

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**“DETECCIÓN DE *Botrytis cinerea* MEDIANTE PCR EN CULTIVOS DE VID Y  
EVALUACIÓN DEL BIOCONTROL CON *Bacillus subtilis* Q11”**

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental**

**Presenta:**

Biól. Yara Suhan Juárez Campusano

**Dirigido por:**

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

**Co-dirección:**

Dra. Rocío Velázquez Robledo

C.U. Santiago de Querétaro, Querétaro.

Octubre de 2017



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental**

DETECCIÓN DE *Botrytis cinerea* MEDIANTE PCR EN CULTIVOS DE VID Y EVALUACIÓN DEL BIOCONTROL CON *Bacillus subtilis* Q11

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencia y tecnología ambiental

**Presenta:**

Biól. Yara Suhan Juárez Campusano

**Dirigido por:**

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar y Dra. Rocío Velázquez Robledo

**SINODALES**

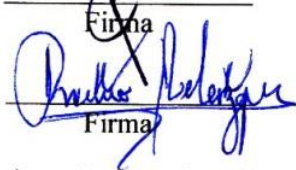
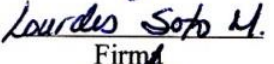

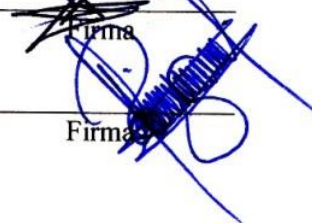
Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Director

Dra. Rocío Velázquez Robledo  
Co-director

Dra. Lourdes Soto Muñoz  
Sinodal

Dr. Juan Campos Guillén  
Sinodal

Dr. Miguel Angel Ramos López  
Sinodal

Firma  
  
Firma  
  
Firma  
  
Firma  


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia  
Loarca-Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro., México  
Octubre de 2017

## RESUMEN

*Botrytis cinerea* (BC) es un hongo necrotrófico causante de la podredumbre gris, enfermedad que afecta distintos cultivos hortícolas y frutales, entre ellas la vid. En el estado de Querétaro, el cultivo de la vid ha cobrado importancia, debido a los beneficios económicos derivados de las actividades de su producción, por ello es necesario evitar y controlar los riesgos por enfermedades. En el presente trabajo se implementó un sistema de detección por técnicas moleculares (PCR, por sus siglas en inglés) y se evaluó el efecto antagonístico de *Bacillus subtilis* Q11 (BsQ11) sobre aislados de BC *in vitro* e *in vivo*. Primeramente, se colectaron frutos de vid de la *cv.* Merlot: Finca el Rosario, Bodegas de Cote y Viñedos Azteca, luego, se obtuvieron aislados de BC para estandarizar su detección por PCR mediante el uso de los oligonucleótidos C729 +/- en los viñedos. Se encontró que los viñedos mostraron baja incidencia de BC (20 %), la más alta fue en Viñedos Azteca ( $p=0.017$ ) debido a que no existe control fitosanitario en el lugar. Asimismo, se llevaron a cabo ensayos de antagonismo para evaluar la capacidad de BsQ11 de reducir la incidencia de BC sobre hojas de vid de la *cv.* Ribier, los resultados manifestaron un alto grado de eficacia contra los aislados de BC (arriba de 85.71 %), reduciendo el área de infección y demostrando que BsQ11 es un óptimo agente de biocontrol. Finalmente, el extracto crudo de BsQ11 fue separado por HPLC de fase reversa, el cual generó 22 fracciones que fueron probadas contra *Rhizoctonia solani*, resultando con actividad antagonística tres de ellas; 9, 11 y 12. El análisis por MALDI TOF/TOF de estas fracciones indica que son una mezcla de iturinas con picos de iones moleculares de 1071 a 1130 m/z. Estos compuestos pertenecen a una familia de lipopéptidos reportados con actividad inhibitoria contra fitopatógenos. En conclusión, la detección mediante un sistema mediante PCR y el uso de BsQ11, como agente de biocontrol, son apropiados métodos para detectar y tratar enfermedades como la podredumbre gris en cultivos.

**(Palabras clave:** Vid, PCR, *Botrytis cinerea*, control biológico, *Bacillus subtilis*)

## SUMMARY

*Botrytis cinerea* (BC) is a necrotrophic fungus which causes gray mold disease on different horticultural crops and fruit crops, including grapevine. In Querétaro State, the grapevine culture cultivation has gained importance due to the economic profits derived from its production. Therefore, diseases prevention and control are necessary. In the present work, molecular tools, PCR, were implemented to detect the fungus. Also, the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* Q11 (BsQ11) on BC strains was evaluated *in vitro* and *in vivo*. First, fruit samples of *cv.* Merlot were collected from Queretaro vineyards (Finca el Rosario, Bodegas de Cote and Viñedos Azteca); after this, BC strains were isolated to standardize their detection in the vineyards by PCR, using C729 +/- primers. The results showed that BC global incidence at the vineyards were as low as 20 %. However, in vineyards where there is no plant disease control (Viñedos Azteca) the incidence rose up (20 %). Furthermore, antagonistic assays were performed to evaluate the ability of BsQ11 to reduce the infection of BC over vine leaves *cv.* Ribier. A high biocontrol efficacy against BC strains, reducing infection area (up to 85.71 %), was found which demonstrates that the BsQ11 strain is an optimal biocontrol agent. Finally, the crude extract was separated by reverse phase-HPLC generating 22 fractions; which were individually tested against *Rhizoctonia solani*, and three of them presented antagonist activity (9, 11 and 12). MALDI TOF/TOF fraction analyses indicated that these are a mixture of iturines with molecular-ion peaks from  $m/z$  1071 to 1130; these compounds belong to a lipopeptide family with reported inhibitory activities against phytopathogens. In conclusion, the detection system by PCR and the use of BsQ11 strain, as biocontrol agent, are proper methods to detect and treat gray mold in grape production.

**(Key words:** Grapevine, PCR, *Botrytis cinerea*, Biological control, *Bacillus subtilis*)

***A mis padres***

*Gracias por todo su amor y apoyo, esto es de ustedes. Los amo.*

***A mi amigo, confidente y amor***

*Gracias por estar a mi lado, apoyarme y enseñarme. Te amo Michel Oriard.*

*"No puedes depender de tus ojos cuando tu imaginación está fuera de foco"*

**Charles Darwin**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente al Dr. Ramiro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Valoro mucho las experiencias y enseñanzas, que no solo completarán mi formación académica, sino también mi forma de pensar y de actuar ante la situación general en la que vivimos. Gracias por su comprensión y apoyo.

A la Dra. Rocío Velázquez, por sus aportaciones y apoyo a pesar de la distancia, así mismo a la Empresa Química por el financiamiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para continuar mi preparación y estudios de maestría.

Al Dr. Ramón Martínez Peniche por permitirme trabajar en su laboratorio y su apoyo en otros aspectos de la tesis. Así como a Caro y Sarahí por las pláticas divertidas y la convivencia y ayuda en el laboratorio.

A mis asesores: Dr. Miguel Ramos, Dra. Lourdes Soto y Dr. Juan Campos por sus aportaciones a mi tesis y todo su apoyo.

A los vitivinicultores por los permisos otorgados para trabar y tomar muestras, espero que en algún momento esa tesis les pueda retribuir su ayuda.

Al Laboratorio de Cromatografía y Proteómica, CINVESTAV, Unidad Irapuato por el excelente servicio y soporte para realizar los respectivos análisis que son una parte importante en este trabajo.

A Socorro “Coco” Chávaro y Crystabel López por compartir el humor negro, las ideas intelectuales y por permitirme ser su amiga. Conocer a personas que desean no solo estar ahí por estar, es realmente satisfactorio, motivador y emocionante. Gracias por esos días de café. Las quiero.

Y por último, pero no menos importante a mis compañeros de la generación 2015-2017 de MCTA, gracias por esas experiencias y darme la oportunidad de conocer excelentes personas.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 La vid y su importancia	4
3.1.1 Cultivares de vid en México	5
3.1.2 Enfermedades que afectan la vid	6
3.2 La podredumbre gris	8
3.2.1 Biología de <i>Botrytis cinerea</i>	8
3.2.2 Transmisión y patología de <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.2.3 Vías de infección y factores que promueven la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i>	11
3.3 Métodos de detección de hongos fitopatógenos	11
3.3.1 Métodos clásicos	12
3.3.2 Métodos serológicos	12
3.3.3 Métodos moleculares	12
3.3.4 Reacción de la cadena de la polimerasa	13
3.3.5 PCR para la detección de enfermedades en cultivos	14
3.4 Métodos de control de la podredumbre gris	16
3.4.1 Control químico	16
3.4.2 Control cultural	18
3.4.3 Control biológico	18
3.4.3.1 Levaduras	19
3.4.3.2 Hongos	20

3.4.3.3 Bacterias	20
3.4.4 Moléculas de control biológico de <i>Bacillus</i>	22
3.4.4.1 Lipopéptidos de <i>Bacillus</i> : Estructura y función	23
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
5.1 General	27
5.2 Específicos	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 Determinación de la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de cultivos de vid mediante PCR convencional	28
6.1.1 Colecta de muestras de vid	28
6.1.2 Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> de muestras de vid	29
6.1.3 Extracción de ADN a partir de material vegetal infectado <i>in vitro</i>	30
6.1.4 Selección de oligonucleótidos y condiciones de la PCR para la detección de <i>Botrytis cinerea</i>	31
6.1.5 Validación de la especificidad de los oligonucleótidos	32
6.1.6 Evaluación de la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en viñedos mediante PCR	32
6.2 Evaluación del efecto antagónico de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 sobre <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de vid	34
6.2.1 Material biológico	34
6.2.1.1 Cepa antagonista de <i>Bacillus subtilis</i>	34
6.2.1.2 Plantas de vid	34
6.2.2 Selección de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> para ensayos	35
6.2.3 Ensayo de antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 en plantas de vid	36
6.2.4 Análisis de imágenes y seguimiento de la infección	37
6.2.5 Recuperación de <i>Bacillus subtilis</i> de hojas de vid	38
6.3 Identificación de los compuestos relacionados al antagonismo de hongos en <i>Bacillus subtilis</i> Q11	39
6.3.1 Evaluación del antagonismo del sobrenadante de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	39
6.3.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	40



6.3.3	Obtención del extracto crudo y detección por FT-IR	40
6.3.4	Evaluación del antagonismo del lipopéptido crudo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 sobre aislados de <i>Botrytis cinerea</i>	41
6.3.5	HPLC del extracto crudo de los lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	41
6.3.6	Actividad antagonista e identificación de las fracciones de HPLC	42
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
7.1	Determinación de la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de vid mediante PCR convencional	43
7.1.1	Obtención de cultivos puros de <i>Botrytis cinerea</i>	43
7.1.2	Extracción de ADN fúngico de material vegetal	44
7.1.3	Elección de oligonucleótidos y condiciones de la PCR para la detección de <i>Botrytis cinerea</i>	45
7.1.4	Validación de la especificidad de los cebadores	47
7.1.5	Evaluación de la PCR convencional en muestras de campo	49
7.2	Evaluación del efecto antagónico de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 sobre <i>Botrytis cinerea</i> en plantas de vid	52
7.2.1	Selección de aislados de <i>Botrytis cinerea</i> para los ensayos <i>in vivo</i>	52
7.2.2	Evaluación del antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 en plantas	53
7.3	Identificación de los compuestos relacionados al antagonismo de hongos en <i>Bacillus subtilis</i> Q11	64
7.3.1	Evaluación del antagonismo del sobrenadante de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	64
7.3.2	Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	67
7.3.3	Detección de lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 por FT-IR	70
7.3.4	Evaluación del antagonismo del lipopéptido crudo de <i>Bacillus subtilis</i> Q11 sobre aislados de <i>Botrytis cinerea</i>	70
7.3.5	Identificación y actividad antagonista de los lipopéptidos de <i>Bacillus subtilis</i> Q11	73
VIII.	CONCLUSIONES	79
IX.	PERSPECTIVAS	80
X.	BIBLIOGRAFÍA	81

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Cultivares de uva en México	6
2. Detección de enfermedades producidas por hongos en distintos cultivares mediante PCR	15
3. Fungicidas empleados para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	17
4. Antagonistas microbianos reportados para control de enfermedades en pos cosecha de frutos y hortalizas	21
5. Secuencias de los oligonucleótidos empleado para la detección de <i>Botrytis</i>	32
6. Microorganismos aislados de vid utilizados para validación de oligonucleótidos C729f/C729r	33
7. Cepas de <i>Botrytis cinerea</i> aisladas de frutos de vid	43
8. Concentración y pureza de extracciones de ADN a partir de diferentes métodos de recuperación de esporas de fruta infectada	44
9. Ensayo de PCR empleando los oligos C729f/C729r sobre aislados de levaduras y hongos de vid	48
10. Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> por PCR en los viñedos de estudio	49
11. Efecto de factores sobre la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de vid	50
12. Hojas infectadas con diferentes cepas de <i>Botrytis cinerea</i> y, BsQ11 como antagonista	58
13. Análisis de las interacciones intrínsecas de la planta, de BsQ11 y, de los aislados de <i>Botrytis cinerea</i> sobre la incidencia de la enfermedad	60
14. Inhibición <i>in vitro</i> de cepas de <i>Botrytis</i> empleando el lipopéptido crudo de BSQ11	66
15. Índices de emulsificación (EI <sub>24</sub> ) y estabilidad de la emulsión (Es <sub>i</sub> ) entre dos temperaturas de incubación de BsQ11	69
16. Principales picos de masa (m/z) de los lipopéptidos caracterizados por MALDI-TOF/TOF y su identificación	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Etapas del desarrollo de la vid	4
2. Enfermedades de la vid	7
3. Caracteres morfológicos de <i>Botrytis cinerea</i>	9
4. Síntomas y lesiones típicas causadas por <i>Botrytis cinerea</i> en vid	10
5. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.	13
6. Estructura de quitinasas y sideróforos	22
7. Estructura de lipopéptidos	25
8. Fotografías aéreas de los viñedos de estudio	28
9. Esquema del diseño de muestreo de frutos	29
10. Proceso de propagación por estacas de plantas de vid cv. Ribier	35
11. Diagrama del ensayo de antagonismo	36
12. Producto de la amplificación de cebadores BC108-BC563	46
13. Producto de la amplificación de cebadores C729f-C729r	46
14. Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> detectada mediante PCR convencional en viñedos	51
15. Ensayos de infección para la selección de aislados patógenos de <i>Botrytis cinerea</i> en hojas de vid	52
16. Incidencia de las diferentes cepas de <i>Botrytis cinerea</i> en hojas	54
17. Clasificación de hojas según su posición en la planta	63
18. Efecto antagónico de sobrenadante de BsQ11 sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> SCO7	64
19. Antagonismo del sobrenadante de BsQ11 en las cepas de <i>Botrytis cinerea</i> aisladas de vid.	65
20. Ensayo de emulsificación del sobrenadante de BsQ11	68
21. Espectro Infrarrojo del extracto seco obtenido de la BsQ11	71

22.	Inhibición de diferentes concentraciones del extracto seco de BsQ11 sobre aislados de <i>Botrytis cinerea</i>	72
23.	Cromatograma de HPLC de compuestos obtenidos de BsQ11	74
24.	Efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas del HPLC de lipopéptidos de BsQ11 en <i>Rhizoctonia solani</i>	76
25.	Espectro de MALDI-TOF/TOF RM obtenido de las fracciones con actividad antifúngica de los lipopéptidos de BsQ11	78

## I. INTRODUCCIÓN

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno que causa la podredumbre gris, ésta enfermedad afecta gran variedad de frutos y hortalizas tales como fresa, manzana, col, zanahoria, pepino, berenjena, lechuga, frijol, mostaza, arroz, chícharo, pimiento, jitomate, entre otros (Pande *et al.*, 2006; Keller, 2015). Por esta razón, se han desarrollado diferentes productos químicos para su control, lo que ha llevado a invertir más de 15 millones de dólares anuales a nivel global (Khazaeli *et al.*, 2012). Uno de los cultivos que se ha visto afectado por este hongo es la vid, la cual ha cobrado importancia en el estado de Querétaro debido al aumento en ingresos económicos conseguidos a través de las actividades derivadas de su producción (AVQ, 2011; Girón, 2014). Por tal motivo, es necesario elaborar métodos de manejo de enfermedades en los cultivos que incluyan la detección y el control de las mismas.

La detección oportuna permite un tratamiento preventivo para evitar o disminuir los daños ocasionados por una enfermedad. En el caso particular de los hongos patógenos, la determinación de especies implica la identificación y descripción de sus estructuras morfológicas y características bioquímicas (Settanni y Corsetti, 2007; Gupta *et al.*, 2012). La limitante de estos procedimientos reside en la capacidad del personal técnico que diferencia e identifica las especies dada la variedad de estructuras y metabolismos microbianos (Gupta *et al.*, 2015), pues con ello aumenta el rango de error en el diagnóstico; debido a esta situación, se han utilizado métodos moleculares para complementar la información y contrarrestar los resultados confusos. Aunado a esto, una de las ventajas del uso de herramientas moleculares, reside en el tiempo de identificación, el cual es menor en comparación a las técnicas clásicas donde la duración en el desarrollo y obtención de un cultivo puro es amplia en la mayoría de los casos (McCartney *et al.*, 2003). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), un ejemplo de las técnicas moleculares, posibilita determinar especies mediante la amplificación de un fragmento específico en el genoma de un organismo blanco (Settanni y Corsetti, 2007). En cuanto a la aplicación de la PCR, un atributo a destacar es que con esta técnica se puede identificar a un patógeno en el período de infección; es decir, antes de que se desarrollen los signos y síntomas de la enfermedad (Settanni y Corsetti, 2007; Sanzani *et al.*, 2012).

