

Estudio de *Bacillus subtilis* en frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en precosecha y su efecto en las propiedades fisicoquímicas en postcosecha.

Effect of *Bacillus subtilis* applied on soursop fruits (*Annona muricata* L.) in pre-harvest and its effect on physico-chemical properties in post-harvest.

Aguilera-Aguirre, S.¹ , Aldape-Santoyo, J.F.¹, Abraham-Juárez, M.R.² ,
Montalvo-González, E.¹ , Basurto-Ortiz, R.I.¹ , Chacón-López, M.A.^{1*} 

¹ TecNM- Instituto Tecnológico de Tepic, Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos/Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Tecnológico 2595, Col. Lagos del Country. CP, 63175, Tepic, Nayarit, México.

² Departamento de Alimentos. División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca. Ex-Hda. "El Copal", Km 9 carretera Irapuato-Silao, A.P. 311, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo:

Aguilera-Aguirre, S., Aldape-Santoyo, J.F., Abraham-Juárez, M.R., Montalvo-González, E., Basurto-Ortiz, R.I., Chacón-López, M.A. (2025). Effect of *Bacillus subtilis* applied on soursop fruits (*Annona muricata* L.) in pre-harvest and its effect on physico-chemical properties in post-harvest.

Revista Bio Ciencias, 12, e1768. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1768>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 30th 2024.

Accepted/Aceptado: April 28th 2025.

Available on line/Publicado: May 05th 2025.

RESUMEN

La guanábana es un fruto climatérico altamente perecedero, lo que limita su comercialización y es por ello, que se buscan estrategias para prolongar su vida de anaquel. Considerando esto, el objetivo de esta investigación fue probar el efecto de un consorcio bacteriano de tres cepas de *Bacillus subtilis* aplicado en precosecha para evaluar los parámetros de calidad de los frutos en etapa postcosecha. Se seleccionaron diferentes etapas de desarrollo del fruto en el árbol para la aplicación (4, 8 y 12 semanas post-antesis), además de los frutos en madurez fisiológica ya cosechados. Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de firmeza, acidez titulable, pH, sólidos solubles totales de acuerdo con los protocolos de la AOAC. También se evaluó la expresión del gen que codifica para la enzima polilactonasa. Los resultados revelaron que el consorcio bacteriano tiene un efecto positivo en prolongar la vida de anaquel cuando se aplica en precosecha a las 12 semanas de desarrollo del fruto. Este estudio revela que es fundamental la selección de la etapa del desarrollo del fruto para lograr efectos positivos mediante la aplicación *B. subtilis* sobre la calidad de frutos con corta vida de anaquel como la guanábana.

PALABRAS CLAVE: *Annona muricata*, consorcio bacteriano, precosecha, postcosecha, vida útil.

*Corresponding Author:

Martina Alejandra Chacón-López. TecNM- Instituto Tecnológico de Tepic, Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos. Av. Tecnológico 2595, Col. Lagos del Country. CP, 63175, Tepic, Nayarit, México. Teléfono: (311) 211 9400.

E-mail: mchacon@tecnicm.mx

ABSTRACT

Soursop is a highly perishable climacteric fruit, which limits its commercialization, thus, strategies are being sought to extend its shelf life. With this focus, this research aimed to test the effect of a bacterial consortium of three *Bacillus subtilis* strains applied in pre-harvest to evaluate the fruit quality parameters in the post-harvest stage. Different stages of fruit development on the tree were selected for application (4, 8, and 12 weeks post-anthesis), in addition to fruit at physiological ripeness already harvested. The physicochemical parameters of firmness, titratable acidity, pH, and total soluble solids were evaluated according to AOAC protocols. The expression of the gene coding for the polygalacturonase enzyme was also assessed. The results revealed that the bacterial consortium positively affects shelf life when applied pre-harvest at 12 weeks of fruit development. This study shows that the selection of the stage of fruit development is fundamental to achieving positive effects through the *B. subtilis* application on the quality of fruits with short shelf life, such as soursop.

KEY WORDS: *Annona muricata*, bacterial consortium, pre-harvest, post-harvest, shelf life.

Introducción

El cultivo de la guanábana (*Annona muricata* L.) es originario de México y Centro América (Nugraha *et al.*, 2021). De acuerdo con los registros del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), para el 2019, la producción de guanábana en México ascendió a 30,790 t anuales. Los principales estados productores son: Nayarit, con una producción de 23,230 t; seguido por Colima con 2,832 t y Michoacán, con 2,781 t. A nivel nacional se siembra una superficie de 3,612 ha, lo que se refleja en un valor de producción de \$248,170.00 (SIAP, 2019). Los frutos de guanábana son apreciados por su pulpa comestible, la cual tiene una textura suave y fibrosa con un sabor agri dulce. Posee un alto contenido de nutrientes y compuestos bioactivos que pueden aportar beneficios a la salud humana. Adicionalmente, el fruto de guanábana tiene un gran potencial para el desarrollo de diversos productos alimenticios (Villarreal-Fuentes *et al.*, 2020).

El crecimiento de los frutos de guanábana es de tipo doble sigmoide y alcanzan la madurez en un promedio de 160 días posteriores a la antesis. Los frutos se cosechan en el punto de madurez fisiológica, que coincide con su tamaño máximo, la disminución de la firmeza (del epicarpio y de las espinas), y los cambios en el color y atenuación en el brillo del epicarpio (Worrell

et al., 1994). Una vez que se ha llevado a cabo la cosecha, es importante generar y mantener las condiciones de almacenamiento adecuadas, con el fin de preservar la calidad durante el periodo de postcosecha (Jiménez-Zurita et al., 2017).

La maduración de los frutos es un proceso complejo que incluye una serie de eventos genéticamente programados, que desencadenan múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos que alteran su firmeza, color, sabor y textura (Saini et al., 2022). Durante la maduración de los frutos climatéricos, se produce un pico en la producción de etileno que regula la expresión de genes que codifican proteínas que modifican la pared celular, provocando el ablandamiento. El etileno es una hormona esencial, ya que coordina los procesos de maduración, así como también activa enzimas que degradan la pared celular, provocando el ablandamiento del fruto. La guanábana al ser un fruto climatérico, posee una tasa alta de respiración y de producción de etileno, por lo que tiene un proceso de ablandamiento acelerado que reduce la vida de anaquel durante la postcosecha (Berumen-Varela et al., 2019). Precisamente, la corta vida útil postcosecha de la guanábana es una de las principales limitantes en la exportación, por lo que mantener la calidad y retrasar la maduración del fruto es de gran importancia. Entre las operaciones de manejo postcosecha de frutos de guanábana se destacan la refrigeración entre 12 a 15 °C, el secado de humedad residual, la aplicación de recubrimientos y la aplicación de compuestos químicos que reduzcan la producción de etileno (Moreno-Hernández et al., 2014).

