020). Por otro lado, los insecticidas son considerados los plaguicidas más tóxicos, seguidos de los fungicidas y herbicidas, a su vez estos persisten en las cadenas alimentarias de los animales, en procesos de bioamplificación, en los cuales los depredadores secundarios y terciarios de la cadena trófica va aumentando la concentración de pesticidas en el tejido corporal, por lo que mayor es

el nivel trófico, mayor será la concentración y persistencia de plaguicida en los animales (Mahmood *et al.*, 2016).

## **2.7 Bacterias quitinolíticas.**

La quitina es un polisacárido con la segunda mayor presencia en la naturaleza. Se ha demostrado que la quitina es parte fundamental del exoesqueleto de insectos. Además, la pared celular de los hongos fitopatógenos está compuesta de quitina. Las quitinasas son enzimas hidrolíticas capaces de degradar la quitina y son producidas por diferentes géneros bacterianos (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). Ejemplo de ello son algunas bacterias utilizadas para el control biológico como *Bacillus velezensis*, sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual es causante de la antracnosis, enfermedad que afecta la producción del nogal (Choub *et al.*, 2021). En otro caso de estudio se analizó la capacidad de algunas rizobacterias contra *Dematophora necatrix*, *Alternaria solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* en cultivos de *J. regia* L. en el Noroeste del Himalaya; entre las bacterias más efectivas en el biocontrol de fitopatógenos se encontraron cepas de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* (Dar *et al.*, 2018).

### **3. TIPO Y ALCANCE DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se clasifica como cuantitativa y experimental. Se desarrolla en un enfoque cuantitativo ya que realiza una recolección y análisis de datos numéricos para evaluar el impacto del control biológico en las plagas y hongos asociados al nogal, este enfoque permite medir variable como la incidencia de la mosca de la fruta y características fenológicas de la planta (Hernández-Sampieri., & Mendoza, 2018).

Además, el estudio es experimental ya que implica que el control es a través de la aplicación de tratamientos biológico con bacterias quitinolíticas, tratamientos químicos y sin aplicación, este método permite identificar el efecto de las bacterias benéficas en comparación con métodos convencionales como los pesticidas. Este tipo de resultados proporcionan una base para establecer la efectividad de los tratamientos biológicos en condiciones de campo (Pereyra, 2020).

El alcance de la investigación es explicativo, ya que explica el efecto de las bacterias sobre el control de plagas y enfermedades fúngicas, así como su impacto en el crecimiento de la planta, este alcance permite describir los efectos observados y argumentar su aplicación como método de control en la fruticultura (Galarza, 2020).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las afectaciones en *Juglans regia* L. son un tema de interés y de preocupación en la producción y conservación de este recurso natural importante. La mosca de la fruta de las especies *Rhagoletis* sp., y *Drosophila* sp., entre otras, se alimentan de la nuez de castilla por lo que afectan a la salud de la planta y calidad del fruto, y por ende, la producción de la nuez y la economía del productor. Además, la infección por la mosca servir como vector de entrada de hongos patógenos; mismos que ocasionan enfermedades y daños al fruto, hojas, ramas, madera, raíz y tallo de la planta. Por ello, los productores nogaleros se han visto obligados a utilizar pesticidas sintéticos, pero esto ha traído efectos adversos a los ecosistemas.

San Nicolás de los Ranchos, Puebla, es una zona de interés al ser uno de los mayores productores de nuez de castilla, sin embargo, tiene importantes pérdidas económicas debido a las plagas y enfermedades producidas por la mosca de la fruta y hongos fitopatógenos. Por lo que, es fundamental establecer una alternativa biológica de control sustentable, que disminuya la densidad de plagas en la zona, sin alterar el sitio y el recurso alimenticio.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La nuez de castilla o *Juglans regia* L. es una fuente alimenticia rica en nutrientes, es parte de la identidad cultural y de la gastronomía mexicana, lo que constituye altos estándares de consumo en Puebla, con San Nicolás de los Ranchos como uno de los mayores productores del Estado. Sin embargo, la incidencia de plagas como la mosca de la fruta y hongos fitopatógenos, así como los métodos empleados en su control, constituyen una amenaza para los cultivos, la salud de la planta y de los productores, pérdidas económicas y efectos adversos al ecosistema. Por lo que este estudio, plantea una vía biológica para el control de plagas de *Juglans regia* L. y de esta manera, proteger la nuez de castilla y favorecer la producción de la región.

Los recursos naturales nos brindan diversos servicios ambientales que, debido a las actividades antropogénicas, se han alterado o disminuido los grandes beneficios que ciertos alimentos, como la nuez de castilla, nos ofrece. La aplicación de insecticidas a los cultivos del nogal perturba la composición original del fruto y promueve la ingesta e inhalación de residuos de plaguicidas. Por ende, este proyecto ayuda a la protección de los productores, consumidores y ecosistema ante contaminantes químicos peligrosos.

Asimismo, la presente investigación está vinculada con cinco de los objetivos del desarrollo sostenible de la FAO (ONU, 2015), que buscan que los agricultores tienen derecho a contribuir con producciones sostenibles y responsables con el medio ambiente. De igual forma, se busca asegurar la calidad del fruto para garantizar la mejor calidad nutricional y medicinal, así como la búsqueda de métodos de control efectivos que no alteren los ecosistemas y salud de los seres vivos.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo influye el uso de bacterias quitinolíticas en el control biológico de la mosca de la fruta, hongos fitopatógenos y calidad en el cultivo del nogal (*Juglans regia* L.) en San Nicolás de los Ranchos, Puebla?

## **7. HIPÓTESIS**

Las bacterias quitinolíticas serán eficientes en el control de la mosca de la fruta y hongos fitopatógenos asociados a *Juglans regia* L. de San Nicolás de los Ranchos, Puebla.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del control biológico de la mosca de la fruta y hongos fitopatógenos asociados a *Juglans regia* L. con bacterias quitinolíticas en cultivos de San Nicolás de los Ranchos, Puebla.

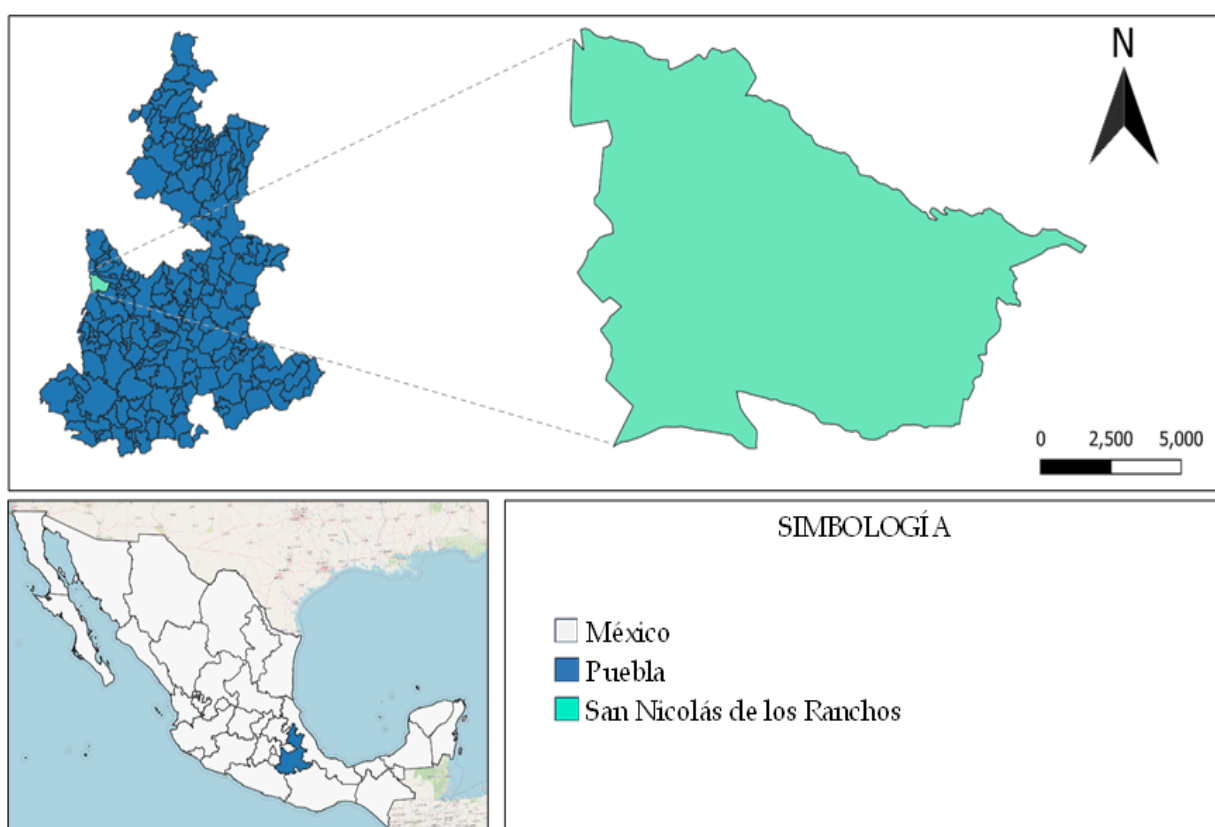
### 8.1. Objetivos específicos

1. Detectar e identificar la mosca de la fruta y hongos patógenos asociados a *J. regia* L.
2. Determinar la capacidad de las bacterias quitinolíticas para el control de hongos patógenos de nogal en condiciones de laboratorio.
3. Determinar el efecto de bacterias quitinolíticas en el control de la mosca de la fruta en condiciones de campo.
4. Evaluar el efecto de bacterias quitinolíticas en la protección de las plantas de *J. regia* L. en condiciones de campo.
5. Evaluar el efecto del control biológico en la fenología de los árboles de *J. regia* L. en condiciones de campo.
6. Comparar el valor comercial de la nuez con los tratamientos foliares.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Descripción de San Nicolás de los Ranchos

San Nicolás de los Ranchos es un municipio del estado de Puebla, ubicado en las faldas del volcán Popocatepetl, en los paralelos 19° 01' 24'' y 19° 08' 30'' de latitud norte y los meridianos 98° 28' 24'' y 98° 39' 00'' de longitud occidental (Figura 2). Cuenta con una extensión territorial de 162.45 km<sup>2</sup> y se localiza en la parte occidental de la cuenca alta del Atoyac. El municipio tiene climas fríos a templados, semifrío y subhúmedo, con lluvias en verano. Con dos tipos de suelo principalmente, litosol y regosol (CONAC, 2021).



**Figura 2. Ubicación satelital de San Nicolás de los Ranchos, Puebla (Elaboración propia).**

La principal actividad económica de los pobladores es la agricultura de temporal, principalmente de maíz y nuez de castilla, por lo que gran parte de la población del municipio labora en actividades agrícolas con más del 16% (DATAMEXICO, 2022). La

producción de nuez de castilla es el objetivo de esta investigación, para ello se realizarán recorridos de campo y toma de muestras del fruto, de las hojas de la planta y del suelo para estudiar e identificar insectos y hongos fitopatógenos.

## **9.2 Fase de muestreo.**

### **9.2.1 Suelo.**

Se recorrió la zona de estudio y se tomaron muestras de 1 kg de suelo asociado a cultivos de *Juglans regia* L. a una profundidad entre 20 y 30 cm. Las muestras se mezclaron para formar una muestra compuesta que se almacenó a 4°C hasta su análisis de propiedades físicas, químicas y microbiológicas.

Por otro lado, se determinó la población bacteriana y fúngica del suelo por medio del método de conteo en placa, para lo que se realizaron diluciones seriadas y siembra en medios de cultivo: agar de MacConkey para bacterias Gram negativas, agar de Czapek-Dox para actinomicetos, agar de Papa-Dextrosa (PDA) para hongos y agar de Soya y Tripticaseina (TSA) para bacterias mesofílicas aeróbicas. Los resultados se reportaron como Unidades Formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC g<sup>-1</sup>).

### **9.2.2 *Juglans regia* L.**

Se tomaron muestras de diferentes árboles de nogal para el aislamiento de hongos asociados a *Juglans regia* L. Se seleccionaron frutos, hojas y flor de la planta sanos y que manifestaron daños o enfermedad.

## **9.3 Fase de laboratorio.**

### **9.3.1 Compatibilidad entre cepas quitinolíticas bacterianas.**

En caldo de Soya y Tripticaseina (CST) se inocularon por separado las siete bacterias de la colección de Microbiología de Suelos BUAP y pertenecientes a las especies de *Bacillus mycoides*, *B. simplex*, *Burkholderia gladioli*, *Peribacillus simplex*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia grimesii*, *S. proteamaculans* y *S. proteamaculans*, a las 24 h se ajustó la

población a  $1.2 \times 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>. Por otro lado, se sembró cada cepa bacteriana en placas con agar TSA y en líneas de 3 cm perpendiculares al primer inóculo. La prueba se realizó por triplicado para cada bacteria. Posteriormente a las 48 h y 72 h, se verificó la compatibilidad de las bacterias quitinolíticas que inhibieron el crecimiento de otra cepa.

### **9.3.2 Determinación de indoles de cepas bacterianas.**

Se preparó un medio de producción de indoles para la inoculación de las bacterias, compuesto por caldo de soya y tripticaseína con 3.125 mg de fructosa y 125 mg de triptófano disueltos en 25 mL de agua destilada. Se incubó durante 4 días para aseverar su esterilidad, posterior se inocularon cada una de las bacterias y se incubó 4 días a 28 – 30 °C a 200 rpm. Las muestras fueron centrifugadas a 500 rpm por 20 minutos para tener el sobrenadante y transferirlos a tubos envueltos en aluminio para protegerlas de la luz, se ajustó el pH a 2.5 con HCl al 10%. Se realizaron tres lavados con 40 mL de acetato de etilo de cada muestra durante 4 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica, se dejó en reposo y se conservó la fase orgánica. La destilación fue mediante un rotavapor y obtener los indoles de cada cepa, a 37 °C hasta su evaporación, los residuos se suspendieron en 500 µL de metanol y fue conservado en refrigeración a 4 °C.

Se tomó una muestra de 20 µL de la muestra y se añadió 1 µL del reactivo de Salkowsky, para el blanco se agregó 20 µL y un 1 µL del reactivo (Glickman y Dessaux, 1994). La mezcla se agitó en un vortex y se incubó a 60°C durante 5 minutos en baño maría, el reactivo de Salkowski facilitó la oxidación del compuesto indólico mediante sales de hierro, generando cambios de color que pueden variar desde un tono rosa claro hasta uno más intenso si el resultado es positivo. Después de enfriar, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 535 nm, se construyó una curva de calibración utilizando los datos obtenidos para cuantificar la producción de indoles por medio del ácido indol-3-acético por parte de las bacterias, con un rango de concentraciones de 10

y 400 µg/mL (Anexo 14.3). Cada prueba se realizó por triplicado para cada cepa bacteriana y el blanco.

### 9.3.3 Aislamiento y caracterización de hongos fitopatógenos.

A partir de las muestras de *J. regia*, se aislaron hongos asociados a la planta por el método de cámara húmeda; para ello, se realizaron tres lavados de las muestras con hipoclorito de sodio al 10% y con agua destilada estéril, posteriormente se pusieron las muestras en placas Petri de vidrio con papel filtro y agua destilada estéril. Una vez que se observó el desarrollo de hifas y micelio en el tejido vegetal, se sembraron los consorcios de hongos en medio agar de Papa-Dextrosa (PDA). Se incubaron durante 7 días a temperatura de 28 - 30°C. Se hicieron resiembras hasta la purificación de los hongos.