Una vez detectado el patógeno, es posible iniciar un control, para lo cual se ha explotado el uso de los fungicidas de síntesis química, que finalmente han ocasionado daños a la salud humana y a los ecosistemas (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Dicho lo anterior, se ha optado por métodos sostenibles, una alternativa es el control biológico. También llamado biocontrol, el cual se basa en la interacción de organismos antagónicos; entre los que se incluyen especies de levaduras, hongos y bacterias (Sharma *et al.*, 2009; Narayanasamy, 2013). Dentro de estos grupos destacan las bacterias del género *Bacillus*, las cuales son conocidas por producir antibióticos como mecanismo antagónico (Sharma *et al.*, 2009; Shafi *et al.*, 2017). Conjuntamente, pueden mejorar la fertilidad de suelos y la absorción de nutrientes en beneficio de las plantas (Vessey, 2003); dados estos beneficios, este modelo ha sido destinado para la generación de productos comerciales.

En el presente trabajo se detectó a *Botrytis cinerea* en período de infección en frutos de vid en el estado de Querétaro, mediante PCR convencional. Y también se evaluó el potencial antagónico y sus compuestos de la cepa Q11 de *Bacillus subtilis* contra el hongo patógeno antes mencionado.

## II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA

Debido a la importancia que ha adquirido la producción vitivinícola en México y principalmente en el estado (AVQ, 2011; Girón, 2014), se busca proveer de tecnologías para mantener un proceso productivo del cultivo. Los problemas ocasionados por las enfermedades causadas por hongos, como la podredumbre gris siguen siendo un reto a tratar (Choquer *et al.*, 2007; Elmer y Michailides, 2007; AVQ, 2011).

El control del hongo *Botrytis cinerea*, agente causal de la enfermedad ya mencionada, radica en el empleo de métodos para su detección y su posterior control (Elmer y Michailides, 2007; Kretschmer *et al.*, 2009). Por lo que disponer de técnicas de detección, como la PCR que se caracteriza por ser rápida, específica y altamente sensible, permitiría identificar al patógeno de manera oportuna y dar paso a la toma de decisiones respecto a su tratamiento (Khazaeli *et al.*, 2012; Sanzani *et al.*, 2012).

Una vez detectado el patógeno, el uso de métodos biológicos constituye un control eficaz y alternativo a los compuestos de síntesis química, ya que el disponer de antagonistas microbianos, como *Bacillus subtilis*, competirán contra *Botrytis cinerea* (Vessey, 2003; Sharma *et al.*, 2009). Particularmente en *Bacillus subtilis*, el mecanismo antagónico se debe a la producción de compuestos que inhiben el crecimiento de hongos (Ongena y Jacques, 2008).

En conjunto, los procesos de identificación molecular y de control biológico podrán emplearse como un manejo sostenible de enfermedades, para disminuir pérdidas del producto vinícola del estado.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 La vid y su importancia

La uva o vid, *Vitis vinífera* L. perteneciente a la familia Vitaceae, es una liana perenne de hoja caducifolia, cuyo origen se remonta a Europa y Asia (Creasy y Creasy, 2009). La vid sobrevive a temperaturas de entre 10° a 30 °C con una humedad relativa de entre 60 a 70 % (Kose, 2014; Song *et al.*, 2015). La fenología de la vid abarca las etapas de dormancia, brotación, florecimiento, producción de fruto, envero o cambio de color del fruto, cosecha, senescencia y caída de las hojas, como se muestra en la Figura 1 (Jones y Davis, 2000).

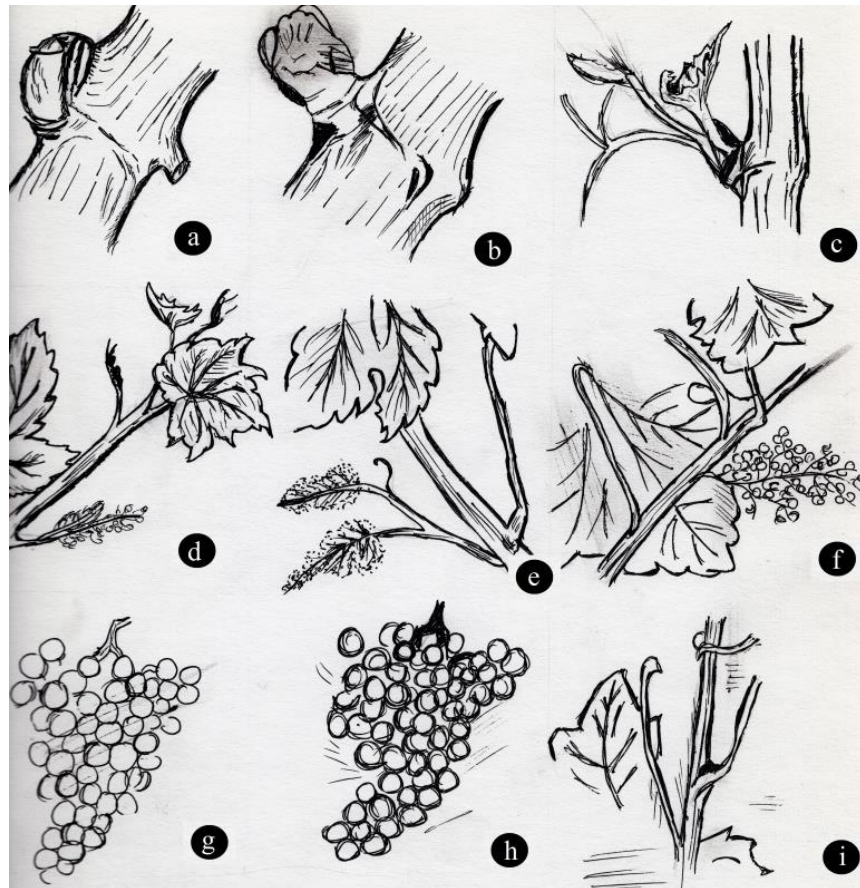


Figura 1. Etapas del desarrollo de la vid. a) Finaliza período de dormancia; b) y c) brotación; d) y e) florecimiento; f) producción del fruto; g) envero; h) maduración y cosecha; i) senescencia y caída de las hojas. Basado en Keller (2015).





El fruto de la vid es una baya, muy importante a nivel industrial debido a su aporte como alimento antioxidante y astringente (Creasy y Creasy, 2009; Molina-Quijada *et al.*, 2010). Los principales productos derivados de la vid son, la uva de mesa, las pasas, el jugo y productos fermentados como el vino (Creasy y Creasy, 2009). A nivel mundial el área dedicada al cultivo de vid es de 7,517 millones de hectáreas. Los países con mayor producción de vid son España, Francia e Italia. El consumo de los productos derivados de uva es variado, entre ellos el vino con una producción que ha llegado hasta 267 millones de hectolitros en 2014 (OIV, 2016). En México, el nivel de consumo de esta bebida ocupa el cuarto lugar, lo que genera mayores ganancias económicas en la rama turística, el comercio y la apertura de nuevos empleos (Girón, 2014; OIV, 2016).

### **3.1.1 Cultivares de vid en México**

La zona vitivinícola en México comprende 3,350 hectáreas de cultivos repartidos entre los estados de Baja California, Coahuila, Aguascalientes, Zacatecas, Sonora y Querétaro (Girón, 2014). Durante cada ciclo agrícola se producen alrededor de 7 mil toneladas de uva de distintos cultivares, como se observa en el Cuadro 1, para la producción de vino tinto y blanco (AVQ, 2011).

Querétaro es el segundo productor de vino en el país, cuenta con 12 casas productoras que ocupan 197 hectáreas dedicadas al cultivo de uva (Girón, 2014). Los municipios que comprenden la zona vitivinícola Queretana son: Ezequiel Montes, El Marqués, Huimilpan, San Juan del Río y Colón, donde producen los cultivares Ugni Blanc, Cabernet Sauvignon, Pinto Noir, Muscat Blanc, Tempranillo, Malbec, Cabernet Franc, Chardonnay, Merlot, Sirah, Zinfandel y Macabeo (AVQ, 2011).

Cuadro 1. Cultivares de uva en México

			
Zinzandel	Malbec	Chardonnay	Macabeu
Ruby red	Petit Sirah	Sauvignon Blanc	Ugni blanc
Barbera	Ruby Cabernet	French Colombard	Tramier
Gamay	Carignane	Riesling	
Merlot	Pinot Noir	Semillón	
Tempranillo	Cabernet Sauvignon	Málaga	
Nebbiolo	Garnacha	St Emilion	
Pinot Gris	Misión	Moscatel	
Cabernet Franc	Uva Lenoir	Viognier	
Rosa del Perú	Shiraz	Chasselas	

Tomado de AVQ, 2011.

### 3.1.2 Enfermedades que afectan la vid

Las condiciones geográficas del estado de Querétaro permiten el desarrollo de frutos de vid, pero los factores económicos y los problemas ocasionados por plagas y enfermedades pueden alterar el rendimiento de la producción (AVQ, 2011). Las enfermedades de mayor riesgo en las plantaciones de vid son el mildiu, el oidio, la antracnosis, la pudrición negra, la agalla de la corona y la podredumbre gris (AVQ, 2011; Kiss *et al.*, 2016).

El mildiu (Downy mildiu) es una enfermedad producida por el parásito obligado *Plasmopara viticola*, un hongo que infecta hojas y causa puntos blancos en el envés, o bien en frutos y partes del tallo (Figueiredo *et al.*, 2015), como se observa en la Figura 2a y 2b. Las condiciones necesarias para presentarse esta enfermedad están determinadas por la cantidad de esporas que logren madurar en primavera, lo cual depende directamente de la precipitación producida en otoño (Carisse *et al.*, 2006).

El oídio (Powdery mildew) también es causada por un hongo, *Uncinula necator* (syn. *Erysiphe necator*), se presenta en condiciones de extrema humedad ocasionado por las lluvias, y suele ser confundido con el mildiu. La diferencia es que en el oídio se generan puntos de color marrón sobre las hojas y, un polvillo blanco observado en el haz y el envés de estos órganos (Qiu *et al.*, 2015), Figura 2c y 2d.

*Elsinoe ampelina* es otro hongo que afecta la vid y produce la antracnosis, enfermedad caracterizada por la presencia de agujeros y manchas café oscuro a lo largo de toda la planta (Barros *et al.*, 2015), Figura 2e y 2f.

La pudrición negra, provocada por el hongo *Guignardia bidwelli*, se caracteriza por causar pequeñas lesiones cuasi circulares tanto en las hojas como en los frutos (Carisse *et al.*, 2006; Snowden, 2010), Figura 2g.

Otra enfermedad es la agalla de la corona, originada por la bacteria *Agrobacterium vitis* (Genov *et al.*, 2015), la cual deforma los tallos de tamaño variable, Figura 2h. Generalmente se produce la pérdida del organismo en su totalidad a diferencia de las otras enfermedades (Carisse *et al.*, 2006). Por último, la podredumbre gris, enfermedad de gran interés, para diferentes sectores de producción pues se encuentra extendida a diferentes cultivos, y de la cual se hará mayor hincapié para fines de este trabajo.

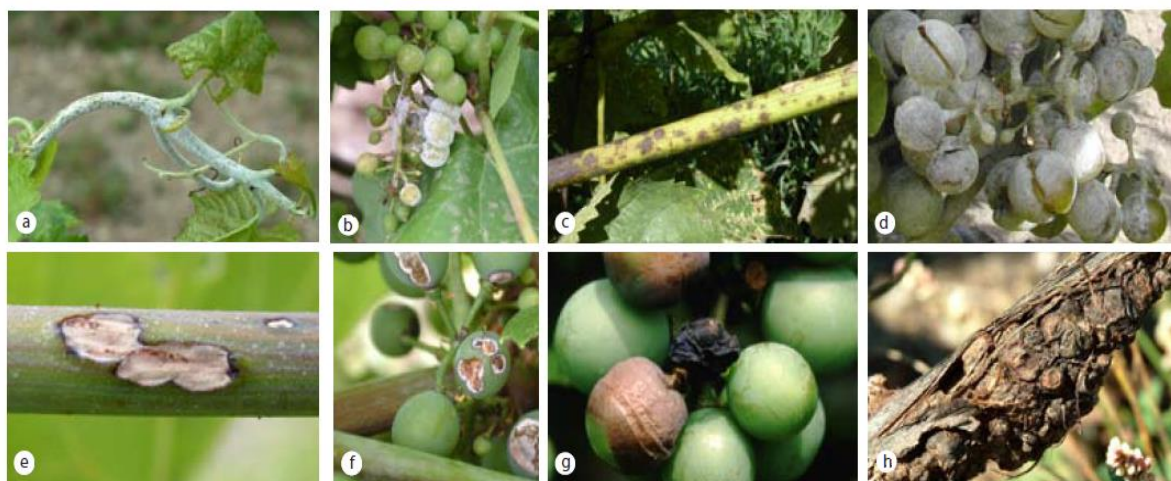


Figura 2. Enfermedades de la vid. a,b) Mildiu, c,d) Oidio, e,f) Antracnosis, g) Pudrición negra y h) Enfermedad de la agalla de la corona. Imágenes tomadas de Carisse *et al.*, (2006).

## 3.2 La podredumbre gris

La podredumbre gris es una enfermedad producida por el patógeno *Botrytis cinerea*, un hongo necrotrófico ascomicete que posee una extensa gama de hospederos y, un amplio rango de distribución a nivel global (Pande *et al.*, 2006; Keller, 2015). Esto último, permite considerar a este hongo como un patógeno de importancia económica, debido a las pérdidas en cultivos que ha ocasionado, dentro de las cuales se incluyen a la vid. En la actualidad, la inversión que se destina para su control va de los 15 hasta los 20 millones de dólares (Khazaeli *et al.*, 2012).

*Botrytis cinerea* posee la capacidad de resistir bajas temperaturas de almacenamiento y, un período de latencia de 9 a 11 meses, algunos autores mencionan hasta 5 años, lo cual permite desarrollar su micelio hasta encontrar las condiciones adecuadas de nutrientes y temperatura (Reglinski *et al.*, 2005; Sanzani *et al.*, 2012).

### 3.2.1 Biología de *Botrytis cinerea*

El género *Botrytis* comprende 20 miembros distribuidos en dos clados. El primero consta de cuatro especies que infectan plantas dicotiledóneas y el segundo, que incluye al resto, son especializadas en monocotiledóneas. Ambos grupos poseen un gen multilocus que permite la determinación actual de *Botrytis pseudocinerea* (Grupo 1) y *Botrytis sensu stricto* (Grupo 2), con características ecológicas y de resistencia a fungicidas particulares (Konstantinou *et al.*, 2015).

*Botrytis cinerea* presenta un estado teleomorfo llamado *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Pezizales, Ascomicota; Figura 3b) formada de la fertilización de esclerocios con microconidios uninucleados a bajas temperaturas (Pande *et al.*, 2006; Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017). Las características morfológicas generales que describen a *Botrytis* (Figura 3) son hifas delgadas, hialinas que van de 8 a 16  $\mu\text{m}$  de ancho, a veces café y septadas con la edad (Keller, 2015).

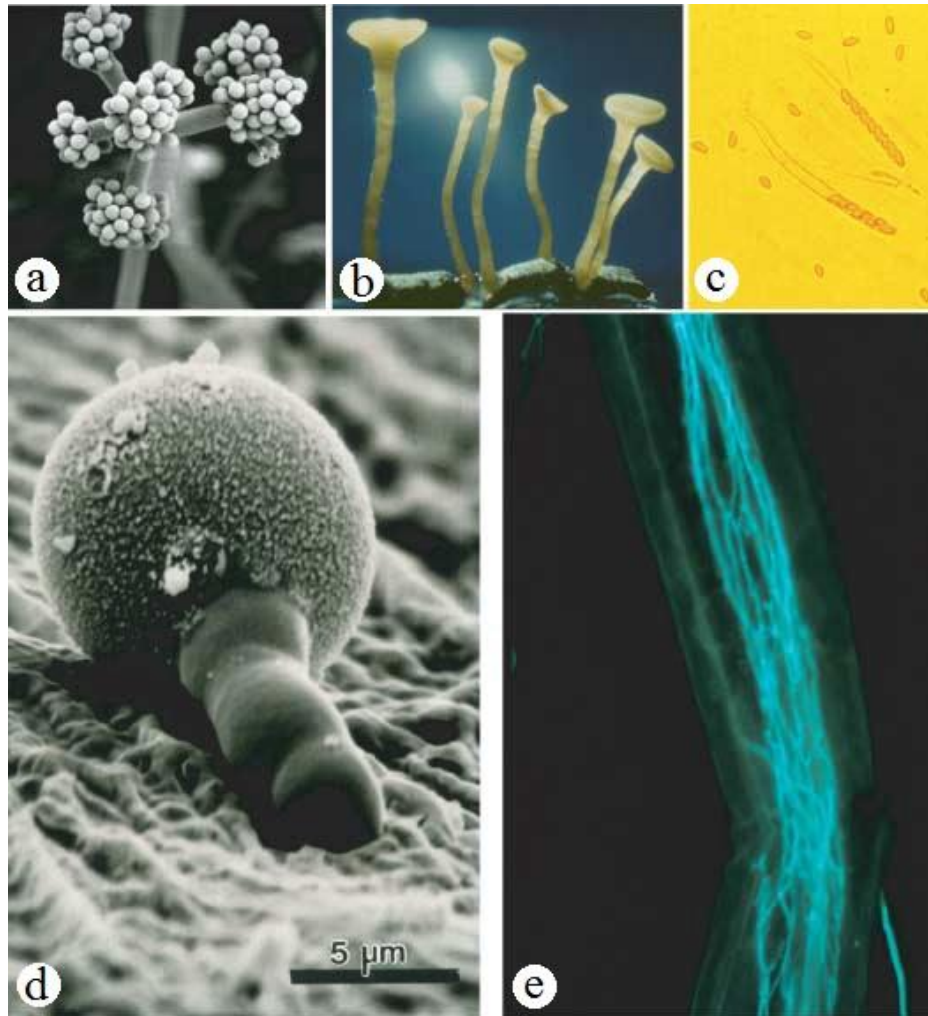


Figura 3. Caracteres morfológicos de *Botrytis cinerea*. a) Microfotografía electrónica de barrido de un conidióforo y conidio maduro, b) Apotecio de *Botryotinia fuckeliana*, c) Dos ascos cada una con 8 ascosporas, d) Germinación de conidio en ausencia de agua, e) Hifa de *Botrytis cinerea* creciendo dentro de tejido vegetal. Imagen tomada de Williamson *et al.*, (2007).