También se ha explorado el uso de recursos bióticos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), que representan una alternativa para proteger a los cultivos y prolongar la calidad de frutos durante la precosecha y postcosecha (de Andrade et al., 2023; Saebi et al., 2023). *Bacillus subtilis* es una de las PGPR más estudiadas; esta bacteria es capaz de promover el crecimiento de las plantas y controlar fitopatógenos a través de diversos mecanismos como la solubilización de fósforo en suelo, la fijación biológica de nitrógeno, la síntesis de antimicrobianos, la producción de la fitohormona indol-3-acético (IAA) y la disminución de los niveles de etileno en plantas (Shahid et al., 2023). Originalmente, *B. subtilis* solo estaba asociada con la promoción del crecimiento vegetal (Blake et al., 2021), pero cada vez hay más evidencias de que la aplicación de estas bacterias en la etapas de postcosecha, puede modificar la actividad fisiológica y la salud general de los frutos (Martínez-Jaime et al., 2019). Cabe mencionar que la mayoría de los estudios se han enfocado en la aplicación de PGPR en la rizósfera de los árboles, o bien, en los frutos cosechados. Para el caso de la guanábana, pocos estudios se han realizado en los que se apliquen PGPR, y dentro de los reportados, el enfoque ha sido las habilidades que poseen las PGPR como agentes de control biológico de fitopatógenos durante la postcosecha (Bautista-Rosales et al., 2022; Guardado-Valdivia et al., 2018).

Hasta el momento no se ha reportado el efecto de la aplicación de alguna PGPR sobre frutos de guanábana durante la precosecha, como parte de un manejo integral de preservación de la calidad de estos frutos una vez que se cosechan, por lo que el objetivo de este trabajo fue aplicar un consorcio de tres cepas de *B. subtilis* sobre frutos de guanábana durante la precosecha y evaluar su efecto sobre las características fisicoquímicas de los frutos en la postcosecha. Adicionalmente, se evaluó el efecto sobre la expresión del gen PG, que codifica para la enzima

poligalacturonasa (PG), involucrada en la pérdida de firmeza y cambios texturales en los frutos.

Material y Métodos

Cepas bacterianas y material biológico

Los árboles de guanábana empleados en el estudio se localizan en la localidad de El Tonino, municipio de Compostela, Nayarit, México. Se eligieron 12 árboles, los cuales fueron seleccionados por no mostrar plagas ni daños físicos, con altura homogénea (entre 6.5 y 7.5 m), de forma cónica, además, los 12 árboles presentaban la misma edad (20 años, de acuerdo con la información proporcionada por el productor). Los árboles contaban con frutos en diferentes fases de desarrollo, estos fueron cosechados al alcanzar la madurez fisiológica en el árbol, lo que se evidenció por el cambio de color del epicarpio del fruto de un verde oscuro brillante a un verde claro mate, además de que las pequeñas espinas blandas que presenta el fruto se van separando conforme logra la madurez fisiológica, así los frutos fueron cosechados conforme a la experiencia e instrucción del productor. Una vez cosechados, los frutos se trasladaron al Laboratorio de Agrobiotecnología y Electroquímica del Instituto Tecnológico de Tepic. El consorcio PGPR se conformó por tres cepas de *B. subtilis* (CBs), nombradas como Bs-05, Bs-16 y Bs-17, las cuales son parte de la colección de recursos microbianos del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Guanajuato, México.

Preparación de la suspensión con el consorcio bacteriano

Cada cepa bacteriana se cultivó en el medio de cultivo Luria-Bertani (Bertani, 1951) a 28 °C por 24 h. Se cosecharon las células bacterianas mediante centrifugación del cultivo a 10,000 rpm por 10 min a 25 °C. Se preparó una suspensión bacteriana con las tres cepas de *B. subtilis* en proporciones equivalentes. Se ajustó la concentración de la suspensión bacteriana a 1×10^7 UFC/mL con agua destilada estéril.

Tratamiento de los frutos en precosecha

Para los tratamientos se seleccionaron tres árboles del grupo de los 12 previamente descrito, y de cada árbol se seleccionaron cinco frutos que se encontraban en la misma etapa de desarrollo. Para este estudio los frutos se clasificaron de la siguiente manera: P1, frutos con 4 semanas de desarrollo posteriores a la antesis; P2, frutos con 8 semanas de desarrollo; P3, frutos con 12 semanas de desarrollo. El pericarpio de los frutos fue asperjado con la suspensión del consorcio bacteriano. Como control, cinco frutos fueron asperjados con agua estéril. Una vez que los frutos fueron alcanzando la madurez fisiológica (PM), se cosecharon y almacenaron a 25 °C. Al sexto día de almacenamiento se tomaron las muestras para realizar los análisis correspondientes. Los frutos tratados con el CBs se identificaron de la siguiente manera: CBs-P1, CBs-P2 y CBs-P3. En la Figura 1 se esquematiza el procedimiento para los tratamientos.

Tratamiento de los frutos en postcosecha

Para el tratamiento postcosecha se seleccionaron tres árboles (del grupo inicial de los 12 elegidos) y de cada árbol se seleccionaron cinco frutos que se encontraban etapa de PM, estos frutos fueron identificados como PMF. Los frutos se cosecharon y posteriormente fueron tratados con el CBs, cabe señalar que a estos frutos no se les aplicó el CBs durante la precosecha. Posteriormente, se almacenaron a 25 °C por 6 días. Al sexto día se llevó a cabo la toma de muestras, para este tratamiento se identificaron como CBs-PMF (Figura 1).