Para caracterizar a los hongos fitopatógenos, se utilizaron claves taxonómicas (Carrillo, 2003). Además, se realizaron microcultivos en placas Petri, donde se sembró el hongo en 1 cm<sup>2</sup> de PDA, el cubo de agar se colocó entre un portaobjetos y cubreobjetos, una vez que se observó el crecimiento del hongo, se retiró el medio de cultivo y se colocó una gota de azul de metileno entre las láminas y se sellaron; posteriormente, en el microscopio se identificaron taxonómicamente por medio de sus estructuras fúngicas. Para la identificación molecular se extrajo el ADN genómico de los hongos. Para la extracción de ADN se inoculó el hongo en caldo de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD) para su crecimiento, durante 7 días en agitación. Se utilizó el kit Zymo Research Quick-DNA™ Soil Microbe Miniprep para aislar y purificar el ADN de la muestra. Se llevó a cabo la amplificación del ADN con los primer ITS-IF (forward) (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS-4 (reverse) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, 1990), con ayuda del termociclador Techne®3000G. El programa que se utilizó tiene un paso inicial a 94° C por 2 minutos, seguido de 33 ciclos de 1 minuto a 94° C de desnaturalización, alineamiento a 49.7° C por 1 minuto y 3 minutos de extensión a 72° C. Posteriormente, una extensión final de 7 minutos a 72° C. Los productos de la PCR se verificaron por medio de electroforesis

en agarosa al 0.8% a 80 V por 1.2 horas con la fuente poder Power Pac 3000, y observaron en el transiluminador WUV-L50 WiseUv. Luego, los productos de la reacción fueron purificados con el kit de purificación de ADN genómico Wizard® y secuenciados en el laboratorio de servicios genómicos UGA-LANGEBIO. La identidad de los organismos fue verificada con la herramienta BLAST (GenBank). Las secuencias están disponibles en la base de datos GenBank con los números de acceso que se detallan en el (Cuadro 6).

#### **9.3.4 Ensayos de antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos fitopatógenos asociados a *J. regia* L.**

Se preparó agar de infusión de papa para favorecer el crecimiento tanto de las bacterias quitinolíticas como el de los hongos asociados al nogal y poder realizar las pruebas de antibiosis. Las bacterias se inocularon en tubos de caldo de nutritivo para su propagación y se incubaron en agitación a 28 – 30° C. A las 24 h se ajustó la población a  $1.2 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Las cepas se sembraron por duplicado en placas con el medio de cultivo, de forma lineal con 3 cm de largo (Figura, 3), después de 24 h se inoculó el hongo en la parte central de la placa, cada prueba se realizó por triplicado contra las siete especies bacterianas y un testigo.

### **9.4 Fase de campo**

#### **9.4.1 Aplicación de control biológico en *J. regia* L.**

Se evaluó el efecto de las bacterias quitinolíticas sobre la mosca de la fruta y hongos asociados a *Juglans regia* L. Se aplicaron diez tratamientos en árboles de la zona de estudio, siete de ellos biológicos con cepas de *Bacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, dos tratamientos químicos, un fungicida químico, un insecticida y un testigo sin aplicación (Cuadro 2), todos los tratamientos se evaluaron por triplicado.

La aplicación foliar de los tratamientos fue mensual a partir de marzo hasta junio del 2023. También se cuidó que las aplicaciones cubrieran a las hojas, ramas, tronco y al

área del suelo debajo de la copa del árbol. Para ello, primeramente se propagaron todas las cepas en caldo de Soya y Trypticaseina a 28 - 30 °C por 24 h en agitación a 125 revoluciones por minuto (rpm). La aplicación de cada tratamiento fue de 5 litros en relación 1:5 de cada cultivo bacteriano diluido en agua con ayuda de un aspersor portátil para riego inalámbrico, con 2 mL de adherente (Alcohol polivinílico éter de polietilenglicol etoxilado). Todos los tratamientos se diluyeron al momento de su aplicación en campo. Para el fungicida se diluyeron 15 g en 5 L de agua y para el insecticida fueron 250 mL en 5 L de agua, ambas preparaciones son conforme a la sugerencia del fabricante en aplicaciones en frutales, se añadió 2 mL de adherente y se tomaron las medidas de seguridad recomendadas.

**Cuadro 2. Tratamiento en *J. regia* L. de San Nicolás de los Ranchos, Puebla.**

| Número de tratamiento | Contenido del tratamiento                                                                                                                                     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                     | Testigo                                                                                                                                                       |
| 2                     | <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> y <i>P. simplex</i>                                                                                                    |
| 3                     | <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> y <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                                            |
| 4                     | <i>P. fluorescens</i>                                                                                                                                         |
| 5                     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i>                                                                                      |
| 6                     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                         |
| 7                     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i> |
| 8                     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                              |
| 9                     | Fungicida (2,4,5,6-tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo)                                                                                                      |
| 10                    | Insecticida (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanodioato de dietilo)                                                                                      |

Los cultivos bacterianos se ajustaron a un litro con una población de  $1.2 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> y se diluyeron en agua en proporción 1:5.

#### 9.4.2 Mosca de la fruta.

Para evaluar la presencia de la mosca de la fruta, posterior a la aplicación foliar de los tratamientos, se colocaron trampas tipo McPhail (Figura 3), que se adaptaron a partir de botellas de plástico recicladas a las que se les colocó una cinta amarilla y cuatro perforaciones de 3 cm de diámetro en la parte superior. Se preparó una mezcla de agua con una porción de azúcar, levadura y peptona de caseína. Las trampas se ubicaron en las ramas de los árboles de *Juglans regia* L., al ser un sitio estratégico por el ciclo de vida de la mosca. Se colocaron tres trampas de McPhail en cada unidad experimental y se aseguró evitar que la filtración de agua o de polvo pudiera afectar su funcionamiento. Se recogieron 7 días después de su colocación, los insectos atrapados se colectaron y se conservaron en una solución alcohol etílico al 70%.

Para la recolección de larvas, se colectaron 5 frutos por unidad experimental de puntos cercanos a la trampa, y se conservaron en recipientes cerrados bajo las mismas condiciones, una vez que el fruto presento síntomas de pudrición se colectaron las larvas manualmente y se depositaron en contenedores con alcohol etílico al 70% para su conservación.



Figura 3. Trampa tipo McPhail para la captura de la mosca de la fruta.

#### 9.4.3 Identificación de la mosca de la fruta.

Las moscas de la fruta recolectadas fueron identificadas por claves taxonómicas (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2010), para validar las variantes que se asocian a *J. regia* L. en la zona experimental. Una vez descritas se cuantifico la población de cada especie de la mosca de la fruta identificada en cada tratamiento.

La identificación molecular de las moscas de la fruta, fue a partir de la extracción de ADN tejido de los insectos o larvas con el Kit Quick -DNA (Zymo Research®), y de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizaron los primers C1-J-2792 (5'-ATACCTCGACGTTATTCAGA-3') y TK-N-3772 (5'-GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT-3') (Simon *et al.*, 1994), del gen citocromo c oxidasa I (COI). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl: 12.5 µl de GoTaq Colorless Master Mix 2X (Promega), 0.5 µM de cada uno de los primers y 1 µl de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne®TC-3000G), con las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, posteriormente de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 10 min (Rull *et al.*, 2013). Los productos de la PCR se purificaron con el kit DNA Wizard® Genomic DNA Purification y se secuenciaron en el Laboratorio de Servicios Genómicos (UGA-LANGEBIO). Se verificó la identidad de los organismos con la herramienta BLAST (GenBank) Las secuencias están disponibles en la base de datos GenBank bajo el número de proyecto PRJNA1101084.

#### 9.4.4 Evaluación del control biológico en *J. regia* L.

Se calculó el porcentaje de daño en árboles a partir del segundo y cuarto foliolo de muestras de las hojas compuestas recolectadas en los diferentes tratamientos. Se calculó de acuerdo con la escala de daño foliar diseñada específicamente para este trabajo (Figura 4). Se obtuvieron 10 hojas por cada unidad experimental y se evaluó el daño conforme a las especificaciones de la escala diseñada. Una vez obtenido el

porcentaje de daño foliar, se procedió a calcular el área foliar en cm<sup>2</sup> de cada una de las muestras, esto por medio del programa ImageJ V 1.54d (National Institutes of Health, USA). Además, se evaluó el diámetro de la nuez fresca y, posteriormente se sometió a sequedad a 70°C hasta obtener masa constante y se calculó su masa seca (Anexo 14.2).



**Figura 4.** Escala de daño en folíolos de *J. regia* L.

### **9.5 Comparativa del valor comercial de la nuez de castilla.**

Se visitaron localidades de venta de la nuez de castilla en la ciudad de Puebla, se obtuvieron nueces de diferentes precios en el mes de Julio del 2024. Se procedió a medir el diámetro de las nueces obtenidas correspondientes a los precios de 180.00 MXN, 200.00 MXN y 280.00 MXN, posteriormente, se realizó una comparativa de los precios de las nueces en el comercio con respecto a los tamaños obtenidos con los tratamientos en campo en este estudio.

### **9.6 Análisis estadístico.**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa RStudio, versión R version 4.3.3. A todos los datos se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilkins y posteriormente se realizó un análisis de varianza y comparación de medias. Para los datos que fueron normales se aplicaron las pruebas paramétricas ANOVA y Tukey y para aquellos datos no normales, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Dunn, con valor de significancia  $p \leq 0.05$ .

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1 Fase de laboratorio

#### 10.1.1 Caracterización del suelo.

Conforme a los resultados la textura del suelo corresponde al franco arenoso que se considera dentro del rango ideal para la planta (Cuadro 3) (Lemus, 2010). El pH determinado fue de 6.5, se encuentra dentro del rango 6.1 y 7.8, establecido como conveniente para el nogal (Wani *et al.*, 2016). La concentración de fósforo extractable registró 213.9 mg kg<sup>-1</sup>, la cual es clasificada como alta de acuerdo con la NOM 021-RECNAT-2000, pero lo anterior se explica por ser procedente de suelos volcánicos y por la cercanía de San Nicolás de los Ranchos con el volcán (López-González, 2013).

**Cuadro 3. Análisis fisicoquímico del suelo de San Nicolás de los Ranchos.**

| Parámetro          | Unidades              | Valor         | Interpretación*          | Método  |
|--------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|---------|
| pH                 |                       | 6.5           | Moderadamente ácido      | AS-02*  |
| M.O.               | %                     | 1.9           | Medio                    | AS-07*  |
| Nitrógeno          | %                     | 0.1           | Medio                    | AS-25*  |
| Arena:Limo:Arcilla | %                     | 80.0:14.0:6.0 | Franco arenoso           | AS-09*  |
| Ca                 | cmol kg <sup>-1</sup> | 5.6           | Medio                    | AS-12*  |
| Mg                 | cmol kg <sup>-1</sup> | 2.0           | Medio                    | AS-12*  |
| Na                 | cmol kg <sup>-1</sup> | 1.0           | NA                       | AS-12*  |
| K                  | cmol kg <sup>-1</sup> | 0.3           | Bajo                     | AS-12*  |
| CIC                | cmol kg <sup>-1</sup> | 9.6           | Bajo                     | AS-12*  |
| P                  | mg kg <sup>-1</sup>   | 214.0         | Alto                     | Bray-1  |
| DA                 | g mL <sup>-1</sup>    | 1.4           | NA                       | Probeta |
| CE                 | dS m <sup>-1</sup>    | 0.2           | Efecto nulo de salinidad | AS-18*  |

Resultados en base a la NOM 021-RECNAT-2000\*. NA: No aplica

El análisis microbiológico (Cuadro 4), evidencia una cantidad de  $16 \times 10^6$  bacterias mesófilas, lo cual es un indicativo de la actividad microbiana y está asociado a un suelo saludable y fértil (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Además, la cantidad de hongos es otro dato que proporciona información sobre el estado actual del suelo, si gran parte de estos hongos son endófitos o saprofitos ayudan a la composición del suelo y protegen a la planta, otra parte son patógenos para la misma e infectar a la raíz, tallo, hoja o fruto (Berdugo, 2009). La diversidad microbiana en el suelo es fundamental para su fertilidad y para ayudar a ser un suelo supresor. Algunos microorganismos ayudan a la disponibilidad de los nutrientes para las plantas, además de producir antibióticos y competir por el espacio contra patógenos (Jayaraman *et al.*, 2021). Sin embargo, los consorcios de hongos patógenos causan diversas enfermedades a las plantas como en el caso de *J. regia* L (Liu *et al.*, 2023).

**Cuadro 4. Análisis microbiológico del suelo de la zona de estudio.**

| Bacterias                                        |                |                              | Hongos    |
|--------------------------------------------------|----------------|------------------------------|-----------|
| Mesófilas aeróbicas                              | Gram negativas | Filamentosas (Actinomicetos) |           |
| UFC g <sup>-1</sup> de suelo (x10 <sup>3</sup> ) |                |                              |           |
| 16,000 ± 141.0                                   | 5 ± 0.1        | 700 ± 35.3                   | 100 ± 2.8 |

UFC: Unidades formadoras de colonias

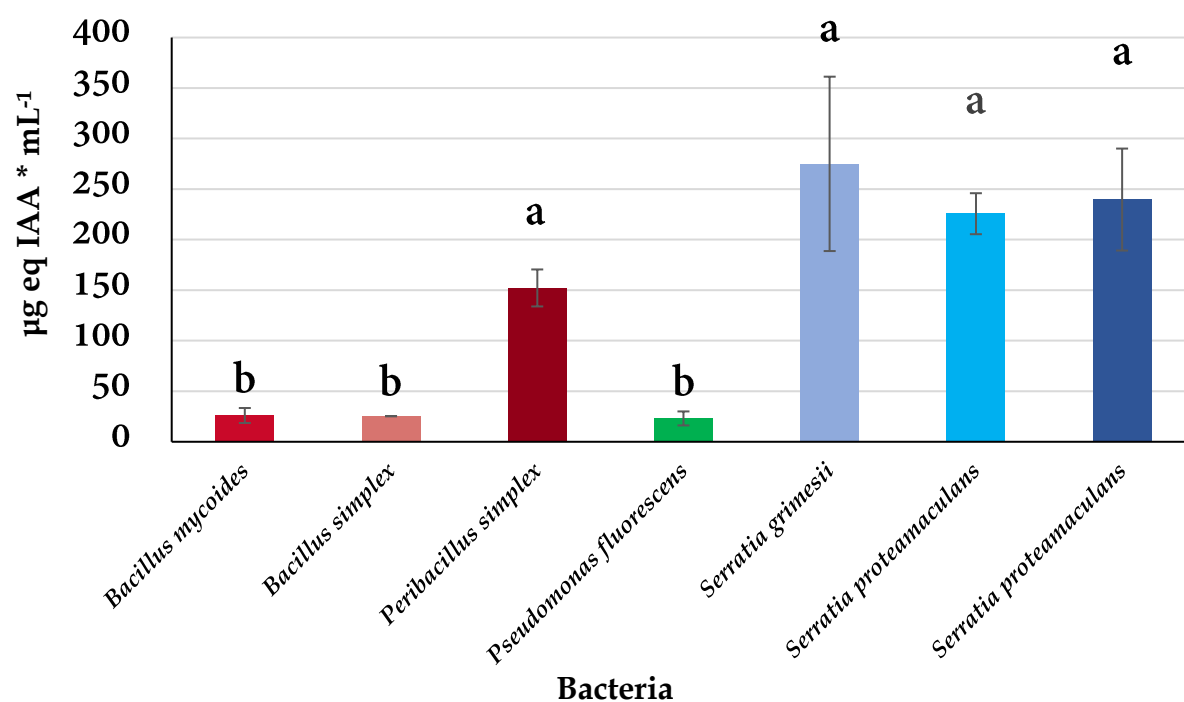
#### 10.1.2 Características de bacterias de control biológico.

De las ocho bacterias seleccionadas para la prueba de compatibilidad, solo *Burkholderia gladioli* fue excluida ya que impedía el crecimiento de las demás cepas bacterianas, por lo que las siete bacterias restantes fueron aceptadas para el control biológico en laboratorio y campo en *Juglans regia* L. (Cuadro, 5). Asimismo, se realizó la prueba de indoles totales (Figura, 5) para conocer su capacidad de producir fitohormonas como el ácido indol-3-acético (IAA), hormona que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal liberan con lo que estimulan el desarrollo de las plantas (Yousef, 2018).