Los conidióforos se encuentran sobre el micelio, o el esclerocio, y están erguidos, septados y ramificados, esto último de manera dicotómica o tricotómica con puntas ligeramente agrandadas (Pande *et al.*, 2006; Khazaeli *et al.*, 2012). Los esclerocios se consideran la principal forma de supervivencia de este patógeno (Fernández-Ortuño *et al.*, 2015).

### 3.2.2 Transmisión y patología de *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* puede infectar diferentes órganos vegetales como los frutos a través de conidios, que son esporas asexuales, o de micelio, la parte crucial en la infección es la germinación, en el caso particular de las esporas y la adhesión en la superficie de la planta, para ambas estructuras (Fillinger y Elad, 2016). Consecutivamente, la penetración y la colonización de tejidos ocurren después de que el hongo secreta parte de su matriz extracelular que contiene enzimas que degradan las células de su hospedero (Reglinski *et al.*, 2005). La aparición de lesiones necróticas son el primer síntoma producido por *Botrytis* (Figura 4) que, generalmente, se originan en el tallo para finalmente conducir la infección hacia las hojas, flores y frutos según el estado fenológico de la planta (Pande *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2007). En ciertos casos este fitopatógeno, aprovecha las especies reactivas de oxígeno, producidas como primera respuesta de defensa en las plantas, esto puede generar un mayor grado de daño en las mismas (Dean *et al.*, 2012).

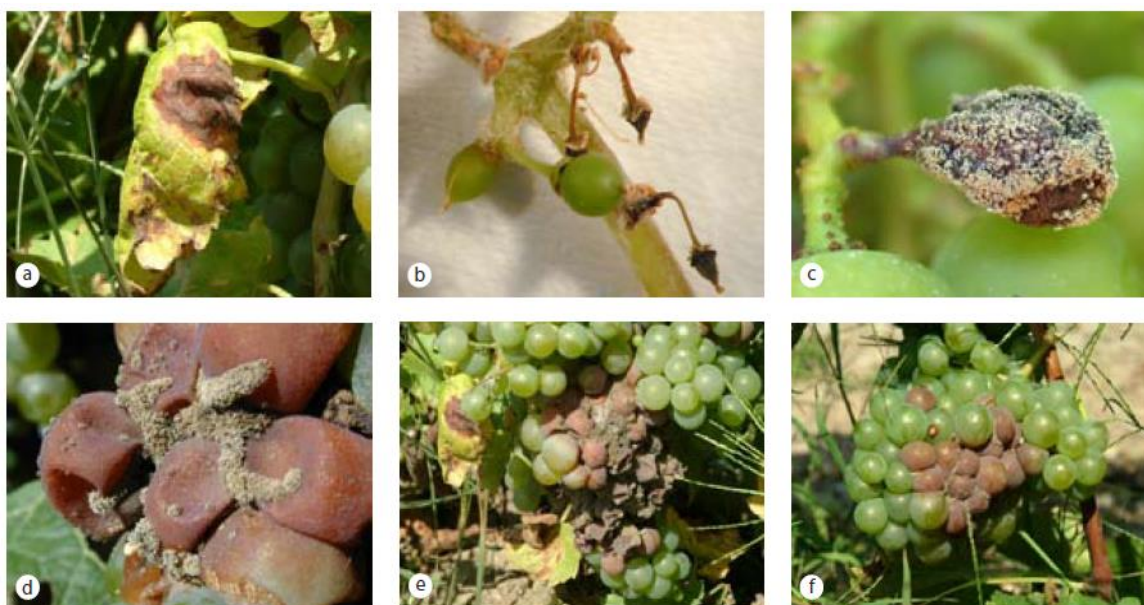


Figura 4. Síntomas y lesiones típicas causadas por *Botrytis cinerea* en vid. a) Puntos necróticos café sobre las hojas, b) Inflorescencias dañadas en etapa de verasion, c,d) Efecto sobre frutos inmaduros ocasionado por cobertura de esporas del hongo, e,f) Efecto sobre fruto maduro. Tomado de Carisse *et al.*, (2006).



### **3.2.3 Vías de infección y factores que promueven la incidencia de *Botrytis cinerea***

Particularmente, en la vid el modo de infección ha sido categorizado en siete vías principales por Elmer y Michailides (2007) y Ciliberti *et al.*, (2015):

- 1) Infección de los conidios por los estilos y óvulos de la planta.
- 2) Infección de estambres o pétalos, a veces ambos.
- 3) Infección del fruto por el pedicelo.
- 4) Infección de conidios y colonización extensiva de escombros florales.
- 5) Acumulación de conidios dentro del grupo de desarrollo.
- 6) Infección de conidio en fruta madura.
- 7) Acumulación de conidios en la fruta y la dispersión sobre las heridas.

Seguido de cualquier vía de infección, las esporas de este patógeno germinan en condiciones de humedad y temperatura adecuadas (Prins *et al.*, 2013). Para posteriormente penetrar y establecerse en el tejido vegetal, donde se producirá una lesión primaria. En muchos casos puede presentarse un período de latencia en el hongo, como respuesta a los mecanismo de defensa de la planta (Williamson *et al.*, 2007). Finalmente el hongo vence estas barreras y continúa su proceso de infección, que culmina con necrosis del tejido hospedero y la producción de esporas (Dean *et al.*, 2012; Prins *et al.*, 2013).

Las condiciones climáticas como la humedad relativa (90-94 %), la temperatura (21-26 %) y la velocidad del viento (0.3-0.6 m/s) (Ciliberti *et al.*, 2015), así como propiedades intrínsecas de las plantas, como el estatus nutricional, juegan un papel determinante en la emergencia de enfermedades producidas por hongos (Williamson *et al.*, 2007). En cuanto a las características de la podredumbre gris, que juegan un papel importante en su incidencia y aparición, se incluyen las reacciones de hipersensibilidad, la susceptibilidad de la variedad de vid hospedera, las prácticas de cultivo, así como su nivel de patogenicidad y virulencia (Govrin y Levine, 2000; Keller, 2015).

### **3.3 Métodos de detección de hongos fitopatógenos**

Para la identificación de hongos se emplean diferentes métodos, por ejemplo, los denominados clásicos, los serológicos y los moleculares, estos últimos resultan de mayor ayuda debido a que suelen ser rápidos y específicos (Sanzani *et al.*, 2012).

### **3.3.1 Métodos clásicos**

Los métodos de detección clásicos permiten identificar una especie por sus características morfológicas o respecto a un proceso metabólico distintivo (Gupta *et al.*, 2012). Usualmente, se recurre al microscopio óptico para identificar estructuras y medios selectivos en los que crece el hongo produciendo compuestos derivados de su metabolismo (Pitt y Hocking, 2012). Sin embargo, la experiencia del personal puede definir el éxito de la clasificación adecuada, ya que existe variaciones importantes aún entre cepas de la misma especie, además de que estos procedimientos suelen llevar tiempo (Sanzani *et al.*, 2012). Por esta razón es conveniente la implementación de tecnologías que validen los resultados obtenidos.

### **3.3.2 Métodos serológicos**

La serología consiste en la detección de un agente etiológico por medio de reacciones de un antígeno, que puede ser alguna proteína de la membrana celular del patógeno, y un anticuerpo, proteína que se une a un antígeno específico; este tipo de métodos permiten reconocer la presencia de hongos patógenos en muestras de tejidos vegetales, en matrices de suelo de cultivos e incluso en muestras de agua empleada para riego (Pettitt *et al.*, 2002). Algunas de estas técnicas posibilitan cuantificar el inóculo de un patógeno presente en una muestra, ejemplos de ello son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y la microscopia por inmunofluorescencia (Martinelli *et al.*, 2015). La desventaja de estos métodos incluyen los costos por la producción de anticuerpos, el equipo para realizar algunos de estos ensayos, algunos falsos positivos por la relativa baja especificidad de anticuerpos y, se ha descrito que su uso está más adecuado para la detección de virus (Fang y Ramasamy, 2015).

### **3.3.3 Métodos moleculares**

Las técnicas moleculares han sido un instrumento eficiente para la detección de patógenos en plantas (McCartney *et al.*, 2003). La actualización de bases de datos digitales y el acceso público a las mismas permiten que no sea un procedimiento limitado a ciertos grupos (Bridle, 2013).



Determinados ejemplos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (por sus siglas en inglés) y sus variantes como, el PCR en tiempo real, la PCR cuantitativa e incluso una combinación con serología, la PCR de inmunocaptura (Ward *et al.*, 2004).

### 3.3.4 Reacción de la cadena de la polimerasa

La PCR, es una técnica desarrollada por Kary B. Mullis, quien ganó el premio nobel en 1993 por este invento (Rabinow, 2011). Esta técnica consiste en la selección de una zona específica del genoma, que puede ser un gen, para generar miles de copias del mismo a partir de la inducción artificial del proceso de replicación del ADN (Erlich, 2015). Las etapas de la PCR son: la **desnaturalización**, que abre la cadena de ADN, el **alineamiento**, que sirve para pegar los cebadores específicos a la zona blanco de la cadena y que servirá como sitio de inicio para la polimerasa, y la **extensión**, que implica la replicación de la secuencia blanco por parte de la polimerasa, Figura 5 (Kennedy, 2011; Erlich, 2015).

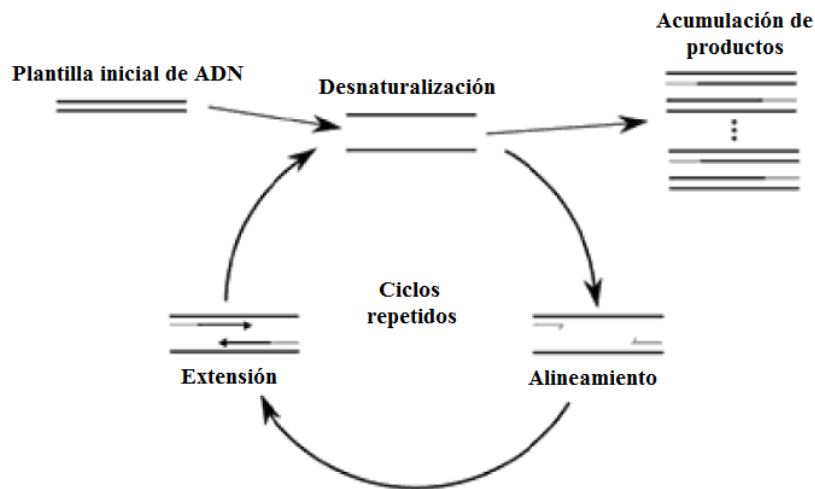


Figura 5. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa. Se muestran las etapas de la PCR: desnaturalización, alineamiento y la extensión. Tomado de Kennedy (2011).

Durante la aplicación de la PCR, existen diferentes puntos de atención para una buena práctica de ésta técnica, por ejemplo, la integridad y pureza de la plantilla inicial de ADN con la que se esté trabajando ya que de lo contrario la reacción no procederá (Kennedy, 2011).

En la etapa de alineamiento es necesario disponer de cebadores u oligonucleótidos específicos para que se unan al ADN, algunos autores como Rigotti *et al.*, (2002; 2006) han diseñado algunos para identificar diferentes cepas de *Botrytis cinerea*. De la misma manera, la cantidad de ciclos, entre 25 a 40, y el tiempo de cada una de las etapas, respecto a lo largo de la cadena a amplificar, facilitarán el curso de la PCR (Kennedy, 2011) y generaran la copias necesarias para fines de la detección.

### **3.3.5 PCR para la detección de enfermedades en cultivos**

Una ventaja del uso de la PCR es la detección de un patógeno antes del establecimiento de la enfermedad o durante el proceso de colonización del hospedero donde aún no se presentan signos y síntomas (De Boer y López, 2012). Esto se debe a que la amplificación por esta técnica no necesita cantidades grandes de ADN para ejecutar una reacción (Sanzani *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2014). Por lo que se puede extraer ADN a partir de esporas. El Cuadro 2 muestra algunos ejemplos de enfermedades producidas por hongos y detectadas mediante la PCR en cultivos.

Cuadro 2. Detección de enfermedades producidas por hongos en distintos cultivares mediante PCR.

Cultivar/ hospedero	Patógeno	Gen de referencia	Par de cebadores	Tamaño de banda esperado	Referencia
Jitomate	<i>Alternaria</i> spp.	ITS	Alt4/Alt5	240 pb	(Crespo-Sempere <i>et al.</i> , 2013).
Trigo	<i>Septoria tritici</i>	$\beta$ -tubulina	E1/STSP2R	496 pb	(Fraaije <i>et al.</i> , 1999).
Trigo	<i>Microdochium nivale</i> var. <i>nivale</i>	Fragmento RAPD	Y13NF/Y13NR	300 pb	(Nicholson <i>et al.</i> , 1996).
	<i>Microdochium nivale</i> var. <i>majus</i>		Y13MF/Y13MR	220 pb	
Trigo	<i>Fusarium poae</i>	Fragmento RAPD	Fp82 F/Fp82 R	220 pb	(Parry y Nicholson, 1996).
Cereales	<i>Gaeumannomyces</i> spp.	ITS	pGt1/pGt2	356 pb	(Bryan <i>et al.</i> , 1995).

### 3.4 Métodos de control de la podredumbre gris

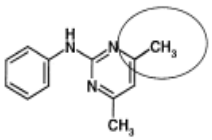
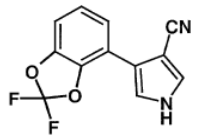
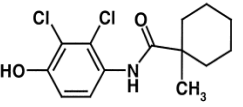
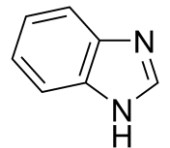
Los métodos de control de enfermedades son una parte fundamental para disminuir las pérdidas en la producción de un cultivo, ya sea antes o después de la cosecha. Éstos métodos puede aplicarse en diferentes etapas del desarrollo de un cultivo, pero esto dependerá del patógeno blanco al que se pretende controlar. El control de especies de *Botrytis*, por ejemplo, se ha enfocado en desarrollar compuestos de síntesis química para evitar el desarrollo y establecimiento de la enfermedad producida por este hongo (Romanazzi *et al.*, 2016). Sin embargo, se puede optar por el uso de otros métodos como el control cultural y el control biológico alternativos a los fungicidas de síntesis química. A continuación se describen los tres tipos de control antes mencionados.

#### 3.4.1 Control químico

Debido a que *Botrytis cinerea* es un patógeno que posee una amplia gama de hospederos y genera grandes pérdidas en la producción, existe una carrera en la industria del desarrollo de diferentes fungicidas químicos de síntesis con alta actividad contra éste fitopatógeno (Rosslenbroich y Stuebler, 2000). Así se han obtenido un amplio catálogo de compuestos denominados “*Botrycidas*” como se observa en el Cuadro 3.

A lo largo del tiempo, los fungicidas de síntesis química han mostrado resultados favorables en el control de enfermedades en campo, pero recientes estudios evidencian la aparición de cepas resistentes provenientes de cultivos de vid; pese a que este índice es bajo, la transmisión de esta capacidad, que subyace en su genoma, es permanente (Brink *et al.*, 2017). Uno de los mecanismos de resistencia en hongos es la sobreexpresión de genes asociados al metabolismo de fungicidas, por ejemplo, en *Botrytis cinerea* los compuestos como las anilino pirimidinas (Cuadro 3) aumentan la expresión de MDR1 y los fenilpirroles como el fludioxonil, inducen la expresión del gen AtrB, ambos genes producen proteínas encargadas de la exportación de fármacos fuera de la célula y también, reducen la sensibilidad a algunos fungicidas (Kretschmer *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Fungicidas empleados para el control de *Botrytis cinerea*. Basado en Rosslenbroich y Stuebler, (2000) y Rimelspach *et al.*, (2004).

Botrycida	Estructura química/ejemplo	Modo de acción	Productos comerciales
Anilino pirimidinas	 <p>Pyrimethanil</p>	Inhiben la elongación del tubo germinal y crecimiento del micelio.	Vanguard
Fenilpirroles	 <p>Fludioxonil</p>	Inhiben la germinación de esporas, la elongación del tubo germinal y el crecimiento del micelio.	Medallion, Maxim
Hidroxianilina	 <p>Fenhexamid</p>	Inhiben la elongación del tubo germinal y el crecimiento del micelio, en altas concentraciones inhiben la germinación de esporas.	Elevate, Decree
Benzimidazoles		Afectan la reproducción celular.	Benlate, Tersan 1991, Mertect 340-F, Arbotect 20-S, Decco Salt No. 19, Topsin M, Regal, Halt

Dadas las condiciones anteriores, el uso indiscriminado de fungicidas actúa como perturbadores de la eficacia biológica, lo cual deriva en presión de selección y la persistencia de genotipos de resistencia (Fernández-Ortuño *et al.*, 2015). Aunado a esto, cabe mencionar que los fungicidas de síntesis química tienen también un efecto nocivo a la salud humana y a los ecosistemas, al absorberse y magnificarse en los organismos (Myung y Klittich, 2015).