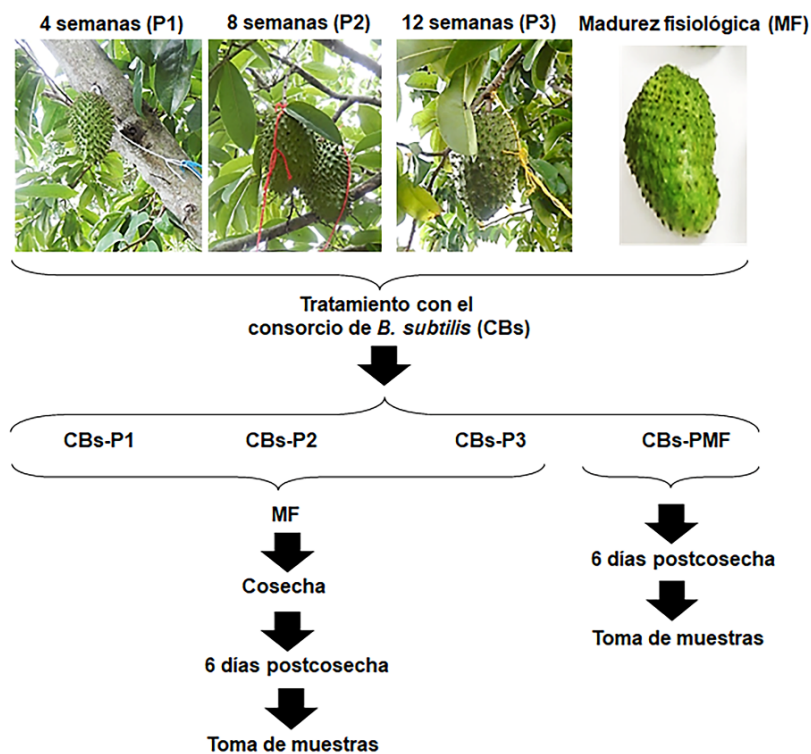


Figura 1. Representación esquemática de los tratamientos aplicados a los frutos de guanábana en diferentes etapas de desarrollo.

Fuente: Elaboración propia a partir de este estudio.

Pérdida fisiológica de peso

Se realizó la evaluación de la pérdida fisiológica de peso (PWL) como se ha reportado previamente (Freitas & Mitcham, 2013). El peso inicial se registró en el primer día de la cosecha

y el peso final se registró al sexto día de la postcosecha. Para esto, se utilizó una báscula digital (Ohaus CT600®, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida fisiológica de peso (% *PWL*) de acuerdo a la Ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1} \quad \% PFP = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso final}} \times 100$$

Análisis de la firmeza

Para la determinación de la firmeza se utilizó un texturómetro (StableMycro Systems®, UK), equipado con una sonda de acero inoxidable de 8 mm de diámetro. La sonda se trabajó a una velocidad de 1 mm/s y se llevó a cabo la prueba de penetración en dos puntos en lados opuestos de la parte media del fruto como se ha reportado previamente (Márquez-Cardozo *et al.*, 2012). Se eligió una distancia de 20 mm de penetración. La firmeza se registró en Newton (N). Todos los análisis fisicoquímicos relacionados con la calidad del fruto se realizaron al sexto día postcosecha, considerando el día 0 como el día en que fueron cosechados.

Análisis de los sólidos solubles totales

La determinación de los sólidos solubles totales (TSS), se realizó a través de la metodología previamente reportada (AOAC, 1990). Las evaluaciones se realizaron en la pulpa de los frutos utilizando un refractómetro (Atago®, USA). Los resultados se reportan en °Brix.

Determinación de la acidez titulable y el pH

La evaluación de la acidez titulable, reportada como % de ácido málico, se realizó a través de la metodología previamente reportada (AOAC, 1990). Se emplearon 5 g de muestra homogeneizada en agua desionizada. La titulación se llevó a cabo con una solución de NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador. Los resultados se obtuvieron utilizando la Ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2} \quad \% \text{ Ácido málico} = \frac{(\text{mL de NaOH})(N \text{ del NaOH})(\text{meq. Ácido málico})}{g \text{ de muestra}} \times 100$$

El pH de la pulpa de los frutos se determinó utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments®, USA) (AOAC, 1990).

Análisis estadístico

Se sometió a un análisis de varianza de un solo factor, utilizando la comparación de Tukey con nivel de significancia $p \leq 0.05$. Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico Statistica Versión 12.0 (StatSoft®, USA). Se realizaron tres repeticiones empleando cinco frutos para cada repetición.

Extracción de RNA de frutos de guanábana

El método de extracción de RNA total fue de acuerdo a la metodología propuesta por Brasil *et al.*, (2008). Para esto, 600 mg de tejido pulverizado se mezclaron con 1 mL de buffer de

extracción (SDS 0.5 %, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, β -mercaptoetanol 145 mM, Tris-HCl 250 mM) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 min. Posteriormente se incubó a 60 °C por 15 min, con agitación constante. Inmediatamente después se transfirió a un baño de hielo-agua durante 10 min. Se adicionaron 0.15 mL de acetato de potasio 5 M frío, se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm por 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó y se recuperó la pastilla. Se resuspendió en 100 μ L de agua desionizada. Para purificar las muestras de RNA se utilizó el kit comercial Pure Link RNA Mini Kit (Ambion®, USA), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación del RNA obtenido y se determinó la calidad e integridad del mismo. Las muestras de RNA fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Se utilizó un fotodocumentador (BioRad®, USA) para visualizar las muestras de RNA en el gel. La cuantificación del RNA se llevó a cabo utilizando el Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific®, USA).

Análisis de la expresión genética

Se analizó la expresión del gen que codifica para la enzima PG en los frutos tratados con el consorcio bacteriano. La toma de muestras para analizar la expresión genética se llevó a cabo a los 10 días posteriores a la aplicación del CBs. Como control, se analizó la expresión del gen PG en frutos sin tratamiento bacteriano. Para amplificar un fragmento del gen que codifica para la PG de guanábana, se diseñaron los oligonucleótidos PGf (5'-TGCTTGAAAGATGCTTG-3') y PGr (5'-GCAGTATGCCATCAACCTGA-3'), que amplifican un fragmento de 134 pb. Como control endógeno de expresión constitutiva, se diseñaron los oligonucleótidos ACTf (5'-ACGAGCTGTTTCCCTAGCA-3') y ACTr (5'-TCTTTTGGATTGAGCCTCGT-3') que amplifican un fragmento de 593 pb del gen ACT, que codifica para la actina.

Se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes mediante la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés, *Reverse Transcription-Polymerase Reaction Chain*). Para esto se utilizó el kit comercial SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen®, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para las reacciones se emplearon 170 ng de RNA total purificado. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Select cycler (Select Bio Products®, USA) de acuerdo a las siguientes condiciones de amplificación. 50°C por 30 min; 94 °C por 2 min. Posteriormente, 94 °C por 15 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 35 ciclos. Finalmente 72 °C por 10 min, 1 ciclo. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis para su evaluación.