**Cuadro 5. Bacterias seleccionadas en el control biológico de *J. regia* L.**

| Bacteria                       | Clave     | Origen   |
|--------------------------------|-----------|----------|
| <i>Bacillus mycoides</i>       | BUAP-P3N  | Agrícola |
| <i>Bacillus simplex</i>        | BUAP-E3L  | Agrícola |
| <i>Peribacillus simplex</i>    | BUAP-C2C  | Agrícola |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | BUAP-CA48 | Agrícola |
| <i>Serratia grimesii</i>       | BUAP-P5S  | Forestal |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | BUAP-P1R  | Forestal |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | BUAP-P3S  | Forestal |

Bacterias seleccionadas del banco del laboratorio de Microbiología de Suelos

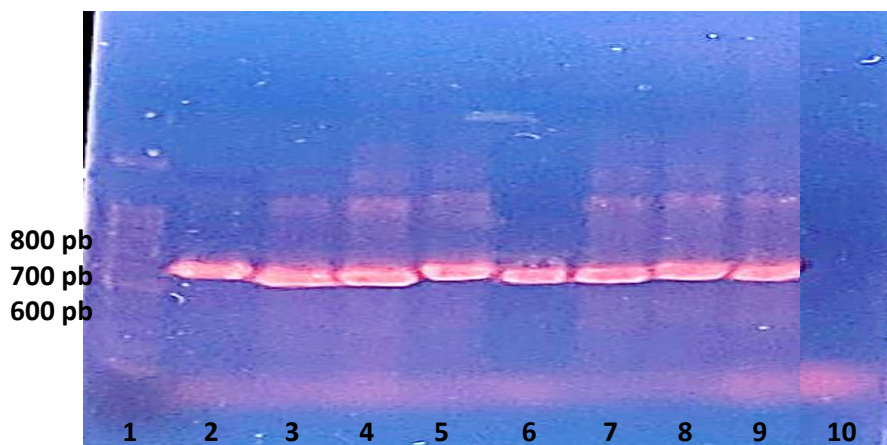


**Figura 5. Indoles totales de bacterias quitinolíticas para el control biológico.**

### 10.1.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos.

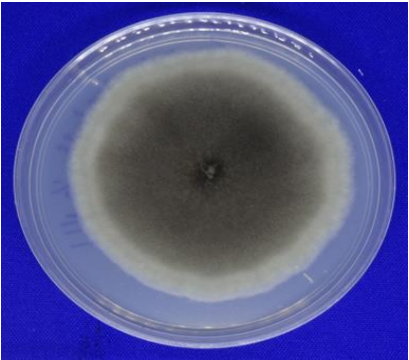
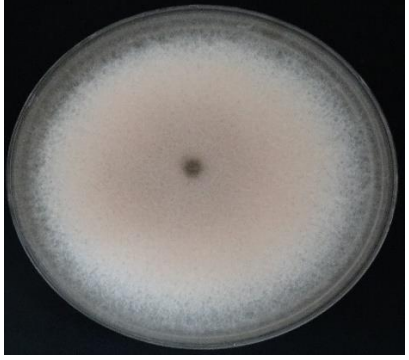
Se realizó la propagación de hongos por el método de cámara húmeda para detectar la presencia de hongos asociados a *Juglans regia* L. Este método se efectuó con frutos de los ciclos 2021 y 2022, así como hoja y flor del 2023.

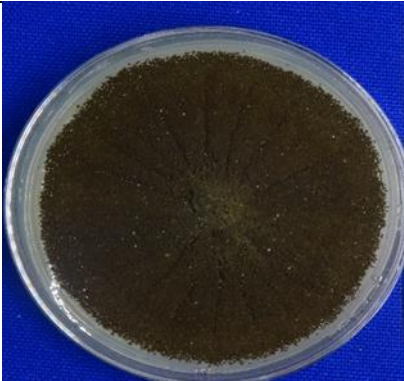
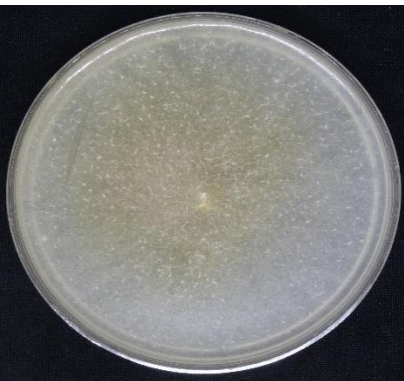
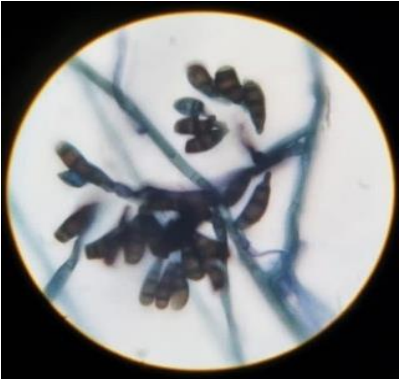
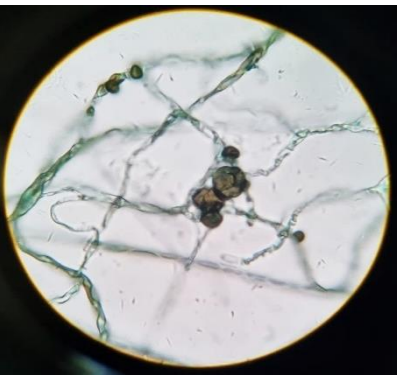
Por claves taxonómicas y técnicas moleculares (Figura 6) se identificaron 10 hongos asociados al nogal: 6 encontrados en hojas correspondientes a *Acremonium* sp. (SNJH3), *Alternaria alternata* (SNJH4), *Aspergillus niger* (SNJH2), *Aspergillus ustus* (SNJH1), *Curvularia trifolii* (SNJH6) y *Neofusicoccum nonquaesitum* (SNJH5); 3 en fruto como *Alternaria alternata* (SNJN1), *Fusarium oxysporum* (SNJN2) y *Rhizopus* sp. (SNJN3); y en la flor se aisló *Epicoccum nigrum* (SNJF1) (Cuadro 6).

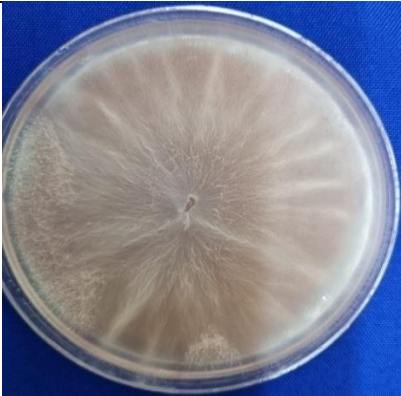
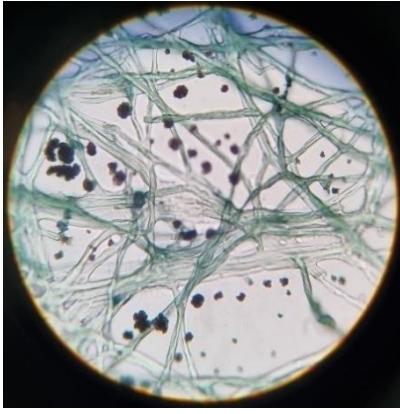
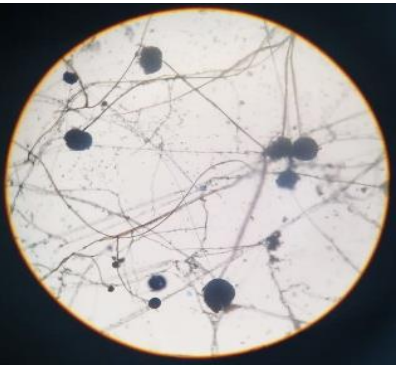


**Figura 6. Productos de PCR de hongos asociados a *J. regia* L., los carriles representan: 1) Marcador de peso molecular (100 pb), 2) *F. oxysporum*, 3) *N. nonquaesitum*, 4) *A. alternata*, 5) *C. trifolii*, 6) *A. ustus*, 7) *Epicoccum nigrum*, 8) *A. niger*, 9) y 10) Blanco negativo.**

**Cuadro 6. Hongos aislados y asociados a *J. regia* L.**

| Especie                     | Número de acceso | Morfología macroscópica                                                              | Morfología microscópica                                                               |
|-----------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Acremonium</i> sp.       | ND               |    |    |
| <i>Alternaria alternata</i> | PP657151         |   |   |
| <i>Alternaria alternata</i> | PP657147         |  |  |

| Especie                    | Número de acceso | Morfología macroscópica                                                              | Morfología microscópica                                                               |
|----------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i>   | PP657145         |    |    |
| <i>Aspergillus ustus</i>   | PP657152         |   |   |
| <i>Curvularia trifolii</i> | PP657148         |  |  |
| <i>Epicoccum nigrum</i>    | PP657150         |  |  |

| Especie                           | Número de acceso | Morfología macroscópica                                                              | Morfología microscópica                                                               |
|-----------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i>         | PP657149         |    |    |
| <i>Neofusicoccum nonquaesitum</i> | PP657146         |   |   |
| <i>Rhizopus sp.</i>               | ND               |  |  |

ND: No determinado molecularmente. Morfología microscópica vista con microscopio con aumento de 1000x.

El género *Fusarium* sp. es conocido por producir necrosis apical marrón, el cual puede generar caída prematura del fruto del nogal, evita su desarrollo y afecta la producción (Pardatscher *et al.*, 2009). En el caso de *Fusarium oxysporum* hongo causante de marchitez y necrosis a la planta hospedera, el cual impide el transporte del agua al

alterar los vasos del xilema, además de ser muy conocido por ser productor de micotoxinas como el ácido fusárico y la beauvericina causantes de diversas enfermedades en frutales (Zuriegat *et al.*, 2021), es considerado como el quinto patógeno de mayor impacto en las plantas, además de provocar infecciones invasivas para el ser humano en pacientes inmunocomprometidos (Dean *et al.*, 2012). San Martín *et al.*, (2023) encontraron que *F. oxysporum* y *A. alternata* son patógenos del nogal causantes de necrosis en la planta y caída prematura del fruto. El género *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp. se han encontrado en el fruto enfermo, además que *A. alternata* también es conocido por producir manchas foliares marrones en el nogal (Temperini *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2023). *Acremonium* sp. se sabe que es causante de enfermedades en árboles hospederos, provocándoles manchas foliares, o podredumbre en la madera (Arzanlou y Narmani, 2015).

*Aspergillus* sp. es un hongo patógeno conocido por producir micotoxinas como la aflatoxina, la cual la podemos encontrar en productos alimenticios como el maíz, trigo o el arroz, contaminándolos y ocasionando problemas en el hígado o corazón, incitando hemorragias (Naqvi *et al.*, 2023). Sin embargo, al momento se desconoce si *A. niger* y *A. ustus* producen enfermedades al nogal, por lo que pudieran comportarse como saprofitos. En el caso de *N. nonquaesitum* se ha reportado ser un patógeno de *J. regia* L. por infectar las ramas, hojas y fruto produciendo antracnosis (Michailides *et al.*, 2012). En cultivos del nogal en California se detectaron lesiones foliares y enfermedades en ramas, hojas y frutos, siendo *N. nonquaesitum* uno de los hongos que ocasionan dichos problemas en los cultivos (Chen *et al.*, 2014). Mientras que *C. trifolii* se desconoce aún su compartimiento en el nogal, sin embargo, se sabe que se puede comportar como saprófito y patógeno como el caso de *Trifolium alexandrinum* y *Nicotiana tabacum* causando manchas foliares (Khadka 2016, Chen *et al.*, 2017)

#### **10.1.4 Ensayos de antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos fitopatógenos asociados a *J. regia* L.**

Se realizaron pruebas de antagonismo de las cepas bacterianas seleccionadas para el control biológico contra los hongos fitopatógenos aislados del nogal (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Antagonismo de bacterias quitinolíticas contra hongos asociados a *J. regia* L.**

| Hongo \ Bacteria                          | Testigo (cm) | <i>Peribacillus simplex</i> BUAP-C2C (cm) | <i>Bacillus mycoides</i> BUAP-P3N (cm) | <i>Bacillus simplex</i> BUAP-E3L (cm) | <i>Serratia proteamaculans</i> BUAP-P1R (cm) | <i>Serratia proteamaculans</i> BUAP-P3S (cm) | <i>Serratia grimesii</i> BUAP-P5S (cm) | <i>Pseudomonas fluorescens</i> BUAP-CA48 (cm) |
|-------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>Acremonium</i> sp. (SNJH3)             | 4.1 ± 0.1 d  | 3.2 ± 0.4 c                               | 2.4 ± 0.3 bc                           | 3.1 ± 0.0 c                           | 0.7 ± 0.4 a                                  | 0.5 ± 0.1 a                                  | 0.4 ± 0.1 a                            | 2.9 ± 0.1 bc                                  |
| <i>Alternaria alternata</i> (SNJN1)       | 5.9 ± 0.0 f  | 2.0 ± 0.1 d                               | 1.7 ± 0.4 cd                           | 1.3 ± 0.1 bc                          | 0.7 ± 0.1 ab                                 | 0.5 ± 0.1 a                                  | 0.7 ± 0.1 ab                           | 4.1 ± 0.0 e                                   |
| <i>Alternaria alternata</i> (SNJH4)       | 3.6 ± 0.0 d  | 1.4 ± 0.4 b                               | 0.7 ± 0.0 ab                           | 0.8 ± 0.1 ab                          | 0.6 ± 0.1 a                                  | 0.8 ± 0.1 ab                                 | 0.7 ± 0.1 ab                           | 2.3 ± 0.1 c                                   |
| <i>Aspergillus niger</i> (SNJH2)          | 4.7 ± 0.2 d  | 3.2 ± 0.4 c                               | 2.4 ± 0.3 b                            | 2.1 ± 0.1 b                           | 0.7 ± 0.4 a                                  | 0.5 ± 0.1 a                                  | 0.4 ± 0.1 a                            | 2.9 ± 0.1 bc                                  |
| <i>Aspergillus ustus</i> (SNJH1)          | 4.6 ± 0.1 c  | 1.9 ± 0.1 a                               | 1.6 ± 0.0 a                            | 1.6 ± 0.0 a                           | 1.1 ± 0.4 a                                  | 1.3 ± 0.4 a                                  | 1.1 ± 0.0 a                            | 3.7 ± 0.1 b                                   |
| <i>Curvularia trifolii</i> (SNJH6)        | 4.7 ± 0.2 c  | 4.8 ± 0.1 c                               | 3.4 ± 0.2 b                            | 3.5 ± 0.1 b                           | 2.6 ± 0.1 a                                  | 2.2 ± 0.5 a                                  | 2.1 ± 0.0 a                            | 3.9 ± 0.1 b                                   |
| <i>Epicoccum nigrum</i> (SNJF1)           | 3.8 ± 1.2 b  | 1.2 ± 0.1 a                               | 1.0 ± 0.0 a                            | 0.4 ± 0.1 a                           | 0.6 ± 0.2 a                                  | 0.3 ± 0.1 a                                  | 0.4 ± 0.0 a                            | 1.6 ± 0.3 a                                   |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (SNJN2)         | 7.5 ± 0.0 d  | 5.4 ± 0.1 b                               | 2.4 ± 0.3 a                            | 2.0 ± 0.0 a                           | 4.9 ± 0.4 b                                  | 5.2 ± 0.1 b                                  | 5.6 ± 0.5 bc                           | 6.6 ± 0.2 cd                                  |
| <i>Neofusicoccum nonquaesitum</i> (SNJH5) | 4.0 ± 0.1 c  | 0.4 ± 0.0 a                               | 0.3 ± 0.0 a                            | 0.8 ± 0.0 ab                          | 1.4 ± 0.1 b                                  | 1.1 ± 0.2 ab                                 | 0.3 ± 0.1 a                            | 0.7 ± 0.1 ab                                  |
| <i>Rhizopus</i> sp. (SNJN3)               | 8.5 ± 0.0 f  | 7.3 ± 0.3 e                               | 5.3 ± 0.4 d                            | 0.8 ± 0.1 a                           | 1.7 ± 0.2 b                                  | 7.0 ± 0.1 e                                  | 1.8 ± 0.0 b                            | 3.5 ± 0.0 c                                   |

Se muestra los resultados de los ensayos de antagonismo del diámetro de los hongos (cm) ± el error estándar, letras distintas en la misma fila representan diferencias significativas. Prueba ANOVA y Tukey (p<0.05).