### **3.4.2 Control cultural**

El control cultural es una práctica de prevención contra patógenos donde se crean condiciones desfavorables para su crecimiento durante el periodo de desarrollo de un cultivo (Melander *et al.*, 2005; Walters, 2009). Algunos de los procesos incluyen mejorar las condiciones de nutrición y crecimiento de plantas, el control de la humedad y la labranza mínima (Walters, 2009).

Particularmente contra *Botrytis cinerea* se realiza una poda de las hojas después de la floración y se eliminan las hierbas para disminuir el contacto con especies infectadas (Melander *et al.*, 2005; Molitor *et al.*, 2015).

### **3.4.3 Control biológico**

Actualmente, el manejo de los cultivos se ha visto modificada mediante presupuestos acorde lo que dicta la ecología con el fin de reducir el impacto a los agroecosistemas. Éstos últimos son considerados nichos con gran variedad de microorganismos, algunos asociados a determinados tipos de suelos y plantas. El estudio de todas estas asociaciones contribuyen directamente sobre la nutrición y salud de la planta, así como de la fertilidad del suelo (Lemanceau *et al.*, 2015). Una de las interacciones bióticas que ocurren entre en los agroecosistemas es el antagonismo, en la que un organismo impide el desarrollo o crecimiento de otro (Janisiewicz y Korsten, 2002). La utilización de especies con esta capacidad ha sido un mecanismo con amplio potencial para combatir enfermedades en cultivos, y a esto se le ha denominado control biológico o biocontrol (Narayanasamy, 2013).

Los mecanismos de acción del antagonismo han sido bien estudiados y descritos por distintos autores, Sharma *et al.*, (2009) enlista cuatro tipos principales que incluyen: 1) La competencia por espacio y nutrientes, 2) La producción de sustancias antimicóticas, 3) El parasitismo directo, y 4) La inducción de resistencia, proceso en el que el antagonista estimula a la producción de sustancias de defensas a las plantas hospederas. Otros autores como Bernard *et al.*, (2012) incluyen un quinto mecanismo, la hipovirulencia, descrita como la atenuación en la capacidad de los patógenos de producir enfermedad debido a pequeñas modificaciones genéticas por medio de factores nucleares o citoplasmáticos.

La ventaja del control biológico, sobre fungicidas químicos de síntesis, es que no produce daños al ambiente ni a la salud humana (Sharma *et al.*, 2009). Y en algunos casos, los organismos promueven el crecimiento de la planta al mejorar el estatus de los nutrientes en esta (Vessey, 2003).

Algunos organismos utilizados para combatir enfermedades contra hongos son: levaduras, bacterias e incluso otros hongos saprofitos (Sharma *et al.*, 2009).

#### **3.4.3.1 Levaduras**

Las levaduras saprofitas son organismos con capacidad antagónica hacia hongos (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). Este grupo de organismos secretan compuestos que inhiben el crecimiento de especies susceptibles, como mecanismo antagónico (Santos *et al.*, 2004). También pueden competir por nutrientes, inducir resistencia del hospedero y micoparasitar (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Las especies de levaduras que han sido reportadas para su uso en el biocontrol incluyen a *Sacharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia membranifaciens*, *P. anomala*, *Candida sake* y *Debaryomyces hansenii* (Cuadro 4) algunas pueden presentar antagonismo contra *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.*, 2008; Calvo-Garrido *et al.*, 2013).

### 3.4.3.2 Hongos

Los hongos filamentosos también poseen la capacidad de antagonismo contra otros grupos de hongos (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Sharma *et al.*, 2009); algunas especies utilizadas incluyen *Trichoderma harzinum* y *Trichoderma viridae* (Cuadro 4) que presentan actividad contra *Botrytis* sp., incluso promueven el crecimiento de plantas (Pande *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2009).

### 3.4.3.3 Bacterias

Las bacterias son el grupo con mayor demanda para su empleo en el control biológico (Sharma *et al.*, 2009). Esto, debido a las ventajas que no solo se restringen al antagonismo, ya que, a modo de *Trichoderma*, este tipo de organismos tiene la capacidad de promover el crecimiento de plantas (Trivedi *et al.*, 2012). Esto ocurre al potenciar la disponibilidad de nutrientes, aumentar la fijación de nitrógeno y aumentar el área superficial de la raíz (Vessey, 2003).

La posibilidad de beneficiarse de ambas características hace que las bacterias sean excelentes organismos biocontroladores. Los grupos comerciales más utilizados para control de fitopatógenos son *Pseudomonas* y *Bacillus*, Cuadro 4 (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

*Bacillus* es un género utilizado para controlar fitopatógenos, e incluso plagas, y se han formulado diferentes productos comerciales a base de estas bacterias (Shafi *et al.*, 2017). Generalmente *Bacillus* se encuentra asociado a la rizósfera de las plantas y en el suelo, ya que también actúan como biofertilizante. Entre las sustancias involucradas en el antagonismo, producidas por este género, se encuentran lipopéptidos, quitinasas y sideróforos (Kim *et al.*, 2004).



Cuadro 4. Antagonistas microbianos reportados para control de enfermedades en pos cosecha de frutos y hortalizas. Tomado de Sharma *et al.*, (2009).

<b>Antagonista</b>	<b>Enfermedad / Agente causal</b>	<b>Hospedero</b>
<i>Acremonium brevae</i>	Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Manzana
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pudrición Monilinia ( <i>Monilinia laxa</i> )	Plátano
	Pudrición suave ( <i>Monilinia laxa</i> )	Uva
	Pudrición de tallo final ( <i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.)	Aguacate
<i>Bacillus subtilis</i>	Pudrición por <i>Botrytis</i> ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Cereza
	Moho verde ( <i>Penicillium digitatum</i> )	Cítricos
<i>Bacillus pumilus</i>	Pudrición por <i>Alternaria</i> ( <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler)	Lichi
	Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Durazno
<i>Burkholderia cepacia</i>	Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Pera
	Antracnosis ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Plátano
<i>Candida guilliermondii</i>	Pudrición de flores ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Plátano
	Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Tomate
<i>Candida sake</i> (CPA-1)	Pudrición por <i>Penicillium</i> ( <i>Penicillium expansum</i> )	Manzana
	Podredumbre gris ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Manzana y
<i>Candida oleophila</i>	Pudrición por <i>Penicillium</i> ( <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>P. italicum</i> )	Cítricos
	Podredumbre verde y azul ( <i>Penicillium digitatum</i> y <i>P. italicum</i> )	Cítricos
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Podredumbre verde y azul ( <i>Penicillium digitatum</i> y <i>P. italicum</i> )	Cítricos
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Pudrición por <i>Botrytis</i> ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Uva
<i>Pantoea agglomerans</i>	Podredumbre verde y azul ( <i>Penicillium digitatum</i> y <i>P. italicum</i> )	Cítricos
<i>Penicillium</i> sp. Cepas atenuadas	Pudrición por <i>penicillium</i> ( <i>Penicillium</i> sp.)	Piña
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum gloesporoides</i> )	Albaricoque
<i>Pichia guilliermondii</i>	Podredumbre azul ( <i>Penicillium expansum</i> )	Manzana
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Podredumbre azul ( <i>P. expansum</i> )	Manzana
<i>Trichoderma harzinum</i> , <i>T. viridae</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum musae</i> ), Podredumbre verde ( <i>Penicillium digitatum</i> )	Fresa, Cítricos

### 3.4.4 Moléculas de control biológico de *Bacillus*

La producción de moléculas que se encuentran más ligadas al antagonismo, son las quitinasas, lipopéptidos y sideróforos, si bien estos últimos son reconocidos por la función de estimular el crecimiento en plantas, indirectamente colaboran en el antagonismo (Sharma *et al.*, 2009; Raaijmakers y Mazzola, 2012). A continuación se hace hincapié en los mecanismos de acción de las moléculas mencionadas:

a) Las quitinasas son enzimas encargadas de hidrolizar quitina (Figura 6a), está última es una proteína que constituye las paredes celulares de hongos y del exoesqueleto de los artrópodos (Narasimhan y Shivakumar, 2012). Por lo tanto, las quitinasas, son de gran utilidad para controlar fitopatógenos (Ghafil, 2013). Bacterias como *Bacillus* producen estas moléculas con el fin de metabolizar la quitina y, utilizarla como fuente de carbono y energía (Narasimhan y Shivakumar, 2012).

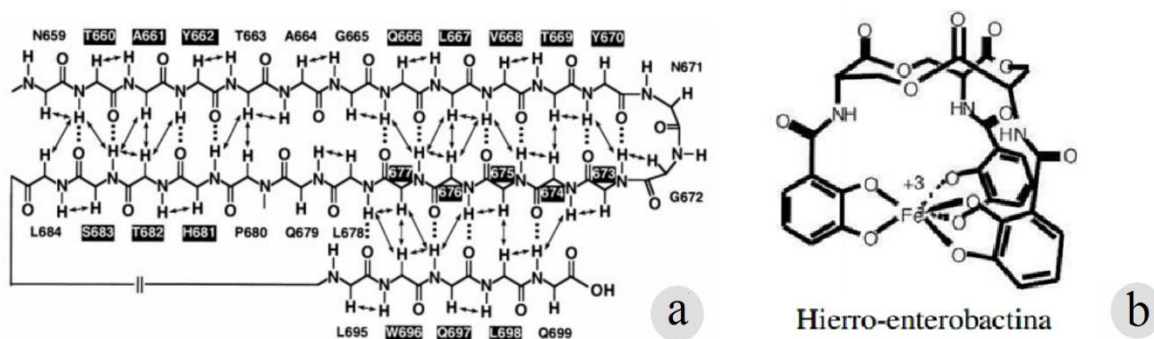


Figura 6. Estructura de quitinasas y sideróforos. Se muestra a) quitinasa estructural y b) sideróforo. Imágenes tomadas de Ikegami *et al.*, M. 2000 y Balado-Dacosta, (2009).

b) Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro que facilitan la disponibilidad de este elemento para las plantas (Ver Figura 6b). Esto ocurre mediante la unión de alta afinidad de los sideróforos hacia el hierro, lo que permite el transporte de este último de la membrana hacia el citoplasma de las células (Fukushima *et al.*, 2013). La producción de estas moléculas en bacterias antagonistas estimula la captura del hierro en las raíces y limita la disponibilidad de este elemento hacia hongos patógenos de cultivos, lo que impide su desarrollo (Saha *et al.*, 2013).

c) Por último, los lipopéptidos son sustancias que tienen la capacidad para inhibir el crecimiento de organismos susceptibles, poseen actividad antimicrobiana y citotóxica (Raaijmakers *et al.*, 2010). Estos compuestos afectan la síntesis de la pared celular, la síntesis del ADN y proteínas (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Los principales lipopéptidos de *Bacillus* están agrupados en tres familias: las surfactinas, las iturinas y las fengicinas (Raaijmakers *et al.*, 2010).

#### **3.4.4.1 Lipopéptidos de *Bacillus*: Estructura y función**

Los lipopéptidos bacterianos son compuestos biodegradables y no tóxicos a los ambientes naturales (Abouseoud *et al.*, 2008). Existen tres familias principales: las surfactinas, las iturinas y las fengicinas (Jasim *et al.*, 2016).

Las surfactinas engloban variantes heptapéptidos como la esperina, la lichenisina, pumillacidina y la surfactina, que están ligadas a un ácido graso  $\beta$ -hidroxi que contiene de 12 a 16 carbonos para formar una estructura de anillo cíclico de lactona, como se muestra en la Figura 7a (Ongena y Jacques, 2008; Raaijmakers *et al.*, 2010). Las funciones de las surfactinas son proteger a la planta de infecciones, causar hinchazón de las hifas, inhibir el crecimiento y destruir la bicapa lipídica de hongos fitopatógenos (Stein, 2005; Ongena y Jacques, 2008; Raaijmakers y Mazzola, 2012).

Dentro de la familia de las iturinas se encuentra la micosubtilina, el primer antibiótico descrito de *Bacillus subtilis* (Jacques, 2011) y la iturina A, el lipopéptido de mayor actividad antibiótica con un amplio espectro antifúngico (Arrebola *et al.*, 2010). Otros ejemplos de iturinas, con las bacilomicinas D, F y L, así como la iturina C. De igual manera que las surfactinas, la estructura de las iturinas (Figura 7b) incluye un heptapéptido, en este caso unido a una cadena de ácidos grasos  $\beta$ -amino que puede variar en tamaño de entre 14 a 17 carbonos (Raaijmakers *et al.*, 2010).

La función principal de estas moléculas es la de generar canales entre las dos capas de la membrana plasmática del hongo, permitiendo así la liberación de iones vitales como el potasio (Jasim *et al.*, 2016). Junto con las surfactinas, son los antibióticos más reportados en *Bacillus* (Athukorala *et al.*, 2009).

Por último, las fengicinas, también llamadas plipastatinas están constituidas por lipodecapéptidos con un anillo de lactona interno y una cadena de ácidos grasos  $\beta$ - hidroxil con 14 a 18 carbonos (Ongena y Jacques, 2008). Estas moléculas inhiben fuertemente hongos filamentosos, y como las iturinas, también pueden inducir el sistema de resistencia en plantas (Ongena *et al.*, 2007). Las fengicinas tienen la capacidad de frenar la actividad de la fosfolipasa A2 en hongos, pero su blanco de acción es la membrana plasmática de células sensibles (Nasir *et al.*, 2013), ya que interactúa con las moléculas de esteroles y los fosfolípidos de ésta alterando su estructura y permeabilidad (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2017).

Las surfactinas y fengicinas tienen dos anillos de macrolactona, pero en la primera familia el cierre es catalizado entre la cadena de ácidos grasos  $\beta$ - hidroxil y el péptido C-terminal (Ver Figura 7a), mientras que las fengicinas se cierra en el lado del sitio de tirosina de la cadena en la posición 3 del péptido secuencia para formar un enlace éster en el residuo terminal C (Ver Figura 7c) (Raaijmakers *et al.*, 2010).

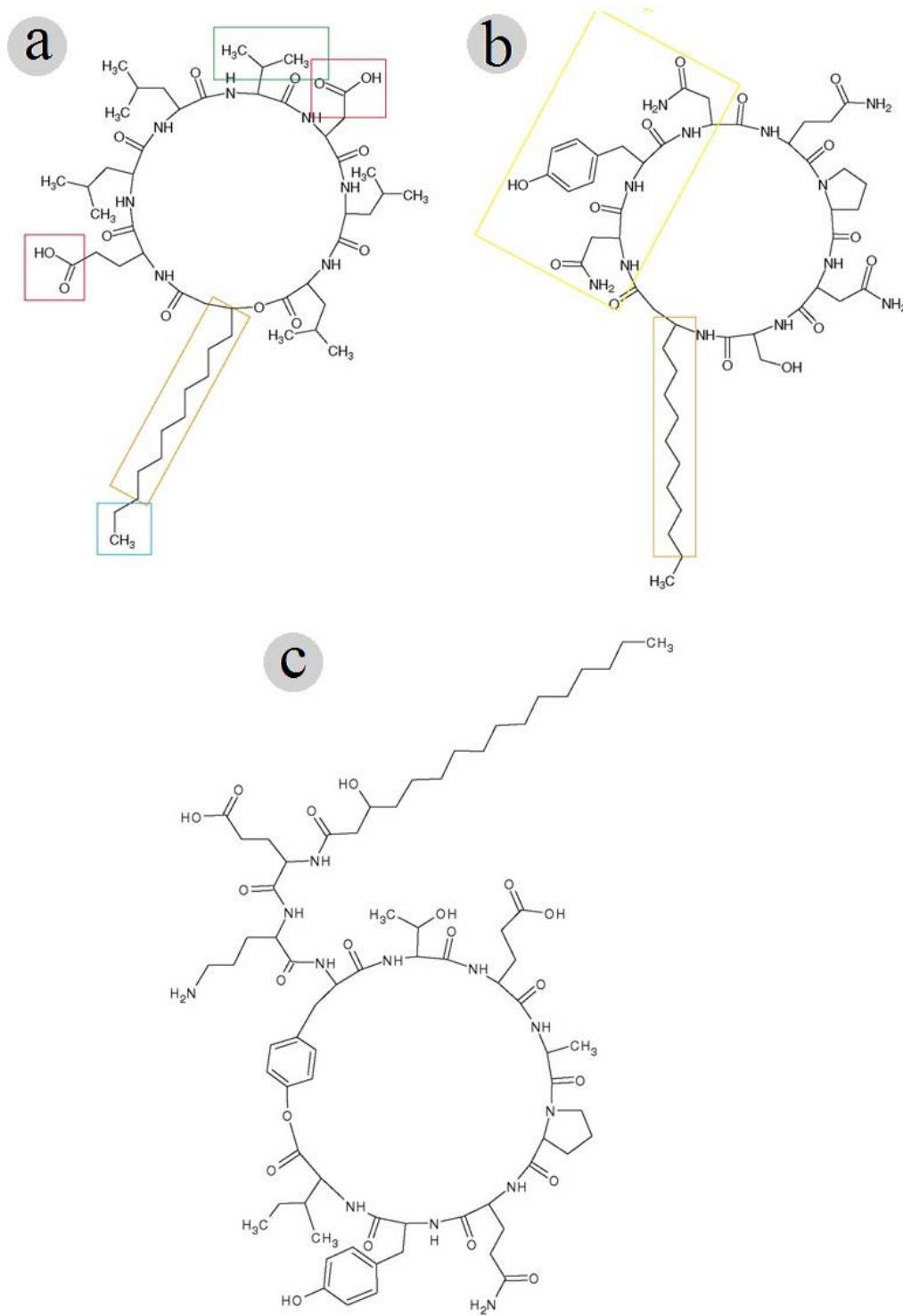


Figura 7. Estructura de lipopéptidos. a) Surfactina, b) Iturina y c) Fengicina. Tomado de Ongena y Jacques (2008).