Análisis semicuantitativo de la expresión génica

Para realizar el análisis semicuantitativo de la expresión genética, se utilizó el software ImageJ 1.54d para determinar los valores de densidad de los amplicones obtenidos mediante PCR y visualizados en la imagen del gel de electroforesis (Antibong et al., 2016). Se configuraron y establecieron las medidas para el análisis y se marcó la densidad integrada. Se determinaron las intensidades totales de píxeles (RawIntDen) para cada imagen de la banda correspondiente al

producto de PCR. RawIntDen es la suma de los valores de píxeles de las imágenes. Se determinó el error estándar de la media de tres ensayos independientes.

Resultados y Discusión

Pérdida fisiológica de peso

Los frutos sufren la pérdida de agua en forma de vapor (transpiración) después de ser cosechados. Esto es un factor determinante en la pérdida fisiológica del peso (PWL) del fruto lo cual está relacionado con los procesos fisiológicos de transpiración y respiración, que inciden en su consistencia, calidad y valor comercial (Lufu *et al.*, 2020). En la Figura 2A se observa que la aplicación del CBs sobre la superficie de los frutos, particularmente en aquellos donde el consorcio se aplicó en precosecha a las 12 semanas de desarrollo (CBs-P3), disminuyó de manera significativa la PWL, comparada con el control y con los frutos CBs-P1 y CBs-P2. La velocidad de la transpiración está estrechamente relacionada con la integridad de la estructura de la pared celular (Rossi *et al.*, 2022). En este sentido, el tratamiento con el consorcio bacteriano sobre los frutos CBs-P3, probablemente fortaleció algunas estructuras como la cutícula, evitando daños a la estructura de la pared celular que ocurren durante el proceso de maduración. Por lo tanto, se redujo la transpiración y esto permitió mantener por más tiempo la turgencia en los tejidos. En lo que corresponde a los frutos CBs-PMF, se observó que se comportaron de manera similar al control, indicando que el tratamiento con el consorcio no evitó la PWL en los frutos (Figura 2A). Estos resultados muestran que el tratamiento con el CBs, no logró evitar la PWL cuando se aplicó en los frutos ya cosechados. En un estudio realizado por Viencz *et al.* (2023), aplicaron *B. subtilis* en plátano para el control de antracnosis en etapa de postcosecha y además evaluaron parámetros de calidad como PWL y firmeza, observando que la aplicación del agente de biocontrol en esta etapa no tienen un efecto positivo en la calidad ya que se observó un aumento de la PWL y una disminución de la firmeza del fruto (Viencz *et al.*, 2023).

Firmeza del fruto

La firmeza es un parámetro relacionado con la estructura de la pared celular de los frutos y con su estado de madurez. Este parámetro depende directamente de la turgencia, cohesión, forma y tamaño de las células que conforman la pared celular. La pérdida de la firmeza en los frutos plantea múltiples problemas para la comercialización de la fruta (Wang *et al.*, 2023). Por lo tanto, mantener la firmeza de los frutos es fundamental para preservar su vida de anaquel y la aceptabilidad por parte del consumidor. En este estudio se evaluó el potencial del CBs para mantener la firmeza en los frutos de guanábana. Como resultado se obtuvo que en el tratamiento con el CBs sobre los frutos P3, se tuvieron los valores de firmeza más altos, con una media de 27.82 ± 8.3 N, en comparación con los frutos control que mostraron $2.83 \text{ N} \pm 1.5$. Esta diferencia corresponde a un 89.83 % de más firmeza en los frutos tratados con el CBs (Figura 2B). En los frutos CBs-P1 y CBs-P2, también se mantuvieron más firmes que el control, alcanzando $11.01 \text{ N} \pm 5.1$ y $11.95 \text{ N} \pm 5.5$, respectivamente. Esto puede ser atribuido a la acción de la enzima ACC desaminasa presente en el citoplasma de algunas bacterias, entre ellas *B. subtilis* (Penrose &

Glick, 2003), esta enzima actúa sobre el precursor del etileno (ACC), propiciando una disminución en la producción de esta hormona, la cual estimula el proceso de maduración y el ablandamiento de los frutos climatéricos. Es interesante observar que el periodo de desarrollo de los frutos es determinante en el efecto que ejerce el consorcio bacteriano, la aplicación sobre los frutos con un desarrollo de 12 semanas (CBs-P3), fue la más favorable para mantenerlos más firmes, lo que representa una mayor vida de anaquel y por ende, mayor tiempo para su comercialización. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en las evaluaciones de la PWL sobre los frutos P3. Recientemente, un estudio sobre la aplicación de PGPR en frutos de cereza durante la precosecha, reportó que los frutos tratados con PGPR tuvieron valores de firmeza más altos que los frutos control (Küçüker *et al.*, 2023), de manera similar a lo observado el presente estudio con guanábana. Los frutos CBs-PMF no mostraron diferencia significativa con respecto al control, indicando que el tratamiento bacteriano aplicado en los frutos de guanábana ya cosechados, no tuvo efecto sobre la firmeza (Figure 2B).

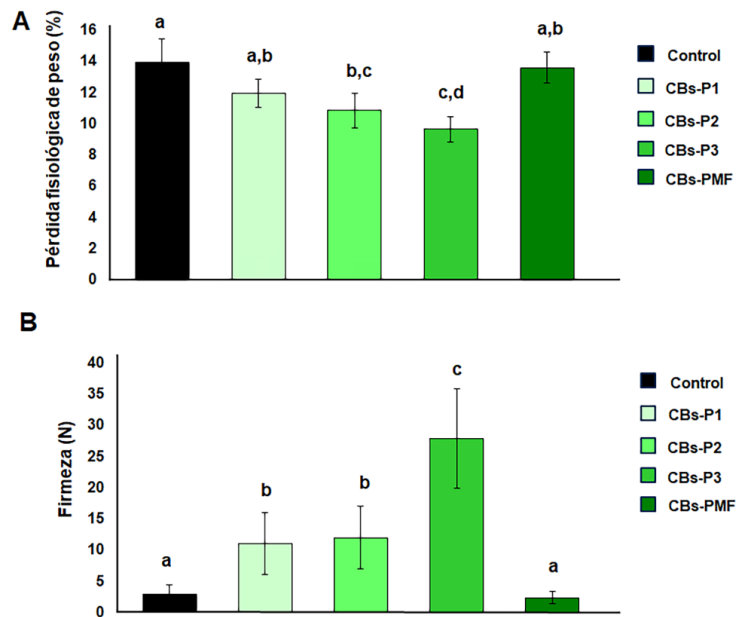


Figura 2. Efecto del consorcio de *B. subtilis* (CBs), aplicado en diferentes periodos de desarrollo del fruto de guanábana, sobre la pérdida fisiológica de peso (A) y la firmeza de los frutos (B) a los 6 días después de ser cosechados.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos. Las líneas en las barras corresponden a la desviación estándar.