Las bacterias quitinolíticas mostraron control biológico de forma significativa contra los 10 hongos aislados e identificados previamente de *J. regia* L. Se observó que el género *Serratia* fue el tratamiento más efectivo *in vitro* contra los hongos aislados de *J. regia* L., ya que redujo los diámetros de crecimiento de los patógenos significativamente respecto al control. Las especies *S. proteamaculans*, *S. proteamaculans* y *S. grimesii* ya han sido probadas *in vitro*, contra hongos fitopatógenos asociados a *Pinus patula*, disminuyendo entre un 45 a 97% del crecimiento fúngico (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2023). En el caso de *Fusarium oxysporum*, el género *Bacillus* tuvo mayor respuesta ante este hongo, lo que pudiera deberse a la diferencia bacteriana de respuesta y generación de metabolitos ante diferentes patógenos. Algunas especies de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., aisladas de la rizósfera de cultivos de *J. regia* L., comprobaron su capacidad antagonica contra hongos asociados al nogal, reduciendo desde 8 hasta 49% del desarrollo de patógenos, siendo el género *Bacillus* el más estudiado en el control biológico contra hongos en cultivos del nogal (Sofi *et al.*, 2018). Se observa que *A. alternata* aislada de hoja y *A. alternata* aislada del fruto son dos cepas fúngicas distintas al comportarse de forma diferente *in vitro* tanto sin antagonismo como con el control biológico en donde el hongo aislado de la hoja fue inhibido por el género *Serratia* y *Bacillus* (Figura 8), mientras que *A. alternata* del fruto fue afectado por tres cepas de *S. proteamaculans*, *S. grimesii* y *S. proteamaculans*. Para el caso de *P. fluorescens* el antagonismo mostrado fue el menos eficaz, pese a esto redujo significativamente crecimiento fúngico ( $p < 0.05$ ), a excepción del de *F. oxysporum*.

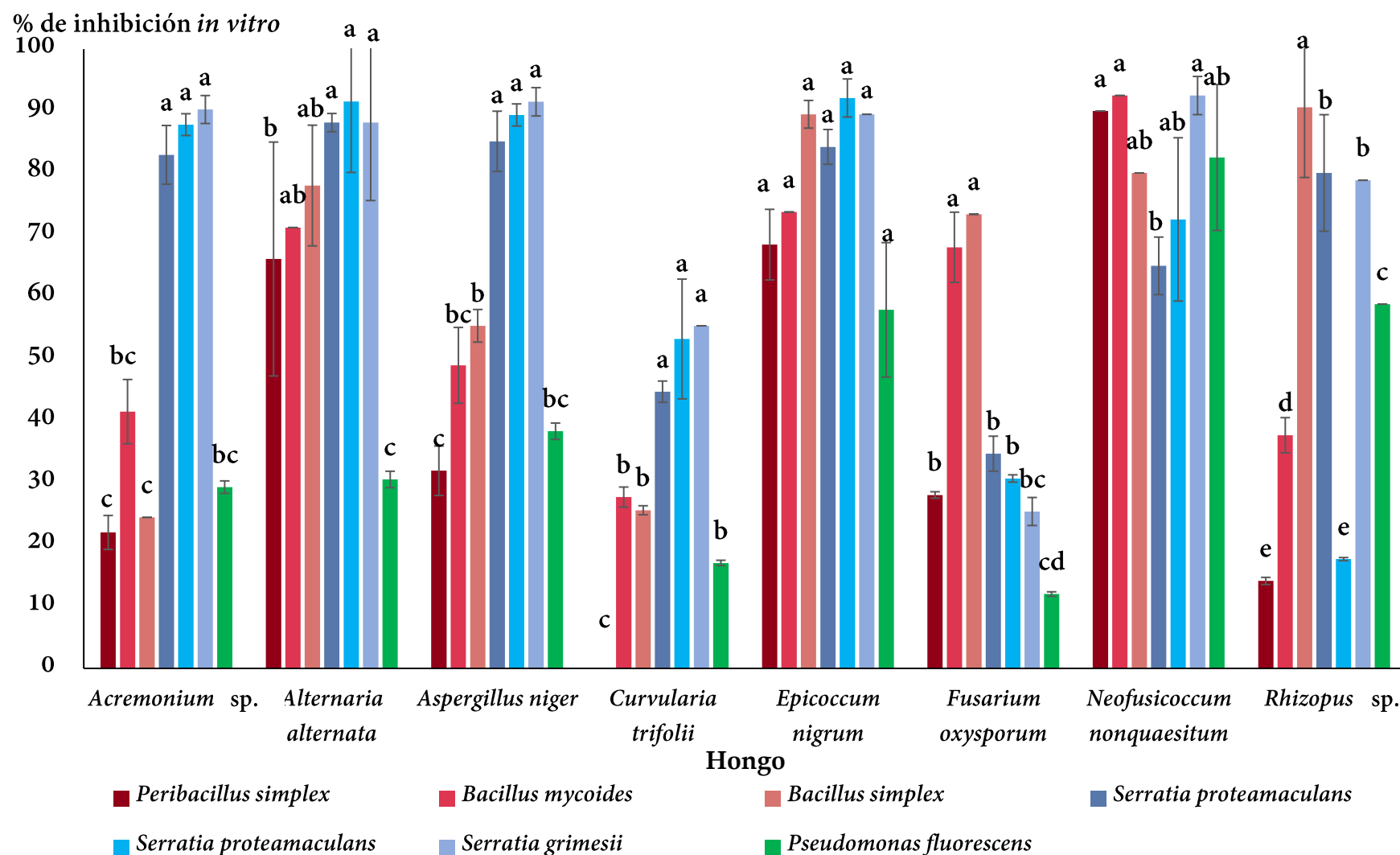
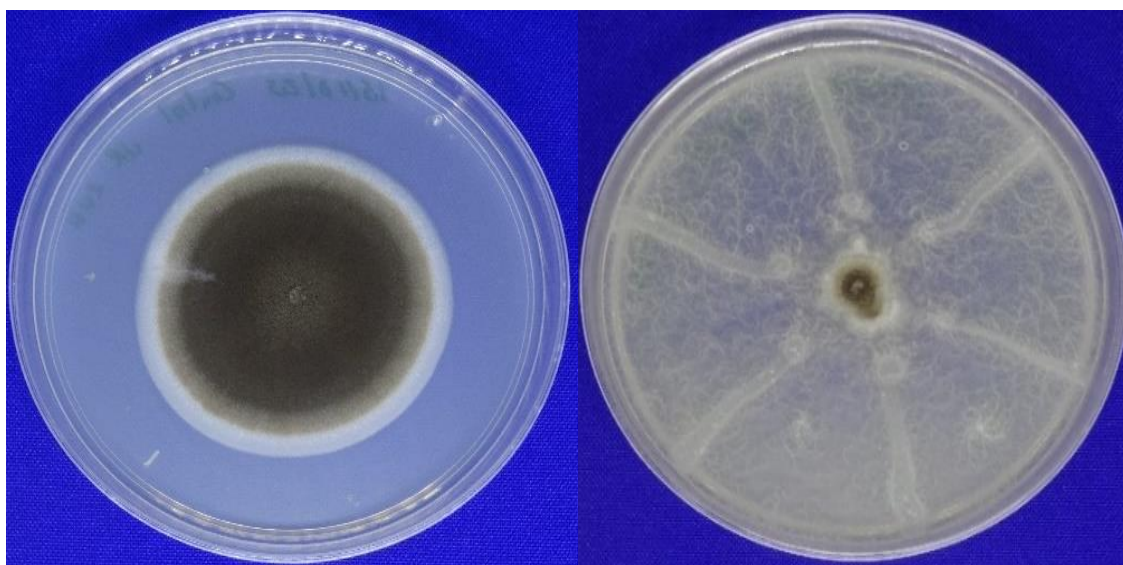


Figura 7. Porcentaje de inhibición de control biológico *in vitro* contra hongos aislados de *J. regia* L.

En el porcentaje de inhibición (Figura 7) se observa que las siete bacterias redujeron el desarrollo fúngico, alcanzando hasta 91% de disminución, siendo la bacteria *S. proteamaculans* (P3S-B), la más eficiente. *C. trifolii* fue el hongo que mayor resistencia tuvo ante el control biológico; pese a esto, el género *Serratia* fue el que tuvo mayor eficacia reduciéndolo hasta un 50%. En caso de *P. simplex* tuvo la mayor inhibición contra *N. nonquaesitum* y *E. nigrum*, sin embargo, no tuvo ningún efecto contra *C. trifolii*.

Las bacterias con actividad quitinolítica mayormente empleadas en el control biológico corresponden a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, por su producción de enzimas líticas como las quitinasas, glucanasas y quitosanasas. Estas enzimas contribuyen en conjunto, o de manera individual, al control biológico fúngico, actúan como micoparasitismo degradando la pared celular e hifas de los hongos (Dukare *et al.*, 2021); otros efectos que tienen las enzimas ante los hongos es la deformación de las células, distorsión micelial y cambios en la membrana, por lo que el control con enzimas líticas es una alternativa antagónica óptima contra patógenos fúngicos (Di Francesco *et al.*, 2016).



**Figura 8. Prueba de antagonismo de *A. alternata* testigo y contra *Bacillus mycoides* (BUAP- P3N).**

## 10.2 Fase de campo

### 10.2.1 Porcentaje de daño en hojas compuestas

Se realizaron aplicaciones foliares de los tratamientos bacterianos (Figura 9), y de productos sintéticos Clorotalonil (fungicida) y Malatión (insecticida) como testigos químicos (Gutiérrez, 2018; Gutiérrez, 2023). La aplicación fue en los meses de marzo, abril, mayo y junio de 2023, etapa estacional ideal conforme a la aparición de follaje y fructificación del nogal e incidencia de la mosca de la fruta (Cuadro 7).



**Figura 9. Aplicación de tratamiento biológico en *J. regia* L. de San Nicolas de los Ranchos.**

En el Cuadro 8, se puede observar que el control biológico de *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* + *Pseudomonas fluorescens* (T3) (6.0%) fue el tratamiento más efectivo para disminuir las lesiones en los folíolos respecto al control (9.3%,  $p \leq 0.05$ ); además, este tratamiento presentó menores afectaciones por insectos, como aberturas del tejido vegetal, (Figura 10), los cuales son daños debido a las enfermedades causadas por patógenos, sin embargo en ocasiones las hojas también pueden mostrar manchas debido a la ausencia de déficit nutrimental, los cuales son conocidas por seguir patrones y determinados colores.



**Figura 10. Comparativa de tratamientos A: Testigo y B: Tratamiento *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* + *Pseudomonas fluorescens*.**

En el caso de *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *P. fluorescens* (14.9 %) (T8) no hubo cambios estadísticos con respecto al testigo ( $p > 0.05$ ), esto se puede deber a que la combinación de las cepas bacterianas es ineficaz para el control de las enfermedades fúngicas con síntomas como la presencia de manchas foliares. Los efectos de los tratamientos de *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* (T5) es igual de eficiente comparado al (Cuadro 8), disminuyendo el daño en la planta con respecto al testigo en un (7.1 y 7.6 %, respectivamente) ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 1. Porcentaje de daño foliar por enfermedades fúngicas en *J. regia* L.**

| Ensayo | Tratamiento                                                                                                                                                    | Daño foliar (%) |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| T1     | Testigo                                                                                                                                                        | 9.3 ± 0.4 bc    |
| T2     | <i>B. mycooides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                                                                                                    | 7.8 ± 2.0 abc   |
| T3     | <i>B. mycooides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                                            | 6.0 ± 0.6 a     |
| T4     | <i>P. fluorescens</i>                                                                                                                                          | 8.7 ± 1.6 bc    |
| T5     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i>                                                                                       | 7.1 ± 0.4 ab    |
| T6     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycooides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                         | 9.7 ± 2.0 bc    |
| T7     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycooides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i> | 7.8 ± 0.4 ab    |
| T8     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                               | 14.9 ± 2.2 c    |
| T9     | Fungicida (2,4,5,6-tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo)                                                                                                       | 7.6 ± 0.8 ab    |
| T10    | Insecticida (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanodioato de dietilo)                                                                                       | 7.2 ± 0.8 ab    |

Se muestra los resultados del daño foliar de la aplicación foliar (%) ± el error estándar, letras distintas en la misma fila representan diferencias significativas. Prueba ANOVA y Tukey (p<0.05).

Se ha reportado que gran porcentaje de las dosis aplicadas de los plaguicidas en la agricultura no tienen el efecto sobre la plaga en cuestión, pero que, simultáneamente, ocasionan alteraciones graves al medio ambiente y en la salud humana, como el caso de Clorotalonil, causante de dermatitis alérgica, sensibilización pulmonar grave o problemas gastrointestinales con la población expuesta de manera directa e indirecta por su alta volatibilidad en el ambiente (Tao *et al.*, 2024). Se ha encontrado evidencia de que este plaguicida se encuentra fácilmente en aguas subterráneas, por lo que la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria lo clasifico como cancerígeno y se ha limitado su uso en la agricultura, por la toxicidad de sus metabolitos encontrados en el suelo que posteriormente se encuentran en el agua potable (EFSA, 2018).

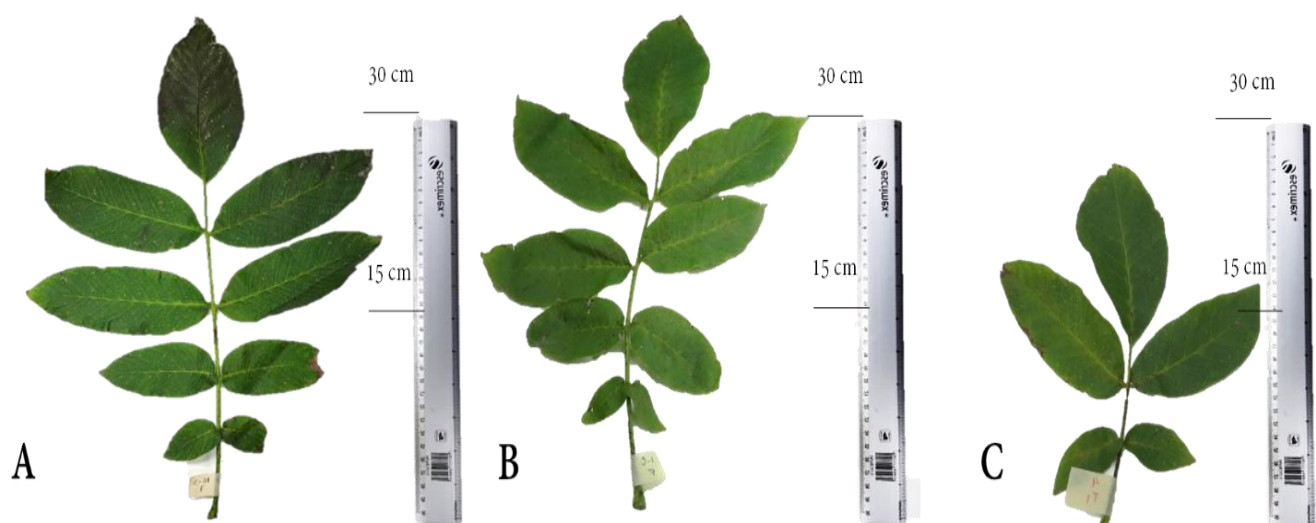
Se ha reportado que *F. oxysporum* y *A. alternata* son dos hongos patógenos causantes de manchas foliares en las hojas del nogal (Liu *et al.*, 2023), sin embargo, existen bacterias patógenas de *J. regia* L. como *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* que provocan la enfermedad del tizón del nogal y necrosis apical en el tejido de los foliolos en plantas de diferentes fenotipos del nogal (San Martín *et al.*, 2023). En ciertos casos, las infestaciones por hongos o bacterias patógenas pueden manifestarse mediante la fructificación por medio de lesiones húmedas, definidas y negras, aunque generalmente estas infestaciones son visibles en el exterior, dentro de la nuez también pudieran encontrarse lesiones, lo que repercute en la producción y desarrollo del mismo (Marangi *et al.*, 2024). Temperini *et al.*, (2017) reportaron necrosis apical en nueces de cultivos de Argentina, provocadas por *X. arboricola*, *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp., en más de 40% de los frutos recolectados, afectando drásticamente el sector productivo.