#### **IV. HIPÓTESIS**

La amplificación de marcadores específicos de *Botrytis cinerea*, patógeno del cultivo de vid, permitirá su detección en etapa temprana de infección en frutos; y el uso de la cepa Q11 de *Bacillus subtilis*, producto comercial diseñado para el biocontrol de *Fusarium* spp., tendrá un efecto antagonista sobre el fitopatógeno debido a que esta produce compuestos inhibidores del crecimiento de hongos, tales como los lipopéptidos.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Detectar a *Botrytis cinerea* en etapas de infección en frutos de vid y evaluar el efecto antagonico de *Bacillus subtilis* Q11 sobre aislados de *Botrytis in vitro* e *in vivo*.

### 5.2 Específicos

- 1) Determinar la incidencia de *Botrytis cinerea* en frutos de cultivos de vid mediante PCR convencional.
- 2) Evaluar el efecto antagonico de *Bacillus subtilis* Q11 sobre *Botrytis cinerea* en plantas de vid.
- 3) Identificar los compuestos relacionados al antagonismo de hongos en *Bacillus subtilis* Q11.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Determinación de la incidencia de *Botrytis cinerea* en frutos de cultivos de vid mediante PCR convencional

#### 6.1.1 Colecta de muestras de vid

Durante la campaña de septiembre de 2015, se colectaron muestras de tres viñedos pertenecientes al estado de Querétaro: Finca el Rosario ( $20^{\circ}42'06.24''\text{N}$ ,  $100^{\circ}11'54.06''\text{O}$ ), ubicada en El Marqués, Bodegas de Cote ( $20^{\circ}41'47.88''\text{N}$ ,  $99^{\circ}52'48.42''\text{O}$ ) y Viñedos Azteca ( $20^{\circ}41'43.12''\text{N}$ ,  $99^{\circ}52'17.59''\text{O}$ ) ubicados en Ezequiel Montes (Figura 8).

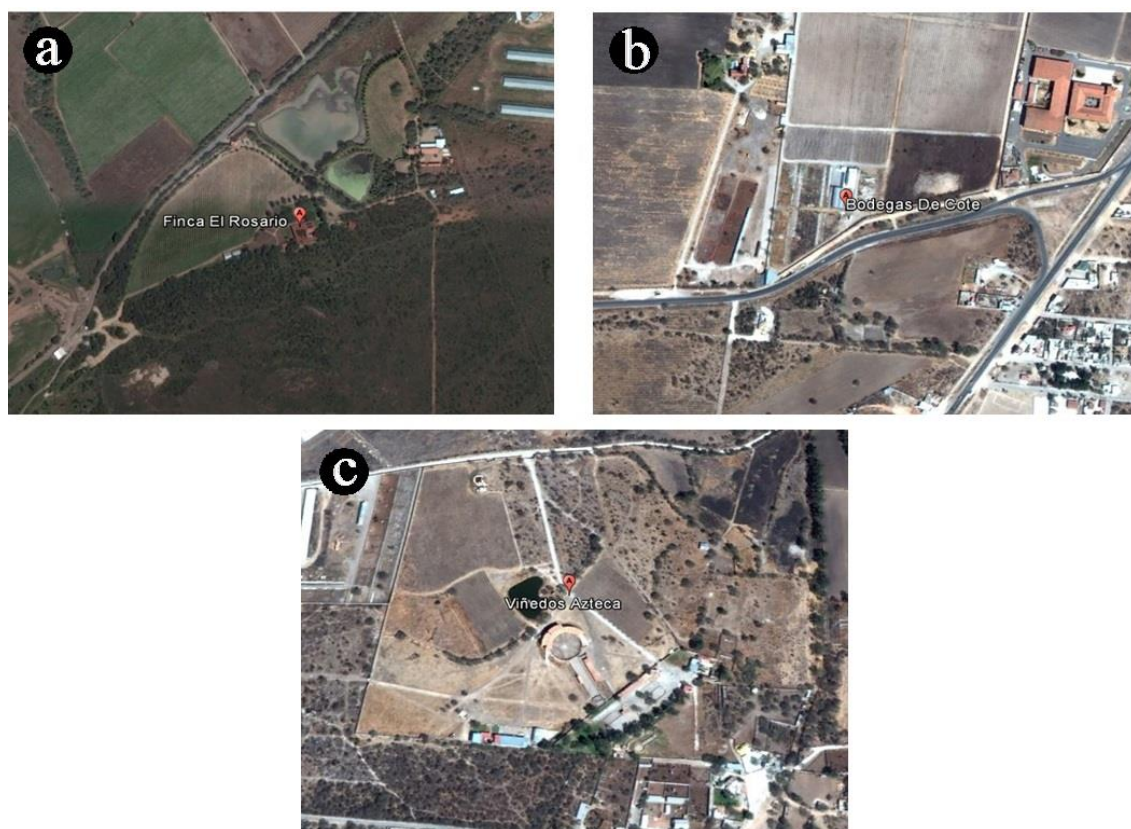


Figura 8. Fotografías aéreas de los viñedos de estudio. a) Finca el rosario, b) Bodegas de Cote y c) Viñedos Azteca. Imágenes tomadas de Google earth (2016).

En cada uno de los viñedos las parcelas de muestreo se eligieron al azar de la cv. Merlot., para cada una de las parcelas se formaron cuatro bloques de siete plantas, lo que conformó una unidad experimental, de ésta última se tomaron 20 racimos de 10 uvas, 10 de ellos expuestos al sol y 10 más de la sombra (Figura 9).



Las muestras se etiquetaron y fueron llevadas al Laboratorio de Fermentaciones y fisiología de frutas y hortalizas, de la Facultad de Química, UAQ, en donde los frutos se dividieron en dos lotes, un racimo de 10 uvas se dividió en dos de 5 uvas. El primer lote se conservó a -20 °C, y el segundo se empleó para la estandarización de las extracciones de ADN y PCR convencional.

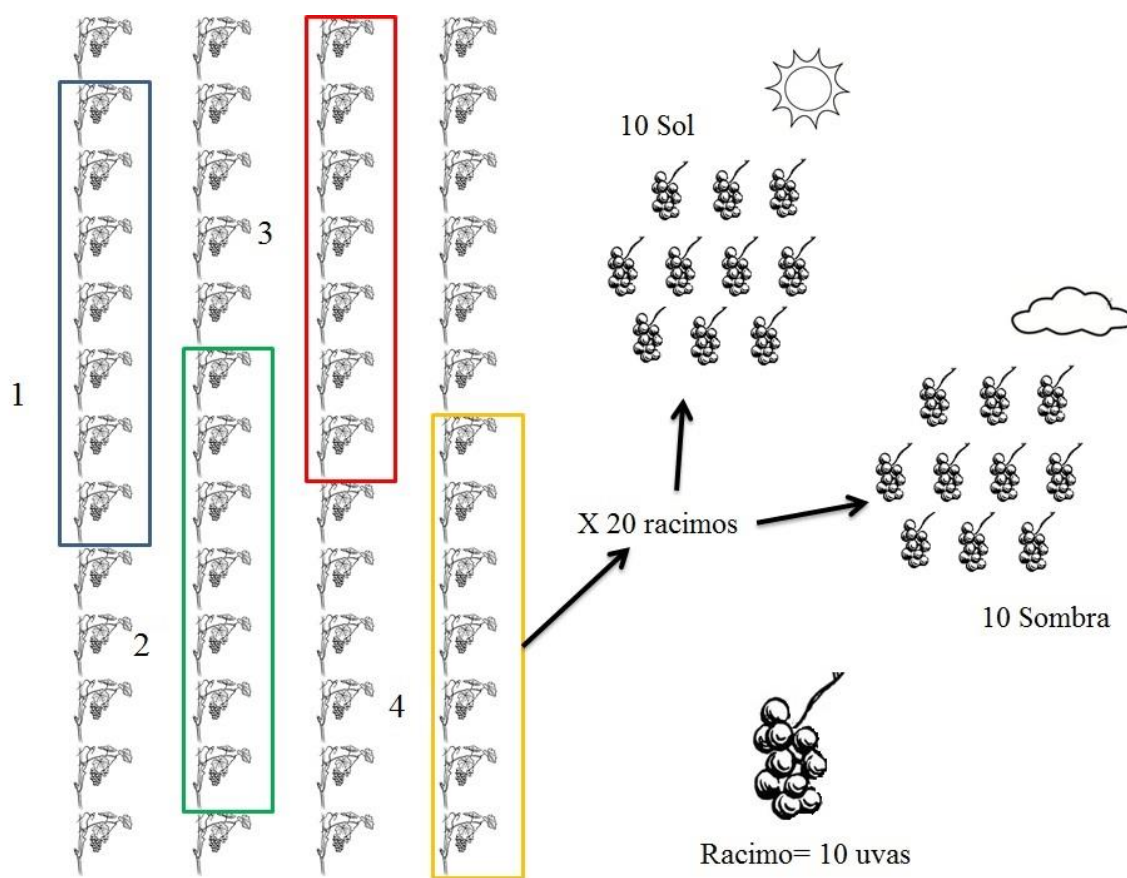


Figura 9. Esquema del diseño de muestreo de frutos.

### 6.1.2 Aislamiento de *Botrytis cinerea* de muestras de vid

Muestras del segundo lote fueron colocadas en cámaras húmedas a 4°C durante 15 días para aislar *Botrytis*, que posteriormente se mantuvieron en placas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) hasta obtener un cultivo puro. Posteriormente se determinó la especie de hongo por medio de la morfología del micelio y las esporas de acuerdo a Khazaeli *et al.*, (2012).

### **6.1.3 Extracción de ADN a partir de material vegetal infectado *in vitro***

Para extraer el ADN de esporas en fruto, fue necesario evaluar diferentes métodos para procesar las muestras y así evitar interferencia del ADN del material vegetal. Por lo que primero se cosecharon esporas de *Botrytis cinerea* de 10 a 12 días de crecimiento en cajas Petri con PDA, se raspó la superficie del hongo con una pipeta estéril y el micelio obtenido se depositó en 5 mL de una solución Tween 20 al 20 %. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex, y después se llevó a sonicación por 10 minutos en un Sonicador ultrasónico Autoscience® (modelo AS5150B, 180 W) con la finalidad de separar las esporas del micelio. Después, se tomaron 10 µL de esta solución para realizar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Finalmente, la solución se filtró con gasa estéril. La fruta colectada de los viñedos fue lavada y desinfectada con una solución de hipoclorito comercial al 2 %, después fue llevada a secar en una campana de flujo donde se infectó con la solución de esporas de *Botrytis cinerea* por inmersión.

Las muestras de uva que resultaron infectadas del proceso, anteriormente mencionado, fueron sometidas a diferentes tratamientos previos a la extracción de ADN, los cuales se describen a continuación:

a) Extracción directa: La cutícula de la vid infectada se separó del fruto con pinzas estériles y se colocó en la solución TNES (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 %), para proseguir con el protocolo de extracción ADN.

b) Congelación rápida de fruto con nitrógeno líquido: La vid infectada se congeló con nitrógeno líquido, en ese estado el fruto fue molido hasta conseguir un polvo, del cual se tomó 1 g para las extracciones (Möller *et al.*, 1992).

c) Método de enriquecimiento: Las muestras de uva infectada fueron colocadas en 30 mL de medio de cultivo líquido Agar nutritivo dextrosa para levaduras (NYDB) e incubadas por 72 horas a 30°C. Pasado el tiempo, se separó el fruto del medio, y éste último fue centrifugado por 30 minutos a 3000 rpm para concentrar los microorganismos que crecieron, posteriormente se decantó el sobrenadante y lo que quedó en el fondo del tubo se utilizó para las extracciones de ADN.

A Cada una de la muestras de los diferentes tratamientos se aplicó el protocolo de extracción de ADN establecido en el Laboratorio de Fermentaciones y fisiología de frutas y hortalizas, de la Facultad de Química, UAQ. Posteriormente, se midió la concentración y la pureza del ADN por medio de un espectrofotómetro Nanodrop 1000. Se eligió el método que presentó las mejores condiciones de pureza, calidad y concentración de ADN, mediante análisis estadístico de ANOVA y una prueba de Tukey (Castaño y Domínguez, 2010).

#### **6.1.4 Selección de oligonucleótidos y condiciones de la PCR para la detección de *Botrytis cinerea***

Se establecieron las condiciones de la PCR convencional para *Botrytis cinerea* mediante uso de los pares de oligonucleótidos, C729f/C729r y BC108f/BC563r (Cuadro 5). La mezcla para PCR se preparó con 2.5  $\mu$ L de Buffer 10X, 14.375  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada estéril, 2.5  $\mu$ L de dNTPs mix (10 mM), 1.25  $\mu$ L de cada oligonucleótido a 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ L de MgCl (2  $\mu$ M) y 0.125  $\mu$ L de iTAQ DNA *polymerase* (1  $\mu$ M) para cada muestra, y al final se agregó 1  $\mu$ L de ADN muestra para obtener un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L (Sanzani *et al.*, 2012).

Se realizó un gradiente de temperaturas para verificar la temperatura de reacción ideal de los oligonucleótidos en un termociclador Tech-gene ®. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 20 segundos, una temperatura de alineamiento de los cebadores de 50 a 56 °C durante 20 segundos y una temperatura de extensión de extensión de 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 5 min y un posterior mantenimiento de las reacciones a 4 °C (Riggotti *et al.*, 2006).

Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1.2 %. Realizando posteriormente el revelado con bromuro de etidio en un buffer de TAE (Green y Sambrook, 2012). Posteriormente se fotografiaron en un transluminador KODAK 1D 3.6.

Cuadro 5. Secuencias de los oligonucleótidos empleado para la detección de *Botrytis*.

Oligonucleótidos	C729	BC
<i>Sentido</i>	<b>729</b> _AGCTCGAGAGAGATCTCTGA	<b>BC108</b> _ACCCGCACCTAATTCGTCAAC
<i>Antisentido</i>	<b>729</b> - CTGCAATGTTCTGCGTGGAA	<b>BC563</b> - GGGTCTTCGATACGGGAGAA
Tamaño del amplicón	730 pb	480 pb
Anotación que amplifica	Secuencia intergénica de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B23	Secuencia intergénica de <i>Botrytis cinerea</i> cepa B23
Referencia	(Rigotti <i>et al.</i> , 2002)	(Rigotti <i>et al.</i> , 2006)

### 6.1.5 Validación de la especificidad de los cebadores

La especificidad de los cebadores C729f/C729r fue evaluada mediante su amplificación con ADN de diferentes cepas de hongos, levaduras y bacterias asociadas a la vid, y que han sido previamente identificadas. Las cepas aisladas de los viñedos de estudio e identificadas morfológicamente como *Botrytis cinerea* también fueron sujetas a PCR con estos oligonucleótidos (Cuadro 6).

### 6.1.6 Evaluación de la incidencia de *Botrytis cinerea* en viñedos mediante PCR

Una vez establecidos los métodos de procesamiento de muestras para extracción de ADN y la PCR, éstas técnicas fueron usadas para determinar la incidencia de *Botrytis cinerea* latente en bayas de vid previamente muestreadas y conservadas a - 20 °C. Se utilizaron 10 muestras de cinco bayas por unidad experimental para cada viñedo. Primero se empleó el método de enriquecimiento, se extrajo ADN y, posteriormente, la PCR con los oligos C729f/C729r (Fernández *et al.*, 2014).

Cuadro 6. Microorganismos aislados de vid utilizados para validación de oligonucleótidos C729f/C729r.

Clave	Grupo	Género/Especie	Viñedo de procedencia	Clave	Grupo	Género/Especie	Viñedo de procedencia
34-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	K5	Levadura	<i>S. cerevisiae</i>	
10-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	SR33	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario
48-	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	DB10	Levadura	<i>S. paradoxus</i>	Barreno
24-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N56	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario
81-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	O38	levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Barreno
8-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N42	Levadura	<i>S. paradoxus</i>	Barreno
80-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N48	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario
71-E	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N56	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario
6-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	SR22	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario
35-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N49	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Barreno
4-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N26	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Barreno
17-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	N41	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Barreno
18-A	Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	Colección	SB27	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Barreno
C	Levadura	<i>Candida</i> sp.	Colección	Sh-BC8	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
10VA04	Bacteria láctica	<i>L. plantarum</i>	Viñedos Azteca	Sh-BC6	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
IPUZZ	Bacteria láctica	<i>L. plantarum</i>	Freixenet	Sh-BC5	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
N36	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario	Me-RO1	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
820	“	“		Sh-CO1	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
OR7	“	“		Sh-CO2	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
SR36	Levadura	<i>S. cerevisiae</i>	El Rosario	Sh-CO3	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
K1	Levadura	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial	Sh-CO4	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
SA15	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	Viñedos Azteca	Sh-CO6	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
OR11	“	“		Sh-CO7	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodega de Cote
N38	“	“		Sh-RO1	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
SR21	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario	Sh-R02	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
N21	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario	Sh-R04	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
SR35	Levadura	<i>S. paradoxus</i>	El Rosario	Sh-R05	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
SR27	Levadura	<i>S. cerevisiae</i>	El Rosario	Sh-R08	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
SR32	Levadura	<i>Saccharomyces</i> sp.	El Rosario	Me-RO3	Hongo	<i>Botrytis</i>	Rosario
				Me-CO3	Hongo	<i>Botrytis</i>	Bodegas de Cote

## **6.2 Evaluación del efecto antagónico de *Bacillus subtilis* Q11 sobre *Botrytis cinerea* en plantas de vid**

### **6.2.1 Material biológico**

#### **6.2.1.1 Cepa antagonista de *Bacillus subtilis***

La cepa Q11 de *Bacillus subtilis* (Bs<sup>MR</sup>) empleada para los ensayos de antagonismo fue otorgada por la empresa Química Internacional Aplicada S. A. de C. V. ubicada en los Mochis, Sinaloa, México. *Bacillus subtilis* Q11 (BsQ11) es un producto de uso comercial para el control de *Fusarium* spp. en jitomate.