Acidez titulable y pH

Durante la maduración, la acidez de la guanábana aumenta debido a un incremento en la concentración de ácidos orgánicos, principalmente de los ácido málico, cítrico y ascórbico (Paull *et al.*, 1983). Esta es una característica particular en el fruto de guanábana que es un fruto con un gusto agridulce, a diferencia de los frutos dulces donde la acidez titulable va disminuyendo conforme al proceso de maduración, Paull *et al.* (1983) reportó que durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana, la concentración de ácido málico llega a incrementarse hasta 7 veces, contribuyendo al equilibrio entre dulzura y acidez, lo que mejora la percepción del sabor y el desarrollo del perfil organoléptico óptimo en el fruto. La acidez se expresa comúnmente en términos del ácido orgánico predominante, que en el fruto de guanábana es el ácido málico (Terán-Erazo *et al.*, 2019). En la Figura 3A se muestran los resultados obtenidos de acidez titulable. Los valores significativamente menores en % de ácido málico se observaron en los frutos CBs-P3, donde se registró una media de 0.55 ± 0.05 %, comparado con el control que mostró una media de 0.79 ± 0.07 %. Considerando que la acidez titulable tiende a aumentar durante la maduración, se sugiere que el tratamiento con el CBs modificó el catabolismo de almidón y carbohidratos durante el proceso de maduración, dando como resultado una reducción en la concentración de ácido málico. En este sentido, el consorcio de *B. subtilis* logró desacelerar el proceso de maduración en los frutos de guanábana en los frutos CBs-P3 y CBs-P2. Los frutos CBs-P1 y CBs-PMF, no mostraron diferencia estadística significativa con respecto al control. Esto indica que el efecto que puede ejercer el consorcio de *B. subtilis* sobre la producción de ácido málico en guanábana, no se logra cuando los frutos se encuentran en etapas tempranas del desarrollo, ni cuando los frutos han sido cosechados (Figura 3A).

Nuestros resultados revelan que es esencial seleccionar la etapa de desarrollo del fruto en la que se llevará a cabo la aplicación de PGPR ya que no se logra el mismo efecto sobre las características fisicoquímicas, observadas en cada etapa de aplicación tanto en precosecha como en poscosecha. Además, es importante evaluar el efecto que las PGPR tienen sobre cada fruto en particular, ya que la respuesta dependerá de las interacciones metabólicas específicas entre el microorganismo y la especie vegetal; por ejemplo, en fresa, la aplicación de PGPR en la raíz de la planta generó un aumento en los valores TSS y de acidez titulable en los frutos, por lo que en este caso, los autores refieren que la aplicación de las PGPR funcionó como un potenciador de la madurez en precosecha (Nam *et al.*, 2023). En arándano, se aplicaron cepas de *B. subtilis* sobre los frutos ya cosechados y esto propició un aumento en la acidez titulable (Martínez-Jaime *et al.*, 2019). Por el contrario, en cereza, la aplicación de PGPR en frutos durante la precosecha, disminuyó la acidez titulable, sugiriendo un atraso en la maduración del fruto (Küçüker *et al.*, 2023). De acuerdo a los resultados de estos estudios se puede observar que el efecto de *Bacillus subtilis* depende de factores como el tipo de fruto y su fisiología, las interacciones metabólicas que se puedan establecer entre la bacteria y el fruto, así como las condiciones ambientales en las que se desarrolló el fruto y el manejo poscosecha. En nuestro estudio, para lograr un efecto en la extensión de la vida de anaquel mediado por la aplicación de PGPR en guanábana, resultó más efectivo llevar a cabo la aplicación durante la precosecha a las 12 semanas de desarrollo de los frutos post-antesis.

En lo que corresponde al pH, en guanábana se ha determinado que tiende a disminuir conforme avanza el proceso de maduración, lo cual está relacionado con el incremento en la síntesis de los ácidos orgánicos (Espinoza et al., 2013). En los frutos CBs-P3 no se observó esa disminución de pH comparado con el control (Figura 3B), lo que es acorde a lo observado en las evaluaciones de la acidez titulable. Es importante resaltar que, al igual que en las evaluaciones de firmeza y PWL, el efecto diferencial en la acidez titulable y pH se observó en los frutos con 12 semanas de desarrollo en el árbol a los cuales se les aplicó el CBs, y en los que, de acuerdo con los valores de estos parámetros, el proceso de maduración postcosecha se atenúa.

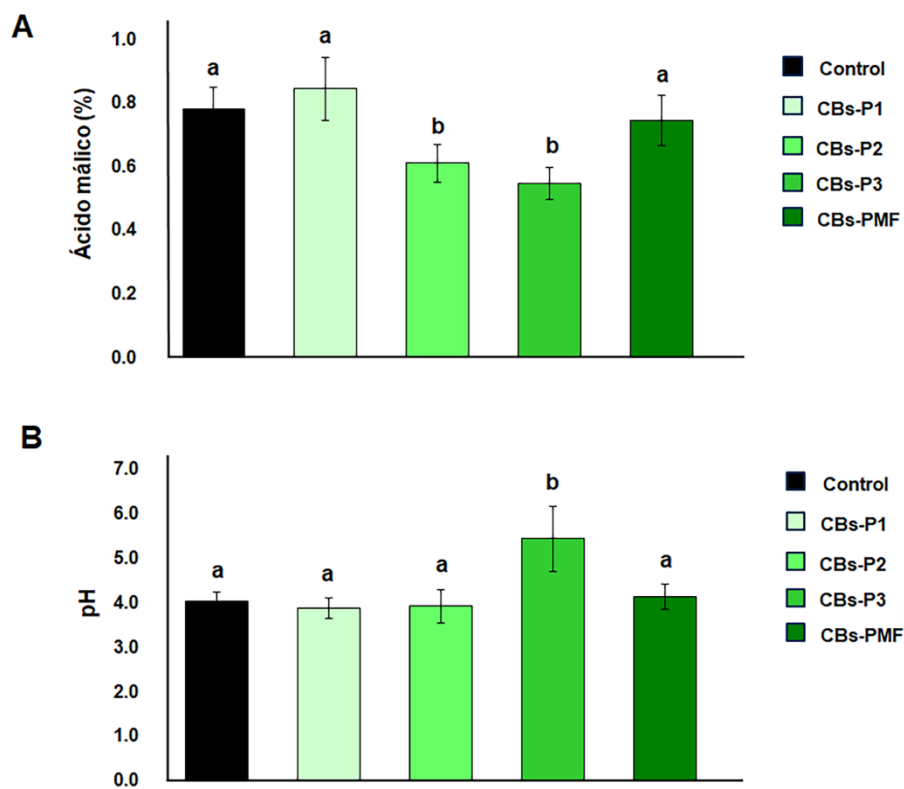


Figura 3. Efecto del consorcio de *B. subtilis* (CBs) en el contenido de ácido málico (A) y el pH (B) de frutos de guanábana en diferentes periodos de desarrollo.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos. Las líneas en las barras corresponden a la desviación estándar.