### 10.2.2 Características fenológicas de *J. regia* L.

El efecto de los tratamientos se evaluó en diferentes propiedades fenológicas de los nogales, lo cuales incluyeron el área foliar de las hojas compuestas, se determinó el diámetro y masa seca de los frutos del nogal (Cuadro 9), recolectados de la primera fructificación posterior a la aplicación de los tratamientos. El área foliar podría ser un indicativo de las propiedades de las bacterias para promover el crecimiento y desarrollo de la planta, los resultados demostraron que los mejores tratamientos fueron *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *B. mycoides*, *B. simplex* + *P. simplex* (T6) (294.1 cm<sup>2</sup>) y el fungicida (T9) (284.1 cm<sup>2</sup>) (Figura 11), si bien ambos tratamientos tuvieron la misma área foliar para el caso del tratamiento biológico logró un aumento de área foliar de 90 cm<sup>2</sup> en las hojas, con respecto al testigo ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento con la mezcla de *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* + *P. fluorescens* (T3), tuvo resultados favorables para el crecimiento de las hojas compuestas. Al respecto, se han realizado estudios con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de

*J. regia* L. en tiempos de sequía con géneros de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. para estudiar los cambios en la rizosfera del nogal, en donde el segundo género consiguió mayores cambios y condiciones de supresión del estrés hídrico (Fang-chun *et al.*, 2014). A su vez Liu *et al.*, (2023), demostraron que *Bacillus* sp. aislados de la rizosfera del nogal estimulan al nogal favoreciendo el crecimiento del diámetro y altura de plántulas de *J. regia* L. bajo estrés hídrico.



**Figura 11. Comparativa de área foliar A) Fungicida, B) *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* y C) Testigo.**

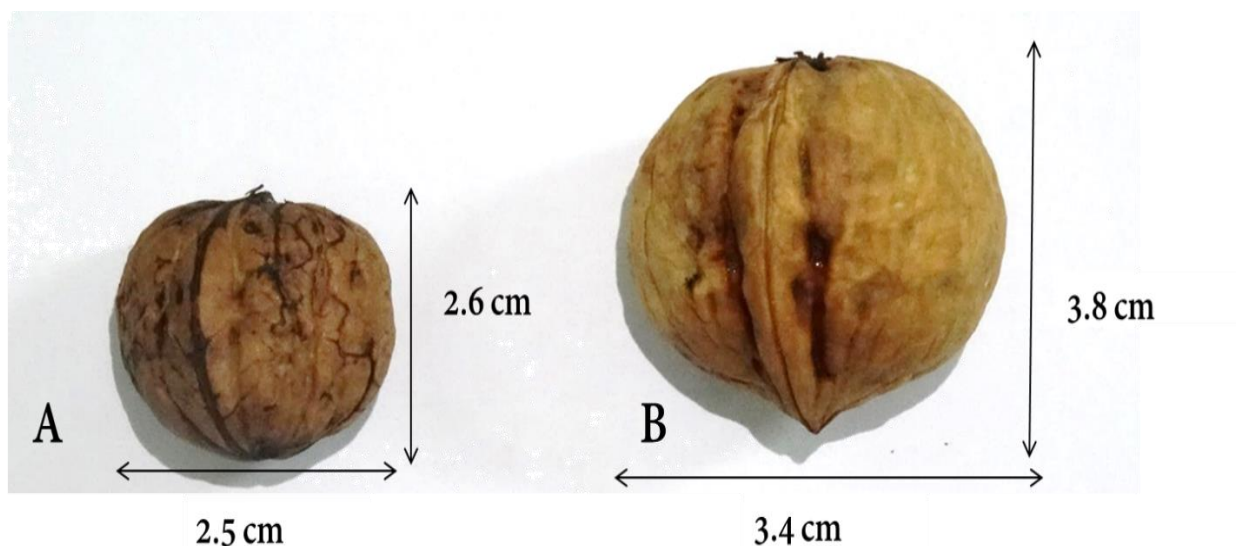
**Cuadro 2. Características fenológicas de *J. regia* L. de los tratamientos foliares.**

| Ensayo | Tratamiento                                                                                                                                                   | Área foliar §<br>(cm <sup>2</sup> ) | Diámetro de<br>nuez ¥<br>(cm) | Masa seca de<br>nuez ¥<br>(g) |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T1     | Testigo                                                                                                                                                       | 197.1 ± 8.3 c                       | 2.9 ± 0.1 d                   | 6.8 ± 0.1 cd                  |
| T2     | <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                                                                                                    | 253.1 ± 7.6 ab                      | 3.9 ± 0.1 a                   | 10.9 ± 0.7 b                  |
| T3     | <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                                            | 288.8 ± 17.3 a                      | 3.8 ± 0.1 ab                  | 15.4 ± 0.7 a                  |
| T4     | <i>P. fluorescens</i>                                                                                                                                         | 269.0 ± 20.5 ab                     | 3.6 ± 0.3 abc                 | 11.3 ± 0.6 b                  |
| T5     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i>                                                                                      | 261.0 ± 16.2 ab                     | 3.6 ± 0.2 abc                 | 11.1 ± 0.2 b                  |
| T6     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                         | 294.1 ± 11.5 a                      | 3.7 ± 0.1 abc                 | 9.6 ± 0.2 bc                  |
| T7     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i> | 108.0 ± 23.7 d                      | 3.2 ± 0.1 bcd                 | 3.7 ± 0.4 d                   |
| T8     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                              | 151.7 ± 5.3 cd                      | 3.2 ± 0.1 bcd                 | 6.9 ± 0.9 cd                  |
| T9     | Fungicida (2,4,5,6-Tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo)                                                                                                      | 284.1 ± 13.2 a                      | 3.2 ± 0.0 bcd                 | 11.6 ± 0.2 b                  |
| T10    | Insecticida (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanodioato de dietilo)                                                                                      | 236.9 ± 18.8 ab                     | 4.0 ± 0.1 a                   | 11.6 ± 1.0 b                  |

Los valores representan la media de tres repeticiones seguido de su error estándar ( $p < 0.05$ ), letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. La comparación de medias se realizó con las pruebas de Tukey¥ y Kruskal Wallis§.

El diámetro de la nuez de castilla en los tratamientos *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* (3.9 cm) y Malatión (4.0 cm) fueron similares entre sí ( $p < 0.05$ ) y ambos presentaron un aumento con respecto al testigo que registró un diámetro promedio de (2.9 cm). El insecticida es reconocido por ser eficaz contra insectos y es sumamente utilizado por los agricultores de la región, este ayuda a que la mosca de la fruta disminuya su presencia en los frutos, posibilitando la mejora de la fructificación, no obstante, genera daños para los consumidores, ya que la OMS, ha mencionado que los alimentos con aplicaciones de pesticidas químicos tienen afectaciones a la salud, lo cual ya es un problema ambiental de la actualidad (OMS, 2022). Por lo que se considera que la mezcla *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* puede ser una opción potencial para el desarrollo del fruto (Figura 12), además de contribuir a la disminución de los daños de los folíolos y el desarrollo fúngico *in vitro*.

En el caso de la masa seca de la nuez el tratamiento *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* + *P. fluorescens* tuvo el resultado significativo, demostrando que además de ser el más eficaz en el control de daño foliar, también estimuló el área foliar, diámetro y masa seca del fruto.



**Figura 12. Comparativa de diámetro de nuez de A) Control y B) *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex*.**

Se ha demostrado que los tratamientos biológicos favorecen el desarrollo de *J. regia* L. actuando también como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, aumentando el tamaño y masa de la nuez de castilla, indicativo esencial para la compraventa del fruto, siendo un panorama favorable para la economía de los fruticultores (Ercisli *et al.*, 2012, Yarılgac *et al.*, 2001). La aplicación de los tratamientos foliares en los meses seleccionados fue un factor relevante al ser la etapa de floración y fructificación de la planta, ayudándola a contribuir a su desarrollo y producción.

Se han investigado bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizósfera de *J. regia* L., las cuales por medio de la producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, cianuro de hidrógeno y el ácido giberélico auxilian al desarrollo y crecimiento de la planta, además de ayudar a los nogales a subsistir en épocas de sequía y mejorar la absorción de nutrientes (Lotfi *et al.*, 2022). La capacidad que tengan las bacterias en cuestión de producir metabolitos es esencial para el control biológico y desarrollo de la planta, ya que el cianuro de hidrógeno está asociada al control de patógenos, además que se ha encontrado que aumenta la disponibilidad de fósforo (Rijavec *et al.*, 2016). En el caso de los sideróforos son conocidos por aumentar la disponibilidad de hierro en el suelo, al mismo tiempo que limitan su presencia para los patógenos, compitiendo por nutrientes con otras bacterias y favoreciendo su disponibilidad para la planta (Santoyo *et al.*, 2021), el ácido indol-3-acético y el ácido giberélico han sido ampliamente investigados, reconocidos por contribuir a la elongación de las raíces, favorece la actividad fotosintética de las plantas, facilitan la floración y ayudan al aumento y desarrollo de las hojas y frutos (Baliyan *et al.*, 2022, Alemneh *et al.*, 2021). Ante esto las bacterias seleccionadas para este estudio se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Gutierrez-Flores *et al.*, 2023) y si bien fueron aisladas de la rizosfera de otras plantas, se comprobó su capacidad ante *J. regia* L. donde aumentaron considerablemente el área foliar (Figura 13) y aspectos esenciales del fruto (Figura 14).

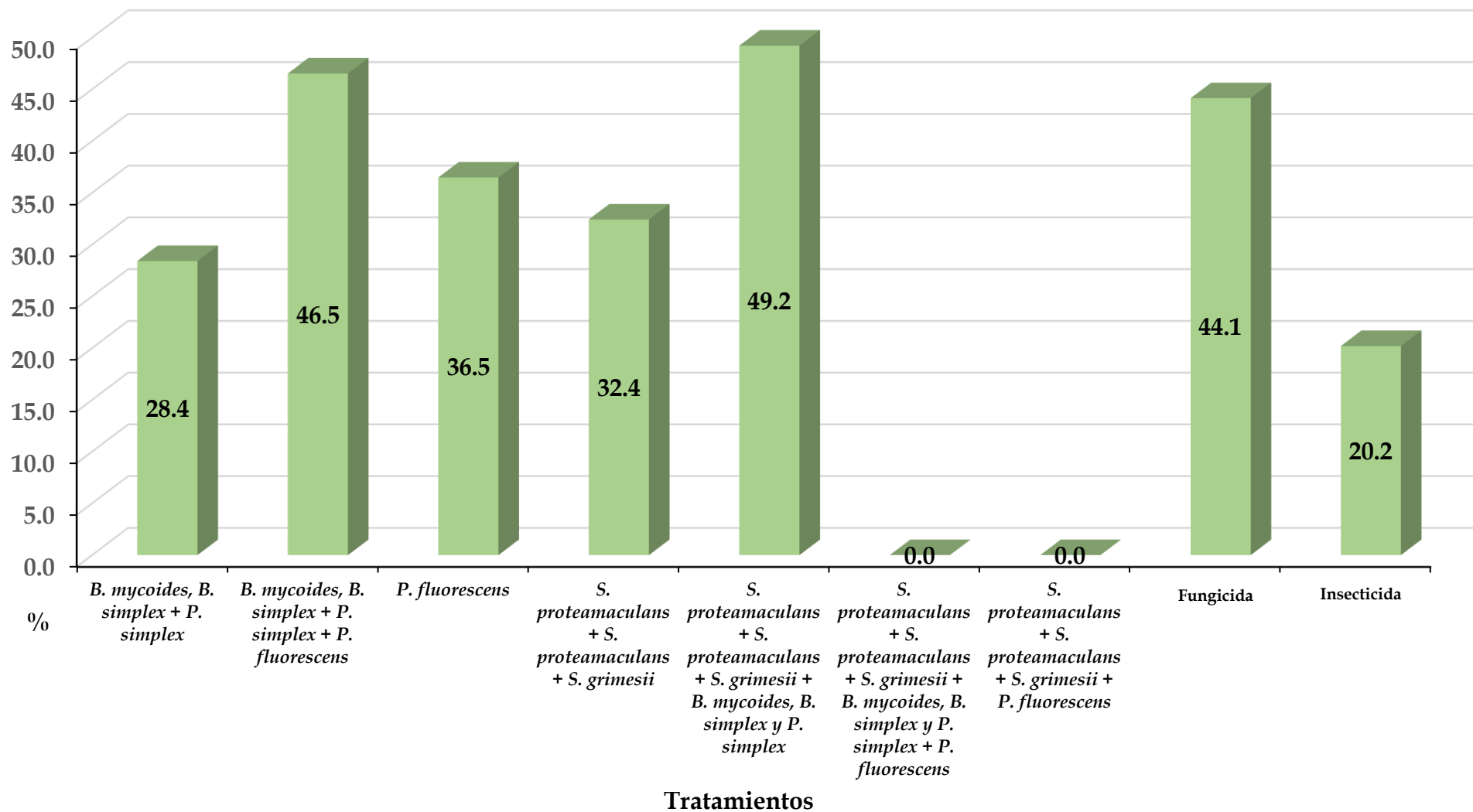


Figura 13. Aumento de área foliar de los tratamientos en *J. regia* L. con respecto al testigo.