#### **6.2.1.2 Plantas de vid**

Las plantas empleadas para los ensayos de infección y antagonismo pertenecientes a la variedad Ribier, se obtuvieron mediante el método de propagación por estacas (García y Mudarra, 2008). En el que a partir de una planta “madre” preestablecida en un predio particular del municipio de Querétaro, se seleccionaron ramas maduras y lignificadas (sarmientos) de un año de edad durante la etapa fenológica de dormancia. Los sarmientos de un diámetro aproximado de 1 cm o más, se cortaron, primero, debajo del nudo y en forma recta para formar la base y, después, en diagonal por encima del nudo, en el ápice; procurando así que midiera aproximadamente 35 cm de largo. Posteriormente, todos los sarmientos se estratificaron en arena húmeda por 6 semanas.

Posteriormente los sarmientos enraizados (barbados) se sacaron de la arena y se trasplantaron en bolsas negras de 20 x 30 cm, procurando cubrir hasta la mitad de su altura. El sustrato empleado contenía una mezcla de tierra agrícola, tierra de hoja y arena en proporciones 2:1:1 respectivamente (Reynier, 2002) (Figura 10).



Figura 10. Proceso de propagación por estacas de plantas de vid *cv.* Ribier. a) Estratificado, b) Barbado, c) Mezcla de sustratos, d, e) Trasplante, f) Plantas de vid con brotes.

### 6.2.2 Selección de aislados de *Botrytis cinerea* para los ensayos

A partir de los aislados de *Botrytis cinerea* de frutos de vid obtenidos en el presente trabajo, se realizaron ensayos preliminares para seleccionar aquellos que tuvieran la capacidad de infectar tejidos como las hojas de vid. Estudios previos han demostrado que la podredumbre gris se puede desarrollar también en hojas (Aguero *et al.*, 2005; Ronseaux *et al.*, 2013), si bien, no es usual el desarrollo de signos y síntomas en cultivos, es posible encontrar un inóculo en las hojas previo a la infección de frutos y flores. Los aislados fueron crecidos en cajas con agar nutritivo dextrosa para levaduras (NYDA) durante 10 días hasta la aparición de esporas, estas fueron cosechadas con una solución de Tween 20 al 1 %. Cada cepa fue inoculada con 20  $\mu$ L en seis hojas de vid, tres de las hojas infectadas fueron cortadas de la planta y mantenidas en cámaras húmedas. La selección de cepas para el ensayo de antagonismo se determinó por la presencia de manchas oscuras en las hojas (necrosis).

### 6.2.3 Ensayo de antagonismo de *Bacillus subtilis* Q11 en plantas de vid

El efecto antagonístico de *Bacillus* Q11 (BsQ11) se evaluó en las plantas de 6 meses de edad con una altura aproximada de 40 cm (Figura 11a). Primero se lavaron todas las hojas con agua estéril, y para evaluar el antagonismo se destinaron 21 plantas a las que se les aplicó por aspersión 4 mL de una solución que contenía  $1 \times 10^9$  UFC/mL de BsQ11 re suspendidas en agua estéril con carboximetil celulosa al 0.1 % como material adherente (Figura 11b) (El-Hassan y Gowen, 2006). Después de 5 días, se inocularon 3 plantas por cepa de *Botrytis* (SCO1, SCO2, MeRO3, SCO7, BCM y BCQ). 18 plantas se inocularon únicamente con alguna cepa de *Botrytis*, para tener un control de la enfermedad. Y se dejaron tres plantas como controles (20  $\mu$ L solución estéril de Tween 20 al 1 %,) y tres con el antagonista. De cada una se usaron seis hojas, y éstas fue inoculada con 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de *Botrytis cinerea* en Tween 20 al 1 % en tres puntos equidistantes de la hoja (Almoneafy *et al.*, 2014), ver Figura 11 c.

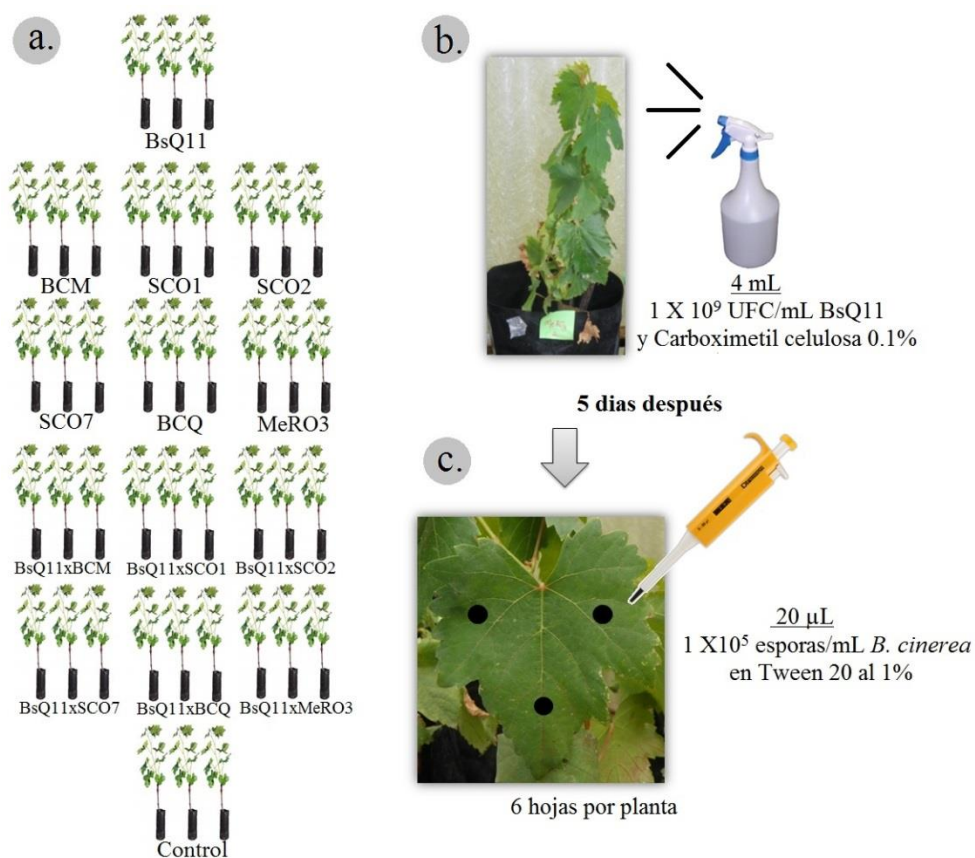


Figura 11. Diagrama del ensayo de antagonismo. a) Organización de plantas para el ensayo, b) Inoculación del antagonista BsQ11 y, c) Inoculación de patógeno.



#### 6.2.4 Análisis de imágenes y seguimiento de la infección

Las plantas fueron supervisadas para el desarrollo de los síntomas de la podredumbre gris hasta los 5 días mediante la toma de fotografías a 20 cm de distancia de la hoja con una cámara Kodak Easyshare Z981 con las siguientes condiciones de toma de imágenes f2.8, 0.52", 0.0, +0.7 e ISO 200 (Wijekoon *et al.*, 2008; Goodwin y Hsiang, 2010).

Las fotografías de las hojas se ajustaron a 1000 pixeles y 300 ppp como lo indica O'Neal (2002) y Murakami *et al.*, (2005), al finalizar se guardaron en formato TIFF mediante el editor de imágenes en línea Pixlr (Wintermute, 2015). Para la cuantificación del nivel de infección se empleó el programa Scion Image en su versión Beta 4.0.2 (Scion Corporation, [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)) de acuerdo a las instrucciones desarrolladas por Murakami *et al.*, (2005). El porcentaje de la enfermedad en la hoja se calculó restando el área foliar enferma del área foliar total (Wijekoon *et al.*, 2008). La eficacia del biocontrol (EB) se calculó mediante la fórmula propuesta por de Xue *et al.*, (2009):

$$EB = \frac{IEC - IEA}{IEC} \times 100 \%$$

Donde, IEC: es la incidencia de la enfermedad control, IEA: incidencia de la enfermedad del grupo tratado con el antagonista.

Adicionalmente se construyeron modelos generalizados lineales (GLM, por sus siglas en inglés) que permiten evaluar efectos aleatorios en datos con distribución normal o binomial (Piepho, 1999; Bolker *et al.*, 2009). Los GLM se emplearon para analizar la contribución de algunos parámetros como la cepa, el biocontrol con BsQ11 y la planta, sobre la enfermedad. Primero se definió la ausencia o presencia de la enfermedad (dicotómica) como variable de respuesta, y factores como la cepa de *Botrytis cinerea*, la presencia de BsQ11, la planta, la hoja y la posición de ésta última como variables explicativas. El modelo incluyó interacciones de tercer grado entre variables y fue verificado en cuanto a su sobredispersión. La selección final del modelo se determinó por criterio de evaluación de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés). Todos los modelos y pruebas se realizaron en el programa estadístico de uso libre R v. 3.3.2.

### **6.2.5 Recuperación de *Bacillus subtilis* de hojas de vid.**

A partir de las plantas de vid empleadas en el ensayo de antagonismo se retiraron las hojas (11 días después del ensayo) para, posteriormente, y con ayuda de una perforadora manual esterilizada con alcohol al 70 %, se cortaran círculos con un área de 0.38 cm<sup>2</sup>. Los círculos se colectaron en un tubo falcón con 50 mL y se adicionaron 40 ml de PBS estéril. Los tubos se dejaron en agitación a 180 rpm por 30 minutos.

Después, de cada tubo Falcón se colocó 1 mL del sobrenadante en tubos Eppendorf estériles. Los tubos se llevaron a pasteurización, en baño María a 80°C por 10 minutos, y enseguida se colocaron en agua con hielo durante 5 minutos. De cada tubo se sembraron 100 µL por extensión en placas con agar nutritivo por triplicado. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas, pasado este tiempo se realizó un conteo de colonias (Kaelin y Gadani, 2000; Collins *et al.*, 2003).

### **6.3 Identificación de los compuestos relacionados al antagonismo de hongos en *Bacillus subtilis* Q11**

#### **6.3.1 Evaluación del antagonismo del sobrenadante de *Bacillus subtilis* Q11**

La prueba de antagonismo se realizó por medio del ensayo de difusión en agar, como lo describe Islam *et al.*, (2012), para ello se sembró una colonia de BsQ11 en 500 mL de caldo nutritivo y se dejó crecer por 72 horas. Pasado el tiempo, el caldo se centrifugó en tubos Falcón de 50 mL y se eliminó la pastilla de bacterias. El sobrenadante se mezcló con el medio de cultivo NYDA y se esterilizó para preparar cajas para los ensayos.

Posteriormente se sembraron discos de 7 mm de diámetro de micelio activo de las cepas de *Botrytis cinerea*. Las cajas fueron incubadas a 30 °C, registrando el crecimiento radial de los hongos cada 24 h con un Vernier digital Marca T&O Modelo 57-016-220.

El ensayo se llevó a cabo por quintuplicado, para cada cepa y para el testigo (sin sobrenadante), el experimento se concluyó cuando los fitopatógenos cubrieron la superficie de las placas testigo.

El porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de inhibición \%} = [(Dt-DT)/Dt] \times 100 \%$$

Donde, Dt es el diámetro del testigo y, DT es diámetro de la placa con sobrenadante bacteriano.

Para los análisis estadísticos, los valores obtenidos como porcentajes fueron transformados a grados angulares, a partir de los cuales se compararon las diferencias mediante el análisis del método de varianza y después se aplicó una prueba de Tukey con un porcentaje de significancia del 95 % (Castaño y Domínguez, 2010).

### 6.3.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* Q11

La caracterización fisicoquímica, consistió en un realizar un análisis de emulsificación de los compuestos producidos por BsQ11 en el medio de cultivo. Para ello se inoculó en matraces con 20 mL con caldo nutritivo, por quintuplicado, a dos distintas temperaturas: 35°C y 30°C a 150 rpm. Asimismo, los diferentes matraces, se mantuvieron en diversos tiempos de crecimiento: 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Después se centrifugaron a 4,000 rpm por 30 minutos para eliminar la pastilla y el sobrenadante se filtró con papel.

Posteriormente, se tomaron 2 mL del sobrenadante filtrado y se colocaron en un tubo al cual, se adicionó 2 mL de Keroseno, después los tubos se agitaron en un vórtex a alta velocidad por 2 minutos (Zhu *et al.*, 2013). Enseguida, se realizaron mediciones, con un vernier digital, del largo de la columna (mezcla en el tubo) y de la capa emulsionada ( $t=0$ ), posteriormente se continuaron estas mediciones cada 24 horas hasta cumplir 120 horas. Se realizaron réplicas de los tubos por septuplicado.

El índice de emulsificación ( $EI_{24}$ ) y la estabilidad de la emulsificación ( $ES_t$ ) se calcularon de la siguiente manera (Zhu *et al.*, 2013; Madhu y Prapulla, 2014):

$$EI_{24} (\%) = \frac{\text{Altura total de la capa emulsificada}}{\text{Altura total de la capa líquida}} \times 100 \%$$

$$ES_t (\%) = \frac{EI_t \text{ índice de emulsificación al tiempo } t, h}{EI_0 \text{ Índice de emulsificación al tiempo } 0, h} \times 100\%$$

### 6.3.3 Obtención del extracto crudo y detección por FT-IR

Para obtener lipopéptidos, se usaron se utilizaron dos litros del lote 150612 del producto comercial BS otorgado por la empresa Quimia, y éste fue vaciado en tubos Falcón de 50 mL para ser centrifugados a 3,000 rpm por 15 minutos, esto con el fin de separar las bacterias del medio. Enseguida el sobrenadante se ajustó el pH a 2 con HCl 6 M y se mantuvo en refrigeración por un día, para posteriormente ser centrifugado, y obtener una pastilla que fue lavada con agua acidulada a pH 2 para eliminar impurezas. La pastilla se dejó secando al voltear el tubo y colocándolo en una toalla de papel por una noche (Alfonzo *et al.*, 2012).

Después se adicionó 30 mL de metanol a la pastilla, y se dejó en extracción bajo agitación constante por 30 minutos, y fue centrifugado durante 15 minutos. A continuación, se usó un matraz bola lavado con metanol, como recipiente para filtrar con papel el contenido previamente centrifugado sin dejar caer la pastilla. Ésta última, fue lavada con metanol, para repetir este proceso por los menos 2 veces más, para obtener mayor cantidad de lipopéptido. Finalmente, para concentrar el lipopéptido crudo, el metanol fue destilado a presión reducida en un rotavapor BUCHI RII a 50 °C (Baindara *et al.*, 2013; Pathak y Keharia, 2014).

Para detectar la presencia de lipopéptidos se empleó la técnica el análisis por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), la muestra seca se puso directamente sobre el lector del espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100 en atmósfera seca para identificar los grupos estructurales del lipopéptido. El espectro IR fue obtenido en el intervalo de frecuencias de 4,000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **6.3.4 Evaluación del antagonismo del lipopéptido crudo de *Bacillus subtilis* Q11 sobre aislados de *Botrytis cinerea***

A partir del extracto seco de lipopéptido de BsQ11 se realizaron en ensayos de antagonismo colocando un disco de 7 mm de diámetro de agar con micelio activo de las cepas SCO1, SCO2, MeRO3, SCO7, BCM y BCQ de *Botrytis cinerea*. Posteriormente, el lipopéptido fue pesado y resuspendido en 2 mL de metanol grado HPLC, se aplicaron 1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  de la solución antes mencionada en la superficie de discos de papel filtro estéril a 3 cm de distancia de los hongos, que correspondían a 20, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de lipopéptido crudo (Ongena *et al.*, 2005). Los discos control contenían únicamente metanol y se registró mediante la toma de imágenes el efecto de inhibición.

#### **6.3.5 HPLC del extracto crudo de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Q11**

El lipopéptido crudo fue llevado a cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), el procedimiento fue realizado en el laboratorio de Cromatografía del CINVESTAV-IPN unidad Irapuato. La pastilla de lipopéptido se resuspendió en 3 mL de metanol grado HPLC centrifugando la solución para precipitar cualquier residuo insoluble. El sobrenadante fue

filtrado a través de una malla Millex-GS de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro y 20  $\mu\text{L}$  fueron inyectados en una columna Zorbax C-18 a 30°C y separado por un HPCL Agilent.

La fase móvil de los componentes fue de agua y 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) (A), y acetonitrilo contenido en 0.1 % de TFA (B). Los productos fueron eluidos a una tasa de flujo de 1 mL/min con un gradiente lineal del solvente B de 0 a 100 % por 60 minutos. La elución de la columna fue monitoreada por la determinación de la absorbancia a 215 nm (Stein *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

### **6.3.6 Actividad antagonista e identificación de las fracciones de HPLC**

Las fracciones más abundantes obtenidas en el HPLC fueron colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, por lo que para obtener mayor cantidad se realizaron tres corridas del sistema. Posteriormente, las muestras fueron evaporadas *in vacuo* y re disueltas en 50  $\mu\text{L}$  de metanol (Gong *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2004). El efecto antagónico de cada pico fue evaluado con el hongo *Rhizoctonia solani* debido a que este presenta un rápido crecimiento, lo cual permitió ver resultados el mismo día. El ensayo se realizó adicionando 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los picos abundantes en círculos de papel filtro de 0.38  $\text{cm}^2$ . Cada círculo fue colocado a 3 cm de distancia de un disco de agar con micelio activo en cajas de agar nutritivo. El efecto de inhibición se observó cuando el hongo rodeaba o no crecía sobre el papel filtro.