Sólidos solubles totales

Conforme avanza el proceso de maduración, las enzimas α y β amilasas hidrolizan el almidón a carbohidratos más simples como los mono y disacáridos, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa (Márquez-Cardozo *et al.*, 2012). Este parámetro de TSS, al igual que la firmeza, PWL, acidez titulable y pH, son indicativos del avance del proceso de maduración de los frutos. En este estudio se observó que los frutos control tuvieron 16.39 ± 2.5 °Brix (Figura 4), lo cual es acorde con estudios previos realizados en guanábana, donde se reporta un contenido de TSS entre 7.1 y 20.1 °Brix (Jiménez-Zurita *et al.*, 2016). Al analizar el efecto del tratamiento bacteriano en los frutos CBs-P3, se observó que los valores de TSS fueron significativamente menores con respecto al grupo control y los otros grupos de estudio. Estos resultados indican que la aplicación del consorcio de *B. subtilis* modifica el metabolismo de los carbohidratos en el fruto, es posible que haya una menor expresión de los genes que codifican para enzimas involucradas en la hidrólisis de carbohidratos como almidón y pectina, sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para detallar estas respuestas metabólicas. En los frutos CBs-P1, CBs-P2 y CBs-PMF, no hubo cambios significativos en el contenido de TSS con respecto al control, sustentando nuevamente que el periodo de desarrollo de los frutos es un factor que debe tomarse en cuenta para llevar a cabo la aplicación del CB. Así, de acuerdo con los resultados de los análisis de TSS, PWL, firmeza, acidez titulable y pH, la aplicación del consorcio bacteriano sobre los frutos con un periodo de 12 semanas de desarrollo, después de la antesis, sería el adecuado para lograr extender la vida útil de la guanábana.

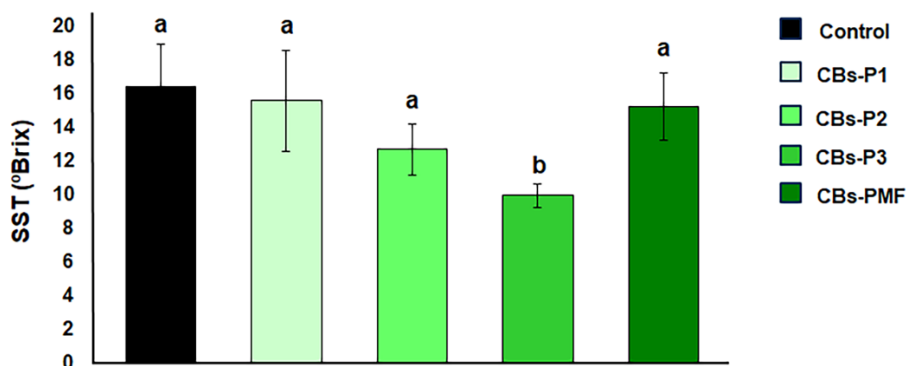


Figura 4. Efecto del consorcio de *B. subtilis* (CBs) en el contenido de sólidos solubles totales de frutos de guanábana en diferentes periodos de desarrollo.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos. Las líneas en las barras corresponden a la desviación estándar.

Expresión del gen que codifica para la PG de guanábana

Durante la maduración de los frutos sucede el ablandamiento de los tejidos, producto de la ruptura de las interacciones entre los polímeros que constituyen la pared celular. La pérdida de la firmeza de los frutos está relacionada con la degradación de pectina, celulosa y hemicelulosas, componentes de la pared celular. En el metabolismo de estos carbohidratos intervienen enzimas como la poligalacturonasa (PG), β -galactosidasa endo-1,4- β -glucanasa, pectinmetilesterasa y α -arabinosidasa, entre otras. Particularmente, la actividad de la PG está altamente correlacionada con la firmeza del tejido del pericarpio en los frutos (Ayour *et al.*, 2024). La enzima PG es clave en este proceso dado que se encarga de hidrolizar los enlaces α (1-4) en las cadenas de galacturónidos, por lo que la actividad de la PG está correlacionada con el ablandamiento de los frutos conforme avanza la maduración (Jiang *et al.*, 2019).

En este estudio observamos que la aplicación del CBs sobre los frutos de guanábana, tuvo efecto sobre la expresión del gen que codifica para la PG (Figura 5A). Contrario a lo esperado, en todos los tratamientos con el consorcio bacteriano disminuyó significativamente la transcripción del gen PG con respecto al control (Figura 5B). Se ha reportado que la aplicación de *B. subtilis* en la rizósfera de tomate, disminuye la actividad de la enzima PG en los frutos (Mena-Violante *et al.*, 2009). Se ha propuesto que *B. subtilis* tiene la capacidad de disminuir los niveles de etileno en las plantas, mediante la acción de la enzima ACC desaminasa, la cual desamina al ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que es el precursor inmediato de etileno, desviando al ACC de la vía biosintética del etileno (Misra & Chauhan, 2020). El proceso de maduración de los frutos climatéricos es dependiente de etileno, esta hormona vegetal controla la expresión de múltiples genes, entre ellos el gen PG, que activa su transcripción en presencia de etileno (Bennett & Labavitch, 2008). Como consecuencia, el etileno, de manera indirecta influye en los parámetros fisicoquímicos de los frutos (Monsalve *et al.*, 2022). De acuerdo a lo anterior, se propone que el consorcio de *B. subtilis*, a través de la síntesis de ACC desaminasa, pudo haber influido de manera negativa en la biosíntesis del etileno en los frutos de guanábana, este efecto fue más evidente los frutos tratados a las 12 semanas de desarrollo post-antesis. Por otra parte, no se descarta que algún otro mecanismo bacteriano pudiera estar influyendo en el atraso de la maduración del fruto de guanábana.