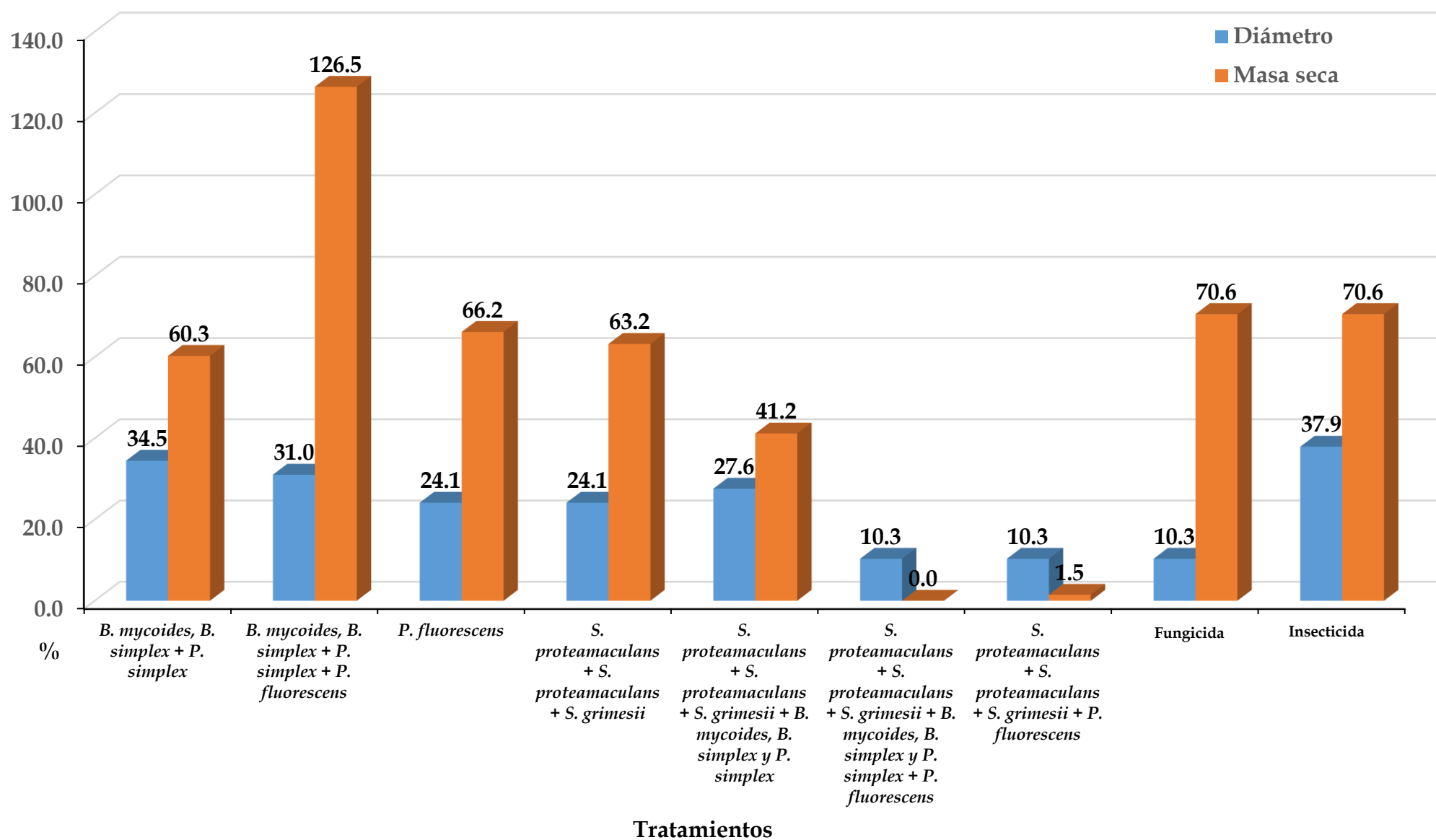


Figura 14. Incremento del diámetro y masa seca del fruto con respecto al testigo.

### 10.2.3 Identificación de la mosca de la fruta.

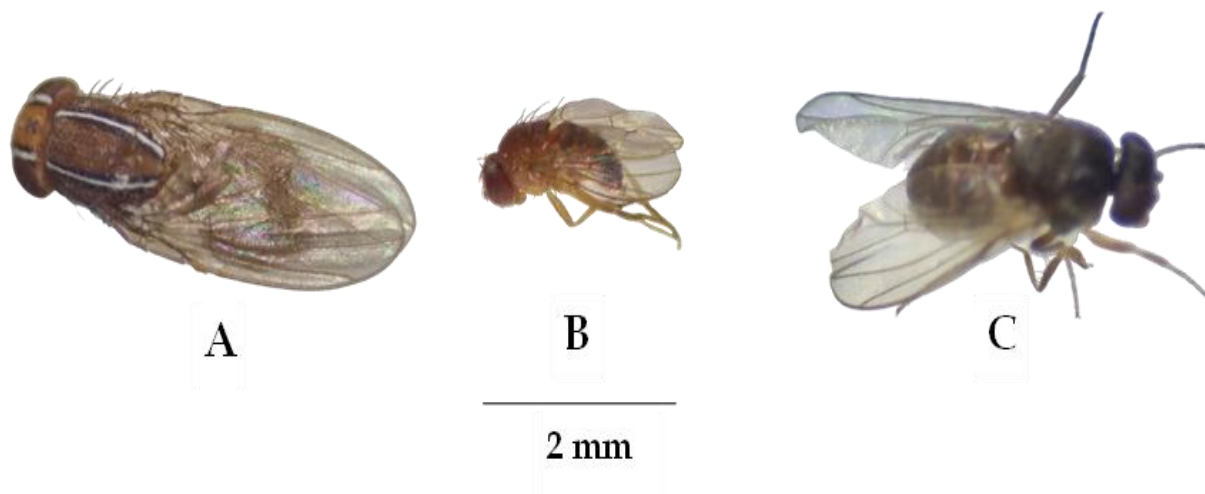
Posterior a la aplicación de tratamientos de foliares de la fase de campo y a la captura de la mosca de la fruta con trampas tipo McPhail, se procedió a la identificación taxonómica y molecular (Figura 15) de la plaga. Se dividieron por grupos los insectos capturados, con moscas albinas, moscas oscuras y otro tipo de insectos como coleópteros, himenópteros y otro tipo de dípteros. La identificación molecular demostró que la PCR obtuvo el tamaño esperado (1000 pb), a continuación se muestra el porcentaje de similitud conforme a la base de datos BLAST y una descripción taxonómica de las moscas de la fruta capturas en los nogales de la zona experimental son:

a) *Drosophila* sp. (No cuenta con identificación molecular) (SNMB) se distingue por su color marrón y las bandas blancas que se extienden desde la cabeza hasta el tórax. Mide entre 4 y 6 mm y posee alas transparentes (Figura 15A);

b) *Bactrocera zonata* (84.24%) (SNMC) es la especie de menor tamaño identificada en los nogales, con un tamaño que oscila entre 2 y 3 mm. Tiene un cuerpo y ojos de color marrón, y sus alas son translúcidas con venas bien definidas y marcadas (Figura 15B);

c) *Drosophila longicornis* (98.80%) (SNMA) presenta una tonalidad predominantemente negra y marrón oscuro, con un tamaño que varía entre 5 y 7 mm. Su tórax muestra bandas de colores negro y café, y sus ojos son de color café (Figura 15C).

Además, se identificaron dos larvas extraídas del pericarpio del fruto, correspondientes a *Rhagoletis completa* con un porcentaje de similitud del 94.07% (SNLA) y *Bactrocera zonata* (84.24%) (SNLB), las cuales representan directamente la plaga que afecta a los nogales.



**Figura 15. Moscas de la fruta asociadas a *J. regia* L. A) *Drosophila* sp., B) *Bactrocera zonata* y C) *D. longicornis*.**

Hernandez-Ortiz *et al.*, (2020) reportaron que las moscas de la fruta de mayor impacto económico en los nogales pertenecen al género *Rhagoletis completa* y *R. suavis*, si bien, no se cuentan con reportes de *Drosophila* sp. y *Bactrocera zonata* en los nogales, estas moscas de la fruta afectan diferentes plantas, impacta otros frutales puesto que se les considera organismos oportunistas.

#### **10.2.4 Control biológico contra la mosca de la fruta.**

*Drosophila* sp. tuvo la mayor densidad poblacional en los nogales, seguido de *Drosophila longicornis* y *Bactrocera zonata*, sin embargo, no se capturó a *Rhagoletis* sp. en estado adulto, solo se encontró evidencia en estado larval, comprobando su asociación en el fruto del nogal.

El tratamiento con menor incidencia de la plaga en los nogales fue el de *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *B. mycoides*, *B. simplex* + *P. simplex* + *P. fluorescens* (T7) que disminuyó la población de los tres grupos de la mosca de la fruta (Cuadro 10) con un promedio de 92.6 individuos reduciendo drásticamente la plaga. Para el caso del control de *Drosophila* sp. los tratamientos *B. mycoides* + *B. simplex* + *P. simplex* + *P. fluorescens* (T3) y *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* (T5)

tuvieron diferencias significativas, para el caso de *D. longicornis* todos los tratamientos disminuyeron su presencia excepto de *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *P. fluorescens* (T8), *P. fluorescens* (T4) y el insecticida (T10), y con *Bactrocera zonata* el único tratamiento con diferencia estadística fueron los cuatro géneros bacterianos (T7) ( $28.1 \text{ nm} \pm 7.7$ ).

El tratamiento con fungicida (T9) redujo significativamente la población de *D. longicornis* ( $65.5 \text{ nm} \pm 14.8$ ), mientras que el insecticida tuvo el mismo efecto que el testigo ante las tres especies de las moscas cuantificadas. El Malatión fue ineficiente en el control de la mosca de la fruta en la zona de estudio, lo cual pudiera ser un indicativo de la resistencia que tienen los insectos ante el plaguicida, (Badr, 2020)., Mehdi *et al.*, (2020) reportaron para el caso de *Drosophila melanogaster* tiene resistencia ante el estrés oxidativo que produce la aplicación de Malatión en dosis bajas, por lo que requieren de dosis elevadas para aumentar la mortalidad de los insectos demostrando que una población de insectos que genera resistencia ante un plaguicida puede resistir ante los efectos de otros tratamientos químicos.

La presencia de la mosca de la fruta en un gran número poblacional, impacta negativamente a los nogales, esta alternativa ayuda a reducir su incidencia en los árboles, las bacterias con actividad quitinolítica producen enzimas que degradan la capa de cutícula del cuerpo de la mosca produciendo deshidratación y por ende su mortalidad (Abdullah *et al.*, 2014), además también pueden causar virulencia en el aparato digestivo de los insectos en estado adulto y larval, donde la quitinasa actúa como un componente tóxico sistémico, por lo que las bacterias que la producen podrían utilizarse como un bioplaguicida de bajo costo para el control de plagas de insectos (Dukare *et al.*, 2021).

Si bien se sabe que la mosca de la fruta actúa como vector a la entrada de patógenos fúngicos y bacterianos (Ramírez-Camejo *et al.*, 2017), esta plaga también tiene repercusiones económicas para los fruticultores. En cultivos de la Unión Europea se ha identificado que *R. completa* es la mosca de la fruta asociado al nogal y con

repercusiones fenológicas de la planta, afectando el desarrollo del fruto y cambios en la economía de los fruticultores, ya que infestan  $\pm 50\%$  de los frutos en un solo huerto (Verheggen *et al.*, 2017), (Emery *et al.*, 2019).

**Cuadro 3. Población de la mosca de la fruta en *J. regia* L.**

| Ensayo | Tratamiento                                                                                                                                                   | <i>Bactrocera</i><br><i>zonata</i><br>(SNMC)<br>(nm) | <i>Drosophila</i><br><i>longicornis</i><br>(SNMA)<br>(nm) | <i>Drosophila</i> sp.<br>(SNMB)<br>(nm) |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| T1     | Testigo                                                                                                                                                       | 78.0 ± 13.0 bc                                       | 133.0 ± 4.0 d                                             | 241.0 ± 13.0 c                          |
| T2     | <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                                                                                                    | 84.0 ± 8.5 bc                                        | 105.0 ± 6.0 bc                                            | 294.0 ± 13.0 cd                         |
| T3     | <i>B. mycoides</i> + <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                                            | 64.0 ± 4.5 ab                                        | 115.0 ± 8.5 bc                                            | 179.0 ± 5.5 ab                          |
| T4     | <i>P. fluorescens</i>                                                                                                                                         | 90.0 ± 5.0 bc                                        | 176.0 ± 12.5 e                                            | 328.0 ± 13.0 d                          |
| T5     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i>                                                                                      | 54.0 ± 14.0 ab                                       | 37.0 ± 4.5 a                                              | 93.0 ± 9.5 ab                           |
| T6     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i>                         | 78.0 ± 7.5 bc                                        | 103.0 ± 10.0 bc                                           | 206.0 ± 1.0 bc                          |
| T7     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>B. mycoides</i> , <i>B. simplex</i> + <i>P. simplex</i> + <i>P. fluorescens</i> | 28.0 ± 7.0 a                                         | 22.0 ± 6.0 a                                              | 42.0 ± 9.5 a                            |
| T8     | <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. proteamaculans</i> + <i>S. grimesii</i> + <i>P. fluorescens</i>                                                              | 81.0 ± 8.5 bc                                        | 159.0 ± 5.0 e                                             | 267.0 ± 9.0 cd                          |
| T9     | Fungicida (2,4,5,6-Tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo)                                                                                                      | 47.0 ± 3.5 ab                                        | 65.0 ± 10.5 ab                                            | 221.0 ± 12.0 bc                         |
| T10    | Insecticida (2-[(dimetoxifosforotioil)sulfanil] butanodioato de dietilo)                                                                                      | 113.0 ± 7.0 c                                        | 119.0 ± 5.5 cd                                            | 311.0 ± 15.5 cd                         |

Los valores representan la media de tres repeticiones seguido de su desviación estándar ( $p < 0.05$ ), letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Se aplicó la prueba de Tukey. nm: número de la mosca de la fruta.

### 10.2.5 Comparativa del valor comercial de la nuez de castilla.

En San Nicolás de los Ranchos, así como en todo el estado de Puebla, la nuez de castilla en los meses de junio, julio, agosto y septiembre tiene gran demanda, al ser parte fundamental del chile en nogada, receta típica del estado y de la república. En los meses mencionados el platillo tiene relevancia cultural y comercial, aumentando el valor económico de sus ingredientes principales.

Tras los datos recolectados del tamaño y el precio de las nueces, se obtuvo que el diámetro promedio de 3.0 cm le corresponde el precio de 180.00 MXN, el de 3.3 cm tiene un precio de 200.00 MXN/100u y el tamaño promedio de 3.8 cm cuenta con un precio de 280.00 MXN/100u. Ante esto, la comparativa del tamaño de la nuez de los tratamientos (Figura 16) muestra que el Testigo (T1), Fungicida (T9), *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *B. mycoides*, *B. simplex* + *P. simplex* + *P. fluorescens* (T7) y *S. proteamaculans* + *S. proteamaculans* + *S. grimesii* + *P. fluorescens* (T8) son los tratamientos que se asemejan al precio de 200.00 MXN, mientras que los demás tratamientos se acercan al tamaño promedio correspondiente al precio de 280.00 MXN, por lo cual, se ve representado el efecto de los tratamientos biológicos en el precio de venta del producto, y un posible efecto benéfico en la economía de los productores y cadena productiva del fruto.

El consumo de la nuez de castilla a nivel mundial es de forma deshidratada, siendo China, India y E.E.U.U. (California) los de mayor producción y comercialización de la nuez. En México, específicamente en Puebla, el fruto se utiliza de manera fresca en la preparación del chile en nogada. La nuez se cultiva en diferentes municipios del estado, pero San Nicolás de los Ranchos fue de los primeros en vender el fruto sin la cascara, con base en la demanda comercial. El municipio es de los de mayor producción en el estado teniendo exportaciones a todo el Estado de Puebla, Estado de México y Oaxaca, mientras que otra parte de la población de la región cultiva la nuez para autoconsumo (Luna Méndez *et al.*, 2016).

Méndeza *et al.*, (2016) realizaron un estudio de mercado de la nuez de castilla en la ciudad de Puebla, demostraron que los consumidores y comerciantes le dan un valor agregado económico a ciertos estándares de calidad de la nuez como lo es el sabor, frescura y el tamaño, además de apoyar la producción local y obtener frutos libres de agroquímicos y favorecer el rendimiento del nogal.