Finalmente, aquellas fracciones que mostraron un efecto se mezclaron con un volumen igual de ácido  $\alpha$ -cianohidroxicinámico (10  $\text{mg}/\text{mL}^{-1}$  en 50 % acetonitrilo/0.1 % TFA) (Fisher *et al.*, 2011), y 1  $\mu\text{L}$  de esta mezcla fue analizada por MALDI-TOF/TOF MS usando un espectrómetro de masas AutoFlex III (Bruker Daltonics) (Hsieh *et al.*, 2008). Esto fue realizado en el laboratorio de Proteómica del CINVESTAV unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 Determinación de la incidencia de *Botrytis cinerea* en frutos de vid mediante PCR convencional

#### 7.1.1 Obtención de cultivos puros de *Botrytis cinerea*

Se obtuvieron diez aislados de *Botrytis cinerea* de los viñedos muestreados, así como de diferentes variedades de uva, las cuales se encuentran descritas en el Cuadro 7. Adicionalmente, se trabajó con dos más: BCM aislada de fresa e identificada en el Laboratorio de Fermentaciones y fisiología de frutas y hortalizas, de la Facultad de Química, UAQ. Y la cepa BCQ, aislada e identificada por parte de la empresa Química Internacional Aplicada S. A. de C. V. ubicada en los Mochis, Sinaloa, México.

Cuadro 7. Cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de frutos de vid

Clave	Variedad de uva	Viñedo
SCO5	Shiraz	Bodegas de Cote
MeRO3	Merlot	El Rosario
SCO2	Shiraz	Bodegas de Cote
SCO7	Shiraz	Bodegas de Cote
SCO1	Shiraz	Bodegas de Cote
SRO2	Shiraz	El Rosario
SRO5	Shiraz	El Rosario
SCO6	Shiraz	Bodegas de Cote
SCO8	Shiraz	Bodegas de Cote
SCO9	Shiraz	Bodegas de Cote

### 7.1.2 Extracción de ADN fúngico de material vegetal

La concentración de ADN obtenida por los diferentes métodos de procesamiento de muestras no mostraron diferencias significativas ( $p=0.131$ ). La pureza de las muestras, sin contaminación por proteínas se midió en los siguientes valores de densidad óptica: 260/230 que fue similar en las muestras de ADN ( $p= 0.93$ ) y, 260/280 que fue distinta entre los métodos de tratamiento de muestras, siendo el método de enriquecimiento el de mayor pureza (Cuadro 8). Esta diferencia se debe a las condiciones de crecimiento previo a la extracción de ADN, pues se estimula el crecimiento de micelio y por lo tanto aumenta la concentración de tejido fúngico, que además se encuentra libre de interferencias del tejido vegetal. El alcance de las extracciones de ADN del patógeno pueden verse limitadas, básicamente, por el tratamiento de la muestra para extraer el genoma (Martinelli *et al.*, 2015). Aunque existen diferentes protocolos ya estandarizados, en el caso de extraer ADN de un patógeno sobre un hospedero, implica que la muestra tendrá tejido de este último, y por lo tanto existan compuestos que comprometan los parámetros de calidad del ADN.

Cuadro 8. Concentración y pureza del ADN obtenido por diferentes tratamientos de fruta infectada.

Método de recuperación	Concentración de ADN (ng/μl)	Densidad Óptica 260/280	Densidad Óptica 260/230
<b>Extracción directa</b> (n=9)	NS 132.04 ±47.86	<b>b</b> 1.06 ±0.077	NS 0.24 ±0.46
<b>Congelación con N<sub>2</sub></b> (n=7)	NS 226.92 ±134.50	<b>b</b> 1.095 ±0.05	NS 0.24 ±0.042
<b>Enriquecimiento</b> (n=5)	NS 216.58 ±63.78	<b>a</b> 1.73 ±0.09	NS 0.23 ±0.08

Tukey 95 % confianza. <sup>a, b</sup> Letras iguales por columna son estadísticamente iguales. <sup>NS</sup> No existe diferencia significativa.



Otros casos han mostrado ser efectivos con el simple acto de homogenizar el tejido del hospedero infectado, como el caso de *Alternaria* spp. en tomate y no se observa la interferencia de los pigmentos o tejidos sobre la pureza de extracción de ADN (Crespo-Sempere *et al.*, 2013). La vid posee un alto contenido de polifenoles, lo que pudo intervenir en los procesos de extracción (Lodhi *et al.*, 1994). Por esta razón, se continuó con el método de enriquecimiento como tratamiento previo a las extracciones de ADN.

### **7.1.3 Elección de oligonucleótidos y condiciones de la PCR para la detección de *Botrytis cinerea***

La amplificación de ADN de *Botrytis cinerea* mediante los cebadores BC108/BC563 se realizó a temperaturas de alineamiento de 50, 50.7, 51.5, 52, 52.7, 53.2, 54.3 y 55.6 °C, el tamaño de banda esperada fue de 480 a 500 pb. Lo anterior, fue demostrado en los resultados de amplificación en gel de agarosa, el problema que se presentó fue que amplificaron dos bandas a la altura de los 100 y 300 pb aproximadamente (Figura 12). Mientras que, los cebadores C729f/C729r, que fueron evaluados a 50.1, 51, 52.1, 53.2, 54.1, 55.3, y 56 °C de alineamiento, mostraron una única banda que coincide con el tamaño referente a la literatura, que corresponde a 730 pb a 54.1°C (Figura 13).

Los cebadores C729f/C729r fueron diseñados a partir de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) en diferentes cepas de *Botrytis cinerea*. Los RAPDs permiten identificar diferencias entre las secuencias de distintos organismos, lo cual ha demostrado ser una poderosa herramienta para aislar marcadores moleculares y, para diseñar cebadores específicos (Rigotti *et al.*, 2002). Por lo que el uso de estos oligonucleótidos ha sido extendido en diferentes estudios para identificar *Botrytis cinerea* (Rigotti *et al.*, 2006). En el caso de los cebadores BC108/BC563, si bien han sido calificados como útiles en la detección del hongo antes mencionado, para estas condiciones no resultó adecuado mantener su manejo, ya que al generarse múltiples bandas se sugiere que no es específico hacia una región particular del genoma, lo que a futuro podría generar problemas.

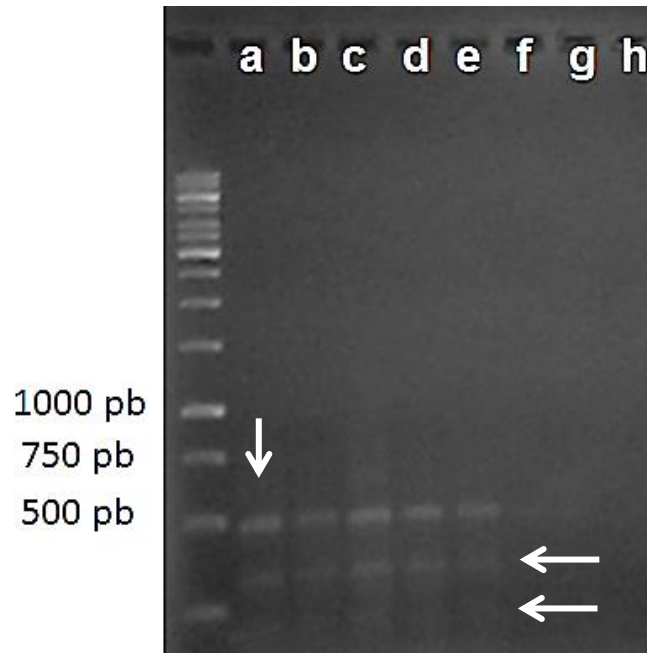


Figura 12. Producto de la amplificación de cebadores BC108/BC563. Se usó un marcador de peso molecular de 1 kb. En a) 50°C, b) 50.7°C, c) 51.5°C, d) 52°C, e) 52.7°C, f) 53.2°C, g) 54.3°C, h) Control sin ADN a 55.6°C.

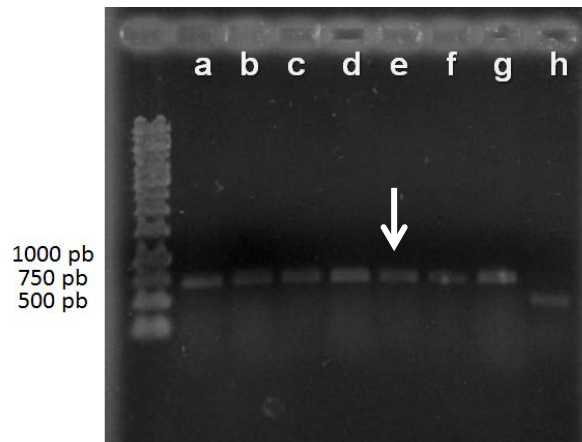


Figura 13. Producto de la amplificación de cebadores C729f/C729r. En a) 50.1°C, b) 51°C, c) 52.1°C, d) 53.2 °C, e) 54.1 °C, f) 55.3°C, g) 56 °C, h) Control ITS, 56°C.

#### 7.1.4 Validación de la especificidad de los cebadores

Los microorganismos asociados a la vid, diferentes a *Botrytis*, empleados para validar la especificidad de la PCR, no registraron ninguna banda de amplificación con el uso de los cebadores C729f/C729r (Cuadro 9). La especificidad de un oligonucleótido impacta directamente sobre los análisis que se realicen, si es muy baja puede generar falsos-positivos, falsos-negativos o múltiples bandas, que impidan generar un resultado más alejado a la realidad (Martinelli *et al.*, 2015). Lo que conllevaría, a la hora de su aplicación, mayores costos por un diagnóstico deficiente.

Respecto a las cepas aisladas de vid e identificadas morfológicamente como *Botrytis*, sólo amplificaron 12 de las 17 (Cuadro 9). Los resultados obtenidos pueden debatirse en dos puntos, el primero es que se puede exponer, que las técnicas morfológicas no son completamente veraces para caracterizar una especie. El error pudo derivarse de la experiencia del personal inmerso en la identificación (Kisluk *et al.*, 2012; Sanzani *et al.*, 2012). Sin embargo, aun cabe la posibilidad de que variaciones en la región a amplificar pudieran alterar este resultado. Por lo que como segundo punto, la discusión se centra en determinar una serie de parámetros para la clasificación de hongos, ya que entre cepas de la misma especie pueden ser morfológicamente distintas. Incluso existe un gran debate respecto al genoma de los hongos, y la variación en los resultados al emplear herramientas moleculares para su identificación (Hibbett y Taylor, 2013). Para fines útiles, se determinó emplear las cepas que si mostraron una banda de amplificación en los ensayos posteriores.

Cuadro 9. Ensayo de PCR empleando los oligos C729f/C729r sobre aislados de levaduras y hongos de vid

Clave	Género/Especie	Amplificación	Clave	Género/Especie	Amplificación	Clave	Género/Especie	Amplificación
34-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SA15	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	SB27	<i>Saccharomyces</i> sp.	-
10-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	OR11		-	Sh-BC8	<i>Botrytis</i>	+
48-	<i>Penicillium</i> sp.	-	N38		-	Sh-BC6	<i>Botrytis</i>	-
24-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR21	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-BC5	<i>Botrytis</i>	+
81-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	N21	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Me-RO1	<i>Botrytis</i>	-
8-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR35	<i>S. paradoxus</i>	-	Sh-CO1	<i>Botrytis</i>	-
80-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR27	<i>S. cerevisiae</i>	-	Sh-CO2	<i>Botrytis</i>	+
71-E	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR32	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-CO3	<i>Botrytis</i>	+
6-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR19	<i>S. cerevisiae</i>	-	Sh-CO4	<i>Botrytis</i>	+
35-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	K5	<i>S. cerevisiae</i>	-	Sh-CO6	<i>Botrytis</i>	-
4-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	SR33	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-CO7	<i>Botrytis</i>	+
17-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	DB10	<i>S. paradoxus</i>	-	Sh-RO1	<i>Botrytis</i>	+
18-A	<i>Penicillium</i> sp.	-	N56	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-R02	<i>Botrytis</i>	+
C	<i>Candida</i> sp.	-	O38	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-R04	<i>Botrytis</i>	-
10VA04	<i>L. plantarum</i>	-	N42	<i>S. paradoxus</i>	-	Sh-R05	<i>Botrytis</i>	+
IPUZZ	<i>L. plantarum</i>	-	N48	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Sh-R08	<i>Botrytis</i>	+
SRJ7		-	N56	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Me-RO3	<i>Botrytis</i>	+
N36	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	SR22	<i>Saccharomyces</i> sp.	-	Me-CO3	<i>Botrytis</i>	+
820		-	W15		-			
OR7		-	N49	<i>Saccharomyces</i> sp.	-			
SR36	<i>S. cerevisiae</i>	-	N26	<i>Saccharomyces</i> sp.	-			
K1	<i>S. cerevisiae</i>	-	N41	<i>Saccharomyces</i> sp.	-			

- Sin amplificación, ninguna banda; + amplificación positiva, una banda de tamaño esperado

### 7.1.5 Evaluación de la PCR convencional en muestras de campo

La incidencia de *Botrytis cinerea* en muestras de los tres viñedos se determinó por PCR, con las condiciones ya establecidas. En el proceso de los datos, se puede percibir que el promedio más alto lo mostró Viñedos Azteca en muestras de expuestas a la luz solar, y el más bajo en muestras también de sol provenientes de Finca el Rosario (Cuadro 10). Pero debido a que los promedios no son absolutos, se procedió a realizar una análisis estadístico para determinar los factores que suelen contribuir en la incidencia de *Botrytis cinerea*. Los factores evaluados fueron: El viñedo, y la posición del racimo (sol y sombra), así como la interacción entre ambos. El factor que destacó fue: el viñedo ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 11). Para el muestreo de los viñedos se consideró la variable de posición del racimo (sol y sombra) sobre los frutos, debido a que en diferentes estudios se ha encontrado que distintas cepas de *Botrytis cinerea* tienen mejor crecimiento, nivel de infección y producción de esporas bajo luz solar (Canessa *et al.*, 2013; Percival *et al.*, 2015). Para este caso, este parámetro no resultó determinante sobre la incidencia del hongo ( $p = 0.7$ ), por lo que se procedió a delimitar el análisis entre viñedos, y determinar si existían cambios sobre la incidencia entre estos.

Cuadro 10. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* por PCR en los viñedos de estudio

Viñedo	Viñedos Azteca 20 n		Bodega de Cote 20 n		Finca el Rosario 20 n	
	<i>Sol</i> %	<i>Sombra</i> %	<i>Sol</i> %	<i>Sombra</i> %	<i>Sol</i> %	<i>Sombra</i> %
Posición del racimo						
1u	20	20	0	0	0	20
2u	40	20	0	20	0	0
3u	40	0	20	0	20	0
4u	40	20	20	20	0	20
<b>Promedio</b>	<b>35 %</b>	<b>15 %</b>	<b>10 %</b>	<b>10 %</b>	<b>5 %</b>	<b>10 %</b>

Datos crudos en porcentajes, u: unidad experimental

Cuadro 11. Efecto de factores sobre la incidencia de *Botrytis cinerea* en frutos de vid

Factor	Valor p	
Viñedo	0.0414	*
Sol/Sombra	0.7496	NS
Viñedo: Sol/Sombra	0.3581	NS

\* Significativo, <sup>NS</sup> No significativo, 95% confianza.

En general, los viñedos registraron una baja incidencia de *Botrytis cinerea*, del 15 %. La más alta fue en Viñedos Azteca con un 20 %, seguido de Finca el Rosario (10 %) y Bodegas de Cote (9.5 %), entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas (Figura 14).

Las discrepancias mostradas en este estudio pueden ser adjudicadas al manejo general de cada viñedo. Por ejemplo, el control cultural que incluye actividades como cortar malezas, podar plantas o la mejora en la disponibilidad de nutrientes que intervienen en la disminución de enfermedades (Molitor *et al.*, 2015). Aunque no se demuestra, Viñedos Azteca fue un viñedo que, en temporada de muestreo, carecía de cuidado de sus instalaciones, por lo que pudo ser un factor que influyó. Se sabe que *Botrytis cinerea* es un hongo que puede infectar en cualquier etapa del desarrollo de la planta y transmitirse por otras plantas (Dean *et al.*, 2012). Las condiciones climáticas como la humedad y la temperatura juegan un papel determinante en la emergencia de enfermedades producidas por hongos (Williamson *et al.*, 2007). Aunque en este caso no se observó ninguna relación con ello debido a que la temperatura media registrada en los Viñedos ubicados en Ezequiel Montes (Viñedos Azteca y Bodegas de Cote), presentaron una temperatura media de  $24.3 \pm 3.2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de  $72 \pm 5\%$ , mientras que la Finca el Rosario, en El Marqués presentó una humedad del  $57 \pm 7\%$  y una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

La aplicación de técnicas moleculares como la PCR, permitió determinar la incidencia del fitopatógeno *Botrytis cinerea* en frutos muestreados. Esto implica que la utilidad de este tipo de técnicas, resultan relevantes en diferentes estudios de enfermedades en particular de cultivos (McCartney *et al.*, 2003). Cabe destacar que las herramientas moleculares son consideradas como métodos amigables con el ambiente (De Boer y López, 2012).

El monitoreo del inóculo de hongos en poblaciones en campo, proporcionan elementos útiles para evitar o controlar enfermedades, debido a que se puede establecer límites permisibles de material biológico que puede tener un efecto negativo en la población que se esté resguardando (Fisher *et al.*, 2012). Aunque se pueden emplear muchos métodos, la PCR resulta de gran utilidad, siempre y cuando se cuiden los requerimientos para evitar falsos positivos.