Hasta el momento, no hay reportes que indiquen el efecto de la aplicación de *B. subtilis* en los frutos (durante la precosecha) sobre la transcripción del gen que codifica para la PG, por lo que este sería el primer estudio, dando la pauta para continuar investigando el efecto de los consorcios bacterianos aplicados en frutos en la etapa precosecha y su repercusión en la calidad de los mismos en la etapa postcosecha.

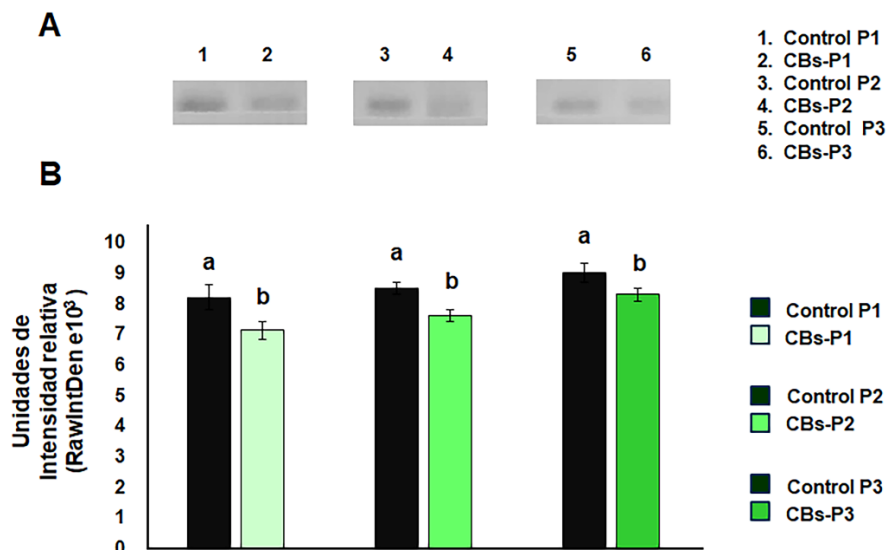


Figura 5. Efecto del consorcio de *B. subtilis* (CBs) en la transcripción del gen que codifica para la enzima poligalacturonasa (PG).

(A) Amplicones sometidos a electroforesis en gel de agarosa. (B) Valores de densidad integrada de cada imagen obtenida de los amplicones de en el gel de electroforesis estimados mediante el software ImageJ. La acumulación relativa de transcritos se determinó calculando la diferencia porcentual en las intensidades de las bandas normalizadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados obtenidos. Las líneas en las barras corresponden a la desviación estándar.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que las cepas de *B. subtilis* aplicadas sobre los frutos de guanábana en la etapa de precosecha, particularmente en frutos con un periodo de desarrollo de 12 semanas en el árbol, lograron atrasar el proceso de la maduración durante la postcosecha. La aplicación de *B. subtilis* como bacteria promotora del crecimiento vegetal ha sido ampliamente documentada. Así mismo, sus habilidades en el control biológico de fitopatógenos en precosecha y postcosecha han sido evidenciadas. En lo que respecta al efecto de *B. subtilis* sobre las propiedades fisicoquímicas de los frutos, son pocos los estudios que sustentan los beneficios de la aplicación de estas PGPR en esta etapa, por lo que este estudio contribuye al desarrollo de estrategias integrales destinadas a mejorar la calidad de los frutos a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo durante la precosecha y la postcosecha.

Contribución de los autores

Desarrollo de la metodología, SAA y JFAS; validación experimental, MRAJ y MACL; análisis de resultados, SAA, EMG, RIOB y MACL; preparación del manuscrito, revisión y edición, SAA y MACL; administrador de proyectos y adquisición de fondos, MACL.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Tecnológico Nacional de México, a través del proyecto TecNM 6343.17-P.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACHYT por la beca 360741 otorgada al estudiante de maestría participante en el proyecto, asimismo, al Laboratorio de Microbiología de Universidad de Guanajuato campus Irapuato-Salamanca por la donación del consorcio bacteriano aplicado y al Ing. Javier Cueto Parra por las facilidades para la experimentación en campo en los árboles de guanábana de su huerta “El Tonino”.

Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”

Referencias

- Antiabong, J. F., Ngoepe, M. G., & Abechi, A. S. (2016). Semiquantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoresis gel: potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World*, 9, 935-939. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.935-939>
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA., 2, 685-1298.
- Ayour, J., Harrak, H., & Benichou, M. (2024). Cell wall enzymatic activity control: a reliable technique in the fruit ripening process. *IntechOpen*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.5772/intechopen.113752>
- Bautista-Rosales, P. U., Ochoa-Jimenez, V. A., Casas-Junco, P. P., Balois-Morales, R., Rubio-

- Melgarejo, A., Diaz-Jasso, A. E., & Berumen-Varela, G. (2022). *Bacillus mojavensis* enhances the antioxidant defense mechanism of soursop (*Annona muricata* L.) fruits during postharvest storage. *Archives of Microbiology*, 204(9), 578-588. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03199-9>
- Bennett, A. B., & Labavitch, J. M. (2008). Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*, 175(1), 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.004>
- Bertani, G. (1951). A method for detection of mutations, using streptomycin dependence in *Escherichia coli*. *Genetics*, 36(6), 598-611. <https://doi.org/10.1093/genetics/36.6.598>
- Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A., & Tiznado-Hernández, M. E. (2019). Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*, 245, 269-273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.028>
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovacs, A. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 34(1), 15-25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Brasil, I. M., Otoch, M. d. L. O., Costa, J. H., Maia, G. A., Lima, M. d. G. S., Arnholdt-Schmitt, B., & de Melo, D. F. (2008). Isolation of total RNA from ripe and unripe soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *African Journal of Plant Science*, 2(9), 094-098. <http://hdl.handle.net/10174/2627>
- de Andrade, L. A., Santos, C. H. B., Frezarin, E. T., Sales, L. R., & Rigobelo, E. C. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, 11(4), 1088. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>
- Espinoza, I., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, B., Mata, M., & Montalvo, E. (2013). Physiological and physicochemical behavior of soursop fruits refrigerated with 1-methylcyclopropene. *Journal of Food Quality*, 36, 10-20. <https://doi.org/10.1111/jfq.12011>
- Freitas, S. T., & Mitcham, E. J. (2013). Quality of pitaya fruit (*Hylocereus undatus*) as influenced by storage temperature and packaging. *Scientia Agricola*, 70, 257-262. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400006>
- Guardado-Valdivia, L., Tovar-Perez, E., Chacon-Lopez, A., Lopez-Garcia, U., Gutierrez-Martinez, P., Stoll, A., & Aguilera, S. (2018). Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). *Microbiological Research*, 210, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.007>
- Jiang, F., Lopez, A., Jeon, S., de Freitas, S. T., Yu, Q., Wu, Z., Labavitch, J. M., Tian, S., Powell, A. L. T., & Mitcham, E. (2019). Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated polygalacturonase and expansin influences tomato cracking. *Horticulture Research*, 6, 17-27. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0105-3>
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Jiménez-Ruiz, E. I., Sumaya-Martínez, M. T., & Bello-Lara, J. E. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona Muricata* L.). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1155-1167. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.115>
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Sumaya-Martínez, M. T., & Bello-Lara, J. E. (2016). Caracterización de frutos de guanabana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 7(6), 1261-1270.
- Küçüker, E., Celik, K., Kizgin Özcengiz, C., Ogurlu, F., & Aglar, E. (2023). Pre-harvest application