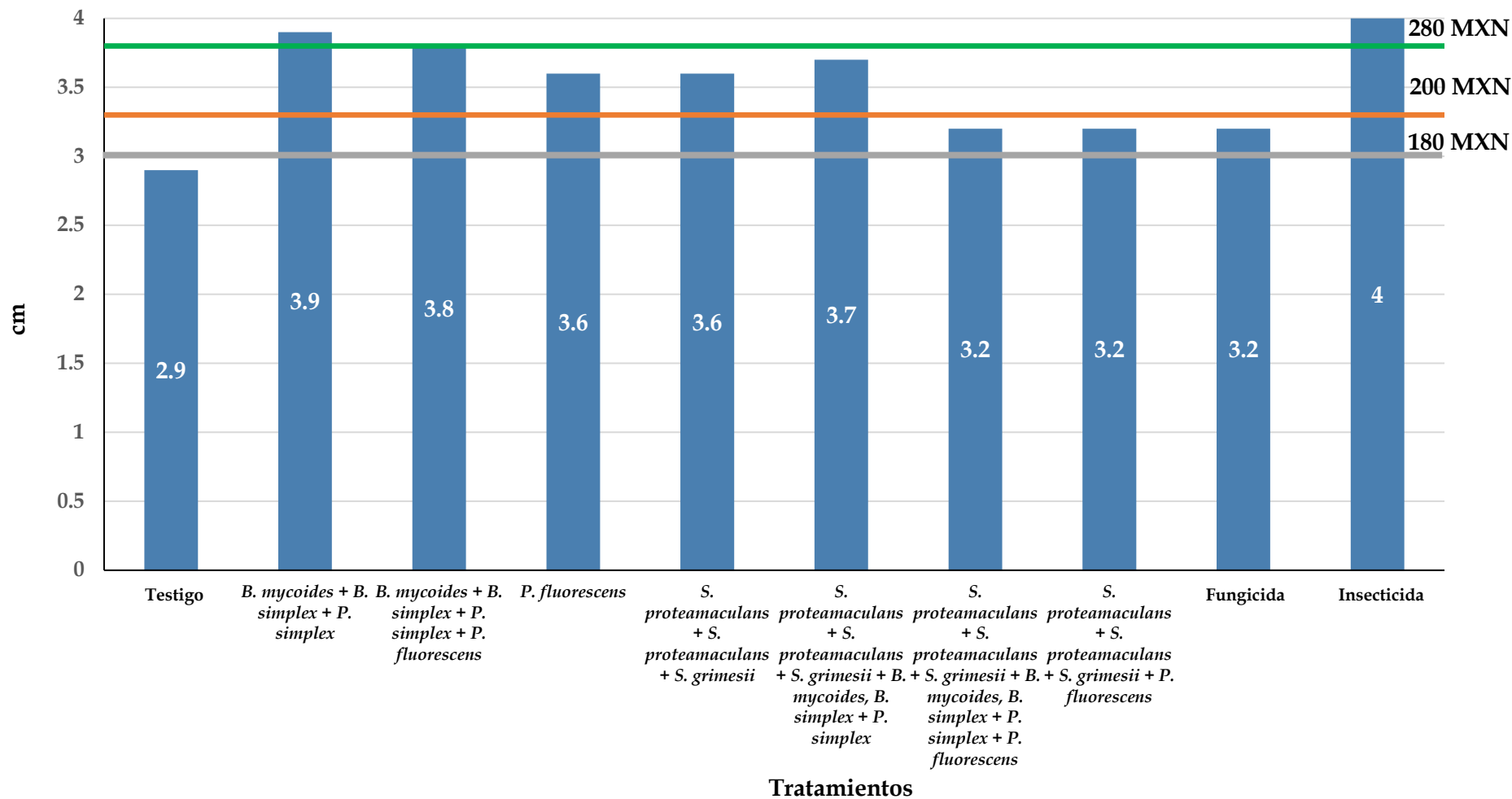


Figura 16. Efecto del tratamiento sobre el tamaño y precio en el mercado de la nuez.

## 11. CONCLUSIONES.

Se aislaron hongos asociados al nogal de los cuales *A. alternata*, *F. oxysporum* y *N. nonquaesitum* han sido reportados anteriormente como patógenos de *J. regia* L. causantes de manchas en las hojas y afectando la producción de la nuez. El control biológico ayudo a disminuir los efectos de los hongos *in vitro* y favoreció el desarrollo del fruto en campo, que a su vez podría generar un beneficio a la salud de los árboles y un beneficio económico para los fruticultores. En cuanto al resto de los hongos identificados, se desconoce su patogenicidad ante el nogal, por lo que se requiere de estudios donde se identifique sus afectaciones.

La aplicación de bacterias para el control biológico con bacterias productores de quitinasas tuvo efectos positivos al reducir los daños ocasionados en folíolos por hongos y redujo la población de la plaga de la mosca de la fruta.

Se logro identificar 3 especies de la mosca de la fruta en estado adulto (*Drosophilla* sp., *D. longicornis* y *Bactrocera zonata*) y 2 en estado larval (*Rhagoletis completa* y *Bactrocera zonata*). Las moscas adultas son conocidas por ser una plaga oportunista de diferentes cultivos y en estado larval *R. completa* es el insecto mayormente reconocido en la nuez de castilla. De manera general, los tratamientos con bacterias disminuyeron la presencia de la mosca adulta en los árboles del nogal, pero la aplicación de los cuatro géneros bacterianos *Bacillus*, *Peribacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* fue el más significativo.

Los tratamientos químicos (insecticida y fungicida) ayudaron al control de hongos y mosca de la fruta en sus respectivos tratamientos. En este estudio se demostró que el control biológico tiene el mismo o mejor resultado que los plaguicidas ante hongos patógenos y la mosca de la fruta, además de:

Favorecer el desarrollo del nogal, al aumentar el área foliar, tamaño y masa del fruto, índices indirectos de la producción de la nuez de castilla y de la economía de los fruticultores.

## **12. PERSPECTIVAS**

El control biológico fue efectivo para reducir los daños provocados por hongos asociados en los árboles, además de reducir la incidencia de la mosca de la fruta en el tratamiento de la combinación de las cuatro cepas bacterianas, pese a ello, se recomienda la continuidad de las aplicaciones foliares al inicio de la primavera durante la floración y crecimiento vegetativo, y simultáneamente aumentando la presencia de las bacterias quitinolíticas y evaluar posteriormente para monitorear el efecto de los tratamientos en un plazo mayor de tiempo y así disminuir la incidencia de daños en los foliolos.

### 13. REFERENCIAS

- Abdullah, R. R., Sukar, N. A., & Ghanim, N. M. (2014). Improving the efficiency of *Bacillus thuringiensis* against insects of different feeding habits by plasmid transfer technique. *Life Sci J*, 11, 308-18.
- Alemneh, A. A., Cawthray, G. R., Zhou, Y., Ryder, M. H., & Denton, M. D. (2021). Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. *Archives of Microbiology*, 203, 3825-3837. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02364-w>
- Alexander, B. J. R., & Stewart, A. (2001). Glasshouse screening for biological control agents of *Phytophthora cactorum* on apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(3), 159-169. <https://doi.org/10.1080/01140671.2001.9514174>.
- Arzanlou, M., & Narmani, A. (2015). ITS sequence data and morphology differentiate *Cytospora chrysosperma* associated with trunk disease of grapevine in northern Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 55(2), 117.
- Aparicio-Del Moral, Y. M., Huerta-de la Peña, A., Dzul-Cauich, J. F., & Hernández-Ortiz, V. (2015). Fluctuación Poblacional de Adultos de *Rhagoletis zoqui* en Nogal de Castilla (*Juglans regia* L.) en Puebla, México. *Southwestern Entomologist*, 40(2), 409-418. <https://doi.org/10.3958/059.040.0214>
- Badr, A. M. (2020). Organophosphate toxicity: Updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(21), 26036-26057. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08937-4>
- Baliyan, N., Dhiman, S., Dheeman, S., Kumar, S., Arora, N. K., & Maheshwari, D. K. (2022). Optimization of gibberellic acid production in endophytic *Bacillus cereus* using response surface methodology and its use as plant growth regulator in chickpea. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(7), 3019-3029. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10492-2>

- Berdugo, S. E. B. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 7(1), 123-132.  
<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/706>
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 27, 30-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>
- Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., & Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73, 106-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.011>
- Carey, J. R., Papadopoulos, N., & Plant, R. (2017). The 30-year debate on a multi-billion-dollar threat: tephritid fruit fly establishment in California. *American Entomologist*, 63(2), 100-113.  
<https://doi.org/10.1093/ae/tmx036>
- Carrillo Leonor (2003). Hongos. Microbiología Agrícola. Capítulo 7  
<http://www.bio-nica.info/biblioteca/Carrillo2003Hongos.pdf>
- Çiçek-Polat, D. (2022). *Juglans regia* L. In *Novel Drug Targets With Traditional Herbal Medicines: Scientific and Clinical Evidence* (pp. 347-357). Cham: Springer International Publishing.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-07753-1\\_23](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-07753-1_23)
- CONAC (2021). Enciclopedia de Municipios y Delegaciones de México, Estado de Puebla, San Nicolás de los Ranchos.  
[https://sannicolasdelosranchos.gob.mx/transparencia/CONAC/2021/ART\\_77/XLVIII/San\\_Nicolas\\_de\\_los\\_ranchos.pdf](https://sannicolasdelosranchos.gob.mx/transparencia/CONAC/2021/ART_77/XLVIII/San_Nicolas_de_los_ranchos.pdf)
- Chen, S., Morgan, D. P., Hasey, J. K., Anderson, K., & Michailides, T. J. (2014). Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California.

- Plant disease, 98(5), 636-652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>.
- Chen, R. Y., Zhang, J. H., Cheng, J., Zheng, C. X., Li, W. H., & Wang, Y. C. (2017). Leaf spot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) caused by *Curvularia trifolii* in Guizhou Province of China. *Plant Disease*, 101(8), 1549. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1326-PDN>.
- Choub, V., Ajuna, H. B., Won, S. J., Moon, J. H., Choi, S. I., Maung, C. E. H., & Ahn, Y. S. (2021). Antifungal activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and growth promotion of walnut (*Juglans regia* L.) trees. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10438. <https://doi.org/10.3390/ijms221910438>.
- Dar, G. H., SOFI, S., Padder, S. A., & Kabli, A. (2018). Molecular characterization of rhizobacteria isolated from walnut (*Juglans regia*) rhizosphere in Western Himalayas and assessment of their plant growth promoting activities. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(2), 662-669. DOI: 10.5958/0974-4517.2018.00032.0
- DATAMEXICO (2023). Base de datos San Nicolás de los Ranchos, Puebla. <https://datamexico.org/es/profile/geo/san-nicolas-de-los-ranchos>
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 711-717. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0867-0>.
- Dukare, A. S., Paul, S., Asha, A. D., Nivetha, N., Aggarwal, C., & Divekar, P. (2021). Role of bacterial and fungal chitinases in integrated management of pest and diseases of agro-horticultural crops. *Microbes for Sustainable*

- Insect Pest Management: Hydrolytic Enzyme & Secondary Metabolite-  
Volume 2, 33-57. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67231-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67231-7_2).
- European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S.,  
Bellisai, G., Brancato, A., ... & Villamar-Bouza, L. (2018). Peer review of the  
pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil. *EFSA*  
*Journal*, 16(1), e05126.
- Fang-chun, L. I. U., Shang-jun, X. I. N. G., Hai-lin, M. A., Zhen-yu, D. U., & Bing-  
yao, M. A. (2014). Effects of inoculating plant growth-promoting  
rhizobacteria on the biological characteristics of walnut (*Juglans regia*)  
rhizosphere soil under drought condition. *Yingyong Shengtai Xuebao*,  
25(5).
- FAO (2015). Objetivos del Desarrollo Sostenible.  
<https://www.fao.org/sustainable-development-goals/es/>
- FAOSTAT (2024). Fao.org. Recuperado el 1 de julio de 2024, de  
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Galarza, C. A. R. (2020). Los alcances de una investigación. *CienciAmérica:*  
Revista de divulgación científica de la Universidad Tecnológica  
Indoamérica, 9(3), 1-6.
- Gandev, S. (2007). Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia* L.) and their  
effectiveness in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(6), 683.  
<http://www.agrojournal.org/13/06-08-07.pdf>
- González, J. L. L., Huato, M. A. D., Gaxiola, F. Á., Inzunza, F. P., & Sánchez, G. P.  
Z. (2012). La economía de traspacio como estrategia de supervivencia en  
San Nicolás de los Ranchos, Puebla, México. *Revista de geografía Agrícola*,  
(48-49), 51-62. <https://www.redalyc.org/pdf/757/757307390004.pdf>
- Gutierrez, A. P., Ponti, L., Neteler, M., Suckling, D. M., & Cure, J. R. (2021).  
Invasive potential of tropical fruit flies in temperate regions under climate  
change. *Communications biology*, 4(1), 1141  
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02599-9>.

- Gutiérrez L. (2018). Diagnóstico de la enfermedad fúngica de *Pinus patula* y propuesta de biocontrol en Tetela de Ocampo, Puebla. Repositorio institucional BUAP: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/7835>
- Gutiérrez-Flores, L. M., López-Reyes, L., Mauricio-Gutiérrez, A., Carcaño-Montiel, M., Portillo-Manzano, E., & Gómez-Velázquez, L. (2023). Potential use of bacterial strain in the genus *Serratia* to biocontrol fungal pathogens associated with defoliation on *Pinus patula*. *Biocontrol Science and Technology*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2210276>.
- Hao, W., Li, H., Hu, M., Yang, L., & Rizwan-ul-Haq, M. (2011). Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.10.002>.
- Hernandez-Ortiz, V., Guillén-Aguilar, J. & López, L. (2010). Taxonomía e identificación de moscas de la fruta de importancia económica en América. In: Montoya P., J. Toledo y E. Hernández (eds.), *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, S y G editores, México, D.F. pp. 49-80.
- SADER (2020). Nuez de Castilla, indispensable en esta temporada. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/nuez-de-castilla-indispensable-en-esta-temporada#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20destinan%20%2C008,de%20la%20producci%C3%B3n%20total%20nacional>
- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta.
- Iannamico, L. A. (2009). *El cultivo del nogal en climas templado-fríos*. Ediciones INTA. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/13312>
- Islam, A. M., & Widhalm, J. R. (2020). Agricultural uses of juglone: Opportunities and challenges. *Agronomy*, 10(10), 1500. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101500>.