- of aminoethoxyvinylglycine, salicylic acid and plant growth promoting rhizobacteria on fruit quality of 'sweetheart' sweet cherry. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 11(4), 871-875. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i4.871-875.5860>
- Lufu, R., Ambaw, A., & Opara, U. L. (2020). Water loss of fresh fruit: Influencing pre-harvest, harvest and postharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 272, 109519-109529. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109519>
- Márquez-Cardozo, C. J., Villacorta Lozano, V., Yepes Betancur, D. P., Velásquez, C., José, H., & Cartagena Valenzuela, J. R. (2012). Physiological and physico-chemical characterization of the soursop fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 65(1), 6477-6486. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340018>
- Martínez-Jaime, O. A., Abraham-Juárez, M. R., Saldaña-Robles, A., Cervantes-Díaz, E., Ozuna-López, C., & Pérez-Becerra, L. (2019). Efecto de la aplicación de *Bacillus subtilis* sobre propiedades Físico-Químicas de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum*) almacenados en refrigeración. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 399-403.
- Mena-Violante, H. G., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O., Gómez-Lim, M. A., & Olalde-Portugal, V. (2009). Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. *Agrociencia*, 43(6). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30215549001>
- Misra, S., & Chauhan, P. S. (2020). ACC deaminase-producing rhizosphere competent *Bacillus* spp. mitigate salt stress and promote *Zea mays* growth by modulating ethylene metabolism. *3 Biotech*, 10(3), 119. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2104-y>
- Monsalve, L., Bernal, M., Ayala-Raso, A., Álvarez, F., Valdenegro, M., Alvaro, J. E., Figueroa, C. R., Defilippi, B. G., & Fuentes, L. (2022). Relationship between endogenous ethylene production and firmness during the ripening and cold storage of raspberry (*Rubus idaeus* 'heritage') fruit. *Horticulturae*, 8(3), 262. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030262>
- Moreno-Hernández, C. L., Sáyago-Ayerdi, S. G., García-Galindo, H. S., Mata-Montes De Oca, M., & Montalvo-Gonzalez, E. (2014). Effect of the application of 1-methylcyclopropene and wax emulsions on proximate analysis and some antioxidants of soursop (*Annona muricata* L.). *The Scientific World Journal*, 2014, 896853. <https://doi.org/10.1155/2014/896853>
- Nam, J. H., Thibodeau, A., Qian, Y. L., Qian, M. C., & Park, S. H. (2023). Multidisciplinary evaluation of plant growth promoting rhizobacteria on soil microbiome and strawberry quality. *AMB Express*, 13(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01524-z>
- Nugraha, A. S., Haritakun, R., Lambert, J. M., Dillon, C. T., & Keller, P. A. (2021). Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L. *Natural Product Research*, 35(3), 481-489. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1638380>
- Paull, R. E., Deputy, J., & Chen, N. J. (1983). Changes in organic acids, sugars, and headspace volatiles during fruit ripening of soursop (*Annona muricata* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108, 931-934. <https://doi.org/10.21273/JASHS.108.6.931>
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>
- Rossi, F., Manfrini, L., Venturi, M., Grappadelli, L. C., & Morandi, B. (2022). Fruit transpiration drives interspecific variability in fruit growth strategies. *Horticultural Research*, 9, uhac036.

- <https://doi.org/10.1093/hr/uhac036>
- Saebi, M. R., Moradinezhad, F., & Ansarifard, E. (2023). Quality preservation and decay reduction of minimally processed seedless barberry fruit via postharvest ultrasonic treatment. *Food Science & Nutrition*, 11(12), 7816-7825. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3698>
- Saini, M. K., Capalash, N., Varghese, E., Kaur, C., & Singh, S. P. (2022). A Targeted metabolomics approach to study secondary metabolites and antioxidant activity in 'Kinnow Mandarin' during advanced fruit maturity. *Foods*, 11(10), 1410. <https://doi.org/10.3390/foods11101410>
- Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., Kumar, A., & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1132770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2019). Cierre de la producción agrícola (1980-2021). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, por cultivo y variedad. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>.
- Terán-Erazo, B., Alia-Tejacal, I., Balois-Morales, R., Juárez-Lopez, P., López-Guzmán, G. G., Pérez-Arias, G. A., & Núñez-Colín, C. A. (2019). Caracterización física, química y morfológica de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.). *Agrociencia*, 53, 1013-1027.
- Vienetz, T., Malmann-Medilha, L. C. B., Marek, J., Duarte-Rios Faria, C. M., & Vasconcelos-Botelho, R. (2023). *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on the quality and occurrence of anthracnose in bananas. *Communicata Scientiae*, 14, e3701. <https://doi.org/10.14295/cs.v14.3701>
- Villarreal-Fuentes, J. M., Alia-Tejacal, I., Hernández-Salvador, M. A., Hernández-Ortiz, E., Marroquín-Agreda, F. J., Núñez-Colín, C. A., & E., C.-R. (2020). *In situ* characterization of soursop (*Annona muricata* L.) in the Soconusco region, Chiapas, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 189-205. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.05.008>
- Wang, D., Ding, C., Feng, Z., Ji, S., & Cui, D. (2023). Recent advances in portable devices for fruit firmness assessment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(8), 1143-1154. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1960477>
- Worrell, D. B., Carrington, C. M. S., & Huber, D. J. (1994). Growth, maturation and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 57, 7-15. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)90030-2)