- Jayaraman, S., Naorem, A. K., Lal, R., Dalal, R. C., Sinha, N. K., Patra, A. K., & Chaudhari, S. K. (2021). Disease-suppressive soils—beyond food production: a critical review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 1437-1465. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00451-x>.
- Khadka, R. B. (2016). First report of *Curvularia trifolii* causing leaf spot on *Trifolium alexandrinum* (Berseem Clover) in Nepal. *Plant Disease*, 100(6), 1246-1246.
- Khan, A. A., & Kundoo, A. A. (2018). Pests of walnut. *Pests and their management*, 605-647.
- Lemus, G. (2010). Manuales FIA de apoyo a la formación de recursos humanos para la innovación agraria. *Producción de nueces de nogal. Ministerio de Agricultura de Chile. Salvat Impresores*. Publisher: Fundación para la Innovación Agraria
- Liu, F., Ma, H., Liu, B., Du, Z., Ma, B., & Jing, D. (2023). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the physioecological characteristics and growth of walnut seedlings under drought stress. *Agronomy*, 13(2), 290. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020290>.
- Liu, M., Yang, S., Yang, J., Lee, Y., Kou, J., & Wang, C. (2019). Neuroprotective and memory-enhancing effects of antioxidant peptide from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X19865838. DOI: 10.1177/1934578X19865838
- Lotfi, N., Soleimani, A., Çakmakçı, R., Vahdati, K., & Mohammadi, P. (2022). Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Persian walnut associated with drought stress tolerance. *Scientific Reports*, 12(1), 12725. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16852-6>.
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B. I., Gámiz, A. M., Michailides, T. J., Arquero, O., ... & Agustí-Brisach, C. (2022). Effects of Cultivar Susceptibility, Branch Age, and Temperature on Infection by Botryosphaeriaceae and Diaporthe Fungi on English Walnut (*Juglans*

- regia). *Plant Disease*, 106(11), 2920-2926 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2042-RE>.
- Luna Méndez, N., Jaramillo Villanueva, J. L., & Escobedo Garrido, J. S. (2016). Rentabilidad y competitividad del cultivo de nuez de Castilla en Sierra Nevada-Puebla. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(7), 1625-1638.
- Lugtenberg, B. (2014). Introduction to plant-microbe interactions. In *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture* (pp. 1-2). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_1).
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science*, 253-269. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13).
- Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G., Peña-Venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de biología tropical*, 57(4), 915-927. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s00347442009000400002&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s00347442009000400002&script=sci_arttext)
- Marangi, M. J., Temperini, C. V., Greco, M., Pardo, A. G., & Pose, G. N. (2024). Distribución de *Xanthomonas arboricola* pv. Poblaciones de los grupos de especies juglandis y *Alternaria* asociadas a necrosis apical parda en diferentes estados fenológicos de nogales. *Revista Europea de Patología Vegetal*, 168(1), 83-95. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02730-y>
- Medic, A., Hudina, M., Veberic, R., & Solar, A. (2022). Walnut Husk Fly (*Rhagoletis completa* Cresson), the Main Burden in the Production of Common Walnut (*Juglans regia* L.). In *Advances in Diptera-Insight, Challenges and Management Tools*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.106046

- Mehdi, M. M., Layqat, M., & Majid, S. (2020). Biomolecular alterations by chronic sub-lethal exposure of Malathion and Paraquat in *Drosophila melanogaster*: study on pesticide tolerance in insects. *International journal of tropical insect science*, 40, 869-876.
- Mehdi, M. M., Layqat, M., & Majid, S. (2020). Biomolecular alterations by chronic sub-lethal exposure of Malathion and Paraquat in *Drosophila melanogaster*: study on pesticide tolerance in insects. *International journal of tropical insect science*, 40, 869-876.
- Méndeza, N. L., Villanueva, J. L. J., & Juárez, J. R. (2016). Factores explicativos de la disposición a pagar por atributos culturales en nuez de Castilla.
- Mohni, C., Pelleri, F., & Hemery, G. E. (2009). The modern silviculture of *Juglans regia* L.: a literature review. *Die Bodenkultur*, 60(3), 19-32. [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/86969935/poster\\_juglans\\_regia-libre.pdf](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/86969935/poster_juglans_regia-libre.pdf)
- Mulla, S. I., Ameen, F., Talwar, M. P., Eqani, S. A. M. A. S., Bharagava, R. N., Saxena, G., ... & Ninnekar, H. Z. (2020). Organophosphate pesticides: impact on environment, toxicity, and their degradation. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management*, 265-290. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-1891-7\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-1891-7_13)
- Nabavi, S. F., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Mahmoudi, M., & Rad, S. K. (2011). Biological activities of *Juglans regia* flowers. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 465-470. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000092>.
- Naqvi, S. I. Z., Kausar, H., Afzal, A., Hashim, M., Mujahid, H., Javed, M., ... & Anjum, S. (2023). Antifungal Activity of *Juglans-regia*-Mediated Silver Nanoparticles (AgNPs) against *Aspergillus-ochraceus*-Induced Toxicity in In Vitro and In Vivo Settings. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(4), 221. <https://doi.org/10.3390/jfb14040221>.

- OMS (2022). Naturaleza, biodiversidad y salud: UNA DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS INTERCONEXIONES. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/352803/WHO-EURO-2022-5186-44950-63965-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- OMS (2022). Residuos de plaguicidas en los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
- O'Brien, P.A. (2017). Control biológico de las enfermedades de las plantas. *Planta de Australasia Pathol.* **46**, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Pardatscher, R., & Schweigkofler, W. (2009). Microbial biodiversity associated with walnut *Juglans regia* L. in south Tyrol (Italy). *Mitt Klosterneuburg*, 59, 17-23.
- Parween, T., Jan, S., Mahmooduzzafar, S., Fatma, T., & Siddiqui, Z. H. (2016). Selective effect of pesticides on plant – A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(1), 160-179. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.787969>
- Pereyra, L. E. (Ed.). (2020). *Metodología de la investigación*. Klik.
- Plá, I., García de Oteyza, J., Tur, C., Martínez, M. Á., Laurín, M. C., Alonso, E., ... & Dalmau, V. (2021). Sterile insect technique programme against Mediterranean fruit fly in the Valencian community (Spain). *Insects*, 12(5), 415. <https://doi.org/10.3390/insects12050415>.
- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in microbiology*, 7, 216209. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>.
- Rodríguez-Pedroso, AT, Ramírez-Arrebato, MA, Rivero-Gonzalez, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, LL, & Bautista-Banos, S. (2009). Propiedades

químico-estructurales y actividad biológica del quitosano sobre microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15 (3), 307-317.

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2009000500012#:~:text=La%20quitina%20es%20el%20pol%C3%ADmero,los%20desechos%20de%20los%20crust%C3%A1ceos.](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000500012#:~:text=La%20quitina%20es%20el%20pol%C3%ADmero,los%20desechos%20de%20los%20crust%C3%A1ceos.)

Rull, J., Aluja, M., Tadeo, E., Guillen, L., Egan, S., Glover, M., & Feder, J. L. (2013). Distribution, host plant affiliation, phenology, and phylogeny of walnut-infesting *Rhagoletis* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110(4), 765-779. <https://doi.org/10.1111/bij.12157>

San Martín, J., Lagos, M. J., Ruiz, B., Figueroa, I., Vargas, M., Vega, Y., & Moya-Elizondo, E. A. (2023). Understanding the association of apical necrosis in flowers and fruits of walnut (*Juglans regia* L.) with causal microorganisms under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 166(4), 445-462. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-019-0621-0>.

SADER (2020). Nuez de Castilla, indispensable en esta temporada. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/nuez-de-castilla-indispensable-en-esta-temporada#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20se%20destinan%201%2C008,de%20la%20producci%C3%B3n%20total%20nacional>

Sadeghnezhad, R., Enayati, A., Ebrahimzadeh, M. A., Azarnoosh, M., & Fazeli-Dinan, M. (2020). Toxicity and anti-feeding effects of walnut (*Juglans regia* L.). Extract on *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(01), 325-331.

Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science*

and *Technology*, 22(8), 855–872.  
<https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.  
<https://doi.org/10.3390/biology10060475>.

SENASICA (2015). Campaña Nacional Contra Moscas de la Fruta, 252

Sidhu, G. K., Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., & Singh, J. (2019). Toxicity, monitoring and biodegradation of organophosphate pesticides: a review. *Critical reviews in environmental science and technology*, 49(13), 1135-1187. DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1565554>

Sofi, S., & Dar, G. H. (2018). *In vitro* bioefficacy of rhizobacteria, isolated from walnut (*Juglans regia* L.) rhizosphere in north-western Himalayas, against five fungal phytopathogens. *Applied Biological Research*, 20(3), 234-243. DOI: 10.5958/0974-4517.2018.00032.0.

Taha, N. A., & Al-wadaan, M. A. (2011). Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A. *African Journal of Microbiology Research*, 5(32), 5796-5805. DOI: 10.5897/AJMR11.610

Tao, H., Fang, C., Xiao, Y., & Jin, Y. (2024). The toxicity and health risk of chlorothalonil to non-target animals and humans: A systematic review. *Chemosphere*, 142241.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142241>.

Temperini, C. V., Pardo, A. G., & Pose, G. N. (2017). First report of apical necrosis in walnut cultivars from Northern Argentinean Patagonia. Longdom Publishing; *Journal of Plant Pathology and Microbiology*; 8; 7; 7-2017; 1-6  
DOI: 10.4172/2157-7471.1000414

Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl\_1), 487-511. DOI: [https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl\\_1.487](https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487).

- White, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*/Academic Press, Inc.
- Wyckhuys, K. A., Lu, Y., Morales, H., Vázquez, L. L., Legaspi, J. C., Eliopoulos, P. A., & Hernández, L. M. (2013). Estado actual y potencial del control biológico de conservación para la agricultura en el mundo en desarrollo. *Control Biológico*, 65(1), 152-167.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.010>
- Xu, X. L., Wang, F., Liu, C., Yang, H., Zeng, Z., Wang, B., ... & Yang, C. (2022). Morphology and phylogeny of ascomycetes associated with walnut trees (*Juglans regia*) in Sichuan province, China. *Frontiers in Microbiology*, 13. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1016548](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1016548)
- Yousef, N. M. (2018). Capability of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of Biological Research*, 8(4), 174-182.  
<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1412796>.
- Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., & Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 22(7), 882-895.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.13068>.

## 14. ANEXOS

### 14.1 Glosario

**Antagonismo.** - Interacción biológica en la que un organismo inhibe o perjudica a otro.

En ecología, puede referirse a plantas que liberan sustancias químicas que impiden el crecimiento de otras plantas. En microbiología, describe a microorganismos que producen compuestos que inhiben a otros microorganismos.

**Bacteria.** - Organismo unicelular microscópico que puede tener diversas formas (esférica, en bastón, espiral) y que se encuentra en casi todos los hábitats de la Tierra. Las bacterias pueden ser beneficiosas, como las que participan en la descomposición de materia orgánica, o patógenas, causando enfermedades.

**Bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR).** - Bacterias que colonizan las raíces de las plantas y promueven su crecimiento mediante diversos mecanismos, como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fósforo y el control de patógenos.

**Bacteria quitinolítica.** - Es un microorganismo que tiene la capacidad de descomponer la quitina, un polisacárido que se encuentra en las paredes celulares de los hongos, los exoesqueletos de los artrópodos y otros organismos.

**Control biológico.** - Método de manejo de plagas y enfermedades que utiliza organismos vivos para reducir las poblaciones de organismos perjudiciales. Ejemplos incluyen el uso de depredadores, parasitoides, o patógenos naturales de las plagas.

**Contaminación.** - Introducción de sustancias o agentes nocivos al ambiente, lo cual puede causar daño a los ecosistemas, la salud humana y otros organismos. Puede ser de origen químico, físico o biológico.

**Fitohormonas.** - Sustancias químicas naturales producidas por las plantas que regulan su crecimiento, desarrollo y respuestas a estímulos ambientales. También conocidas como hormonas vegetales, las principales fitohormonas incluyen auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, y etileno. Cada tipo de fitohormona tiene funciones específicas, como la promoción del crecimiento celular, la regulación de la floración, la maduración de frutos, y la respuesta al estrés ambiental.

**Hongos fitopatógenos.** - Hongos que causan enfermedades en las plantas. Estos organismos invaden tejidos vegetales y pueden provocar síntomas como manchas foliares, pudrición de raíces, marchitamiento y muerte de las plantas afectadas.

**Mosca de la fruta.** - Insecto perteneciente a la familia Tephritidae o Drosophilidae, cuyas larvas se desarrollan en frutas y vegetales, causando daños significativos en cultivos agrícolas.

**Plaga.** - Es una población de organismos que causa daños económicos, sanitarios o ecológicos a cultivos, animales, seres humanos, bienes materiales o ecosistemas. Las plagas pueden ser insectos, animales, plantas, hongos, bacterias o virus que se reproducen rápidamente y se propagan ampliamente, a menudo de manera descontrolada.

**Plaguicida.** - Sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Incluye insecticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, entre otros.

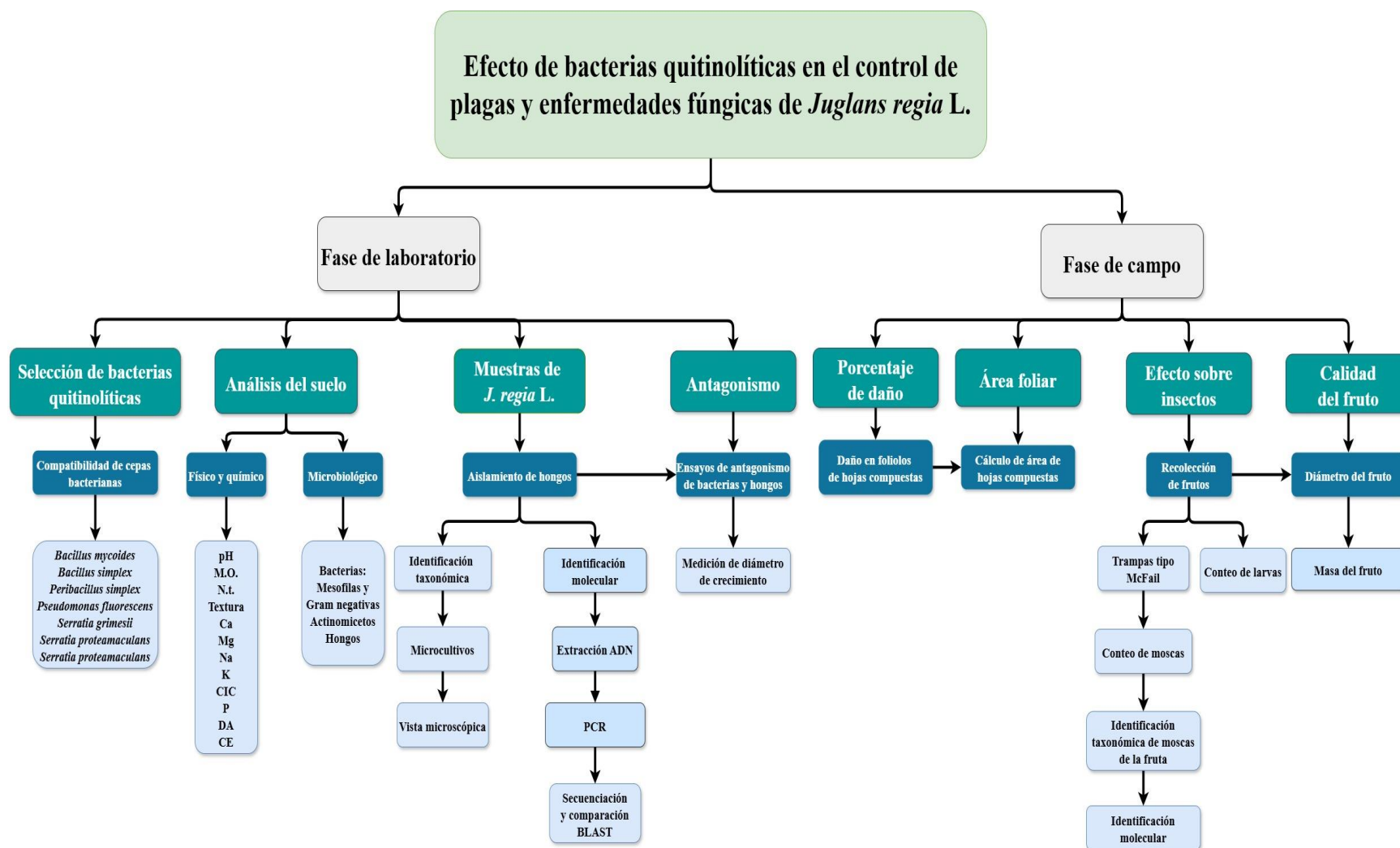
**Quitinasas.** - Enzimas que degradan la quitina, un componente principal de los exoesqueletos de insectos y las paredes celulares de hongos. Son utilizadas por plantas y microorganismos para defenderse de hongos patógenos y plagas.

**Saprophyto.** - Un saprófito es un organismo que obtiene sus nutrientes y energía descomponiendo materia orgánica muerta o en descomposición. Este proceso

ayuda a reciclar nutrientes en el ecosistema. Los saprófitos incluyen bacterias, hongos y algunos protozoos.

**Suelo.** - Capa superficial de la Tierra compuesta por minerales, materia orgánica, agua y aire, que proporciona soporte y nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. El suelo es un ecosistema complejo que alberga numerosos organismos y juega un papel crucial en el ciclo de nutrientes y el almacenamiento de agua.

## 14.2 Diagrama general de materiales y métodos.



### 14.3 Curva de calibración de producción de indoles conforme del ácido indon-3-acético.