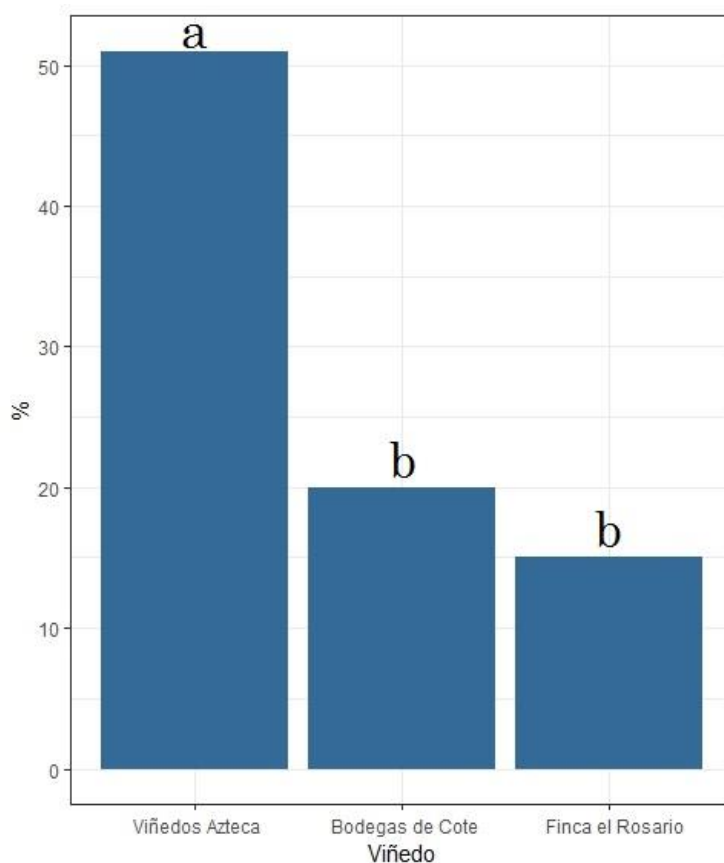


Figura 14. Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* detectada mediante PCR convencional en viñedos. Se representa que del total de muestras empleadas existe una prevalencia de *Botrytis cinerea* del 20 % en VAz, mientras que en BCo y FRo ésta se encuentra en valores de 10 y 7.5 % respectivamente (<sup>a,b</sup> Letras iguales no hay diferencias significativas, Tukey nivel de significancia 95 %). **DMS=14.93723**

## 7.2 Evaluación del efecto antagonístico de *Bacillus subtilis* Q11 sobre *Botrytis cinerea* en plantas de vid

### 7.2.1 Selección de aislados de *Botrytis cinerea* para los ensayos *in vivo*

La selección de cepas de *Botrytis cinerea* para los ensayos de antagonismo se realizó por los siguientes criterios, desarrollo en hojas tanto en planta, y en hojas colocadas en cámaras húmedas (Figura 15). Por otra parte, la amplificación por PCR, en ensayos previos. Algunas de las cepas no se desarrollaron ni en planta o en hojas de cámaras húmedas (SRO2, SRO5 y SCO6, Figura 15), por lo que fueron descartadas. Las cepas SCO8 y SCO9 si bien fueron virulentas, éstas no fueron positivas en los ensayos de PCR (Los datos no se muestran).

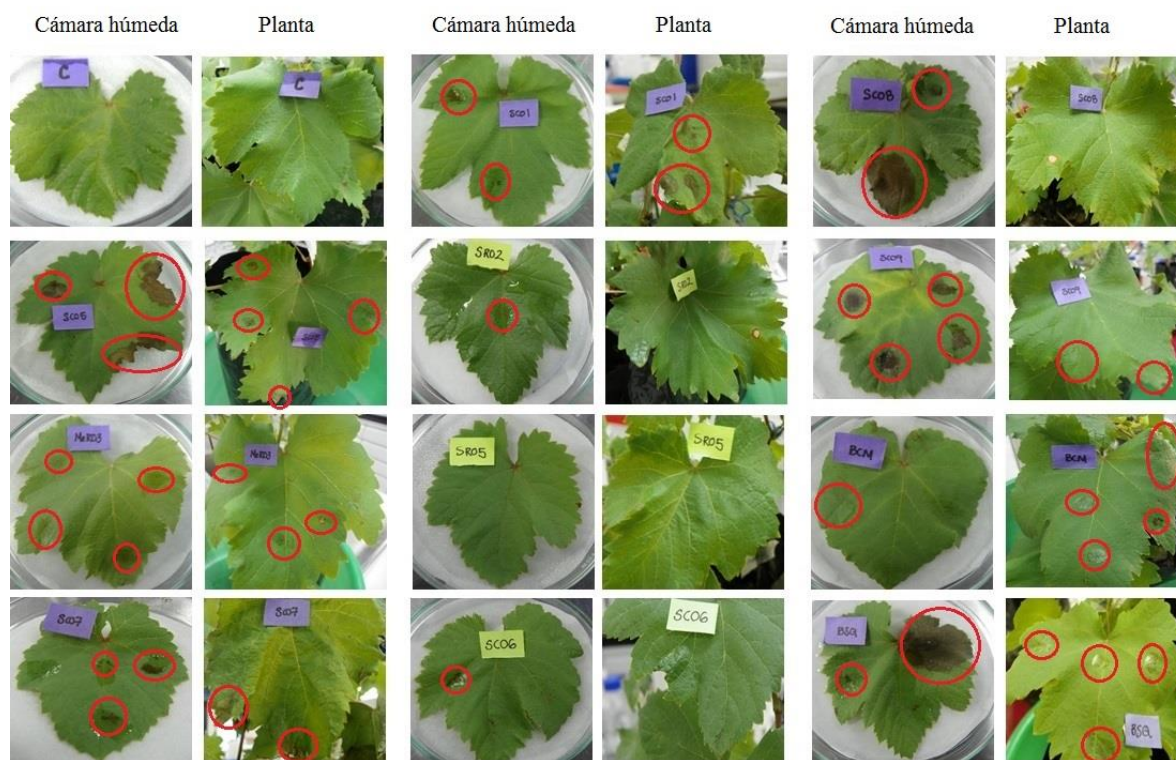


Figura 15. Ensayos de infección para la selección de aislados patógenos de *Botrytis cinerea* en hojas de vid.



### 7.2.2 Evaluación del antagonismo de *Bacillus subtilis* Q11 en plantas

El experimento se realizó con seis cepas de *Botrytis*, más dos testigos, uno sin tratamiento y uno inoculado únicamente con BsQ11, así como sus respectivas interacciones (Representadas como  $A \times B$ ). Durante todo el ensayo se registraron las condiciones de temperatura promedio, obteniendo,  $27 \pm 3$  °C y, la humedad relativa,  $52 \pm 4$  %. La incidencia fue determinada como el número de casos en el que se presentó la lesión entre el número total de hojas empleadas en el tratamiento multiplicado por cien. La incidencia fue expresada como porcentaje.

En promedio, el porcentaje de incidencia de todos los tratamientos, fue del 83.3 %, sin embargo, entre cepas se observan diferencias importantes. Por ejemplo, la cepa SCO1 mostró un porcentaje de incidencia del 100 % y MeRO3, fue la más baja con 66.7 % (Figura 16). La incidencia registrada muestra que existe una diferencia entre cada cepa empleada, y esto puede referirse al nivel de la virulencia. Esta última, es una medida para determinar el nivel de daño de un microorganismo, y se encuentra relacionada directamente con la velocidad de crecimiento del patógeno en el hospedero, y en última instancia con su transmisión (Fisher *et al.*, 2012). En este caso particular, no se observan cepas con este tipo de relaciones. El grado de daño, se relacionó con el área de infección que se produjo en cada hoja. Los resultados mostraron que el área afectada fue más amplia en los tratamientos con la cepa BCQ, pero esta no exhibía el mayor porcentaje de incidencia; caso similar con los tratamientos con SCO1, que resultó más efectiva a la hora de infectar, mientras que su área de daño en la hoja fue uno de los más bajos (Cuadro 12).

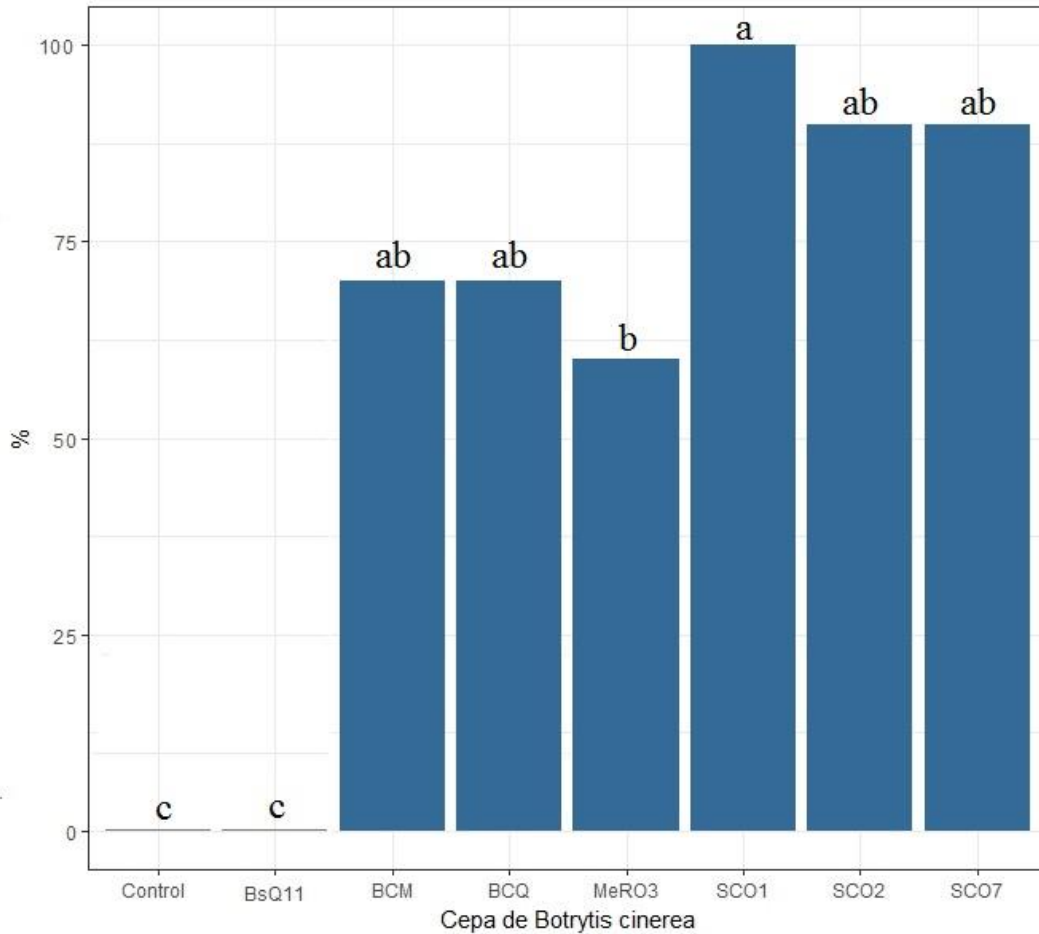


Figura 16. Incidencia de las diferentes cepas de *Botrytis cinerea* en hojas. (<sup>a,b,c</sup> Letras iguales no hay diferencias significativas, Tukey nivel de significancia 95 %). **DMS=33**

*Botrytis cinerea*, posee diferentes moduladores que influyen directamente sobre su patogenicidad y virulencia. Ambos, son factores que pueden explicar las variaciones entre lo que se consideró como el porcentaje de incidencia y el área infectada, respectivamente. Los factores ambientales pueden actuar como moduladores para la expresión de los genes de virulencia (Raffaele y Kamoun, 2012). Por ejemplo, Canessa *et al.*, (2013) describieron como el tipo y cantidad de luz puede modificar la patogenicidad de *Botrytis cinerea* según su hospedero, en su investigación observaron que la luz UV incrementa el nivel de resistencia en *Arabidopsis thaliana* inoculada con el patógeno después de un tratamiento de UV, reduciendo los daños o lesiones de un 69 a un 19 %, mientras que una reducción en la luz roja- rojo lejano incrementa la susceptibilidad. Pero en haba, *Vicia faba*, la luz roja

induce su resistencia. Esto indica una articulación de elementos que influyen sobre la incidencia y la cantidad de daño de un patógeno.

Otro factor importante, es el pH del tejido del hospedero, que favorecen en la capacidad de colonizar o invadir a un hospedero, con ayuda de factores de patogenicidad. La explicación está dada a que el pH permite funciones celulares importantes para el desarrollo del patógeno, incluso algunos producen compuestos para modificar esta condición. *Botrytis cinerea* es un “hongo ácido”, que emplea la acidificación de tejidos para atacar, secretando dosis significantes de ácido oxálico (Alkan *et al.*, 2013), por lo que la cantidad de este compuesto puede incrementar la patogenicidad de este hongo.

Las interacciones mostraron bajos porcentajes de infección, y de igual manera, bajos rangos de infección en las hojas (Cuadro 12). De manera individual, las cepas MeRO3, SCO1 y BCQ sí infectaron las hojas, empero en las interacciones con *Bacillus* se muestra lo contrario ( $p > 0.05$ , Tukey 95 %). Conjuntamente, los rangos de infección en hojas en estos tratamientos son los más bajos.

La eficacia del biocontrol (EB), fue del 94.4 % en promedio. En orden ascendente, la EB más baja fue en hojas tratadas con BCM<SCO7< SCO2 y las más altas fueron en las cepas SCO1, BCQ y MeRO3, además se observan diferencias significativas entre estas últimas (Cuadro 12).

Los resultados manifiestan que BsQ11 es un agente eficaz para el biocontrol de *Botrytis cinerea*, estudios anteriores han revelado que las distintas especies del género *Bacillus* son agentes seguros de emplear pues son inocuos para el ambiente y la salud humana (Chen *et al.*, 2016).

De la misma manera, se ha probado que la inoculación de especies de *Bacillus* incrementa la diversidad y riqueza de especies de bacterias mutualistas de las plantas, lo que representa un fortalecimiento en el grado de protección, e incluso en la disponibilidad de nutrientes por parte de estos microorganismos (You *et al.*, 2016). Hoy en día se cuentan con diferentes agentes de biocontrol para un tipo de patógeno y un tipo particular de cultivo (Sharma *et al.*, 2009), algunos se han enfocado a la prevención a nivel de post o pre cosecha, obteniendo grandes avances en el control de enfermedades como *Botrytis*.

Estudios han documentado la importancia de la inducción a la resistencia en plantas por medio de microorganismos, como Ronseaux *et al.*, (2013) con *Ulocladium atrum* en la vid, lo cual puede ser la clave para disminuir las pérdidas en la producción de los cultivos.

Otros optan por la modificación genética de plantas, tales como Dabauza *et al.*, (2015) que sobreexpresan el gen de estilbeno sintasa que sirve como defensa en plantas de vid, e incluso en una mezcla de especies de microorganismos, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* y *Acinetobacter lwoffii* contra *Botrytis cinerea* y encontraron que al cabo de dos años se indujo el sistema de resistencia de plantas de vid (Mgnin-Robert *et al.*, 2013; Aziz *et al.*, 2016). Si bien todas estas estrategias para abordar este problema son eficaces, no necesariamente son la respuesta a largo plazo ya que todo dependerá de su manejo y la planeación de su uso para disminuir los riesgos de introducir un antagonista a un ecosistema (Simberloff, 2012).

Siguiendo este orden, se sugirió determinar la población de BsQ11 que se había instalado en las plantas inoculadas. Se encontraron poblaciones que oscilaban entre de 1.4 a 3.1 log UFC/cm<sup>2</sup> en los distintos tratamientos (Cuadro 12). Estos números discrepan respecto a los resultados obtenidos por Yuan *et al.*, (2014) quienes alcanzaron valores de 6 a 7.5 log UFC/cm<sup>2</sup> de *Bacillus subtilis* en la rizósfera del tabaco, aunque esto dependerá del tejido y las condiciones en las que se establezca una población. En contraste, los resultados de Collins *et al.*, (2003) fueron de 2 a 4.5 log UFC/cm<sup>2</sup> en hojas de betabel, lo que se asemejan más a que lo se obtuvo en hojas de vid. Estas variaciones pueden ser explicadas por que las bacterias empleadas en el antagonismo influyen directamente sobre la estructura de las comunidades microbianas presentes en los diferentes órganos de las plantas, generalmente promoviendo la diversidad de bacterias benéficas (Yuan *et al.*, 2012; You *et al.*, 2016). Aunado a esto, las poblaciones del antagonista tienden a ser variables, aun en el mismo medio debido a la competencia con grupos (Xue *et al.*, 2009).

Para fines comerciales, la supervivencia del antagonista juega un papel importante para la formulación de productos (Jambhulkar y Sharma, 2014). Por este motivo, se examina la persistencia de estas bacterias en el medio.

Para mejorar la tasa de supervivencia, los productos se mezclan con aditivos, los cuales confieren de un medio que les otorga mayor adherencia, lo cual a su vez mejora la resistencia a la desecación debido al incremento de la cobertura de las bacterias a la superficie o incluso permiten, a estas últimas, adaptarse al medio (Afzal *et al.*, 2013; Jambhulkar y Sharma, 2014).

Ante lo previamente mencionado, una cualidad relevante de emplear especies de *Bacillus subtilis* es la formación de esporas, que resisten a la desecación, radiación solar y altas temperaturas. Incluso proporcionan estabilidad de almacenamiento por largos periodos a temperatura ambiente (Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

Cuadro 12. Hojas infectadas con diferentes cepas de *Botrytis cinerea* y, BsQ11 como antagonista.

Tratamiento	Rango de área de infección en la hoja (%)	Incidencia (%)	EB (%)	BsQ11 Recuperado (log UFC/cm <sup>2</sup> )
Control	0	ND		
BsQ11	0	ND		3.10 <sup>a</sup>
BCM	0.08 — 9.14	77.77 <sup>ab</sup>		
SCO1	0.08 — 6.77	100 <sup>a</sup>		
SCO2	0.18 — 5.27	88.88 <sup>ab</sup>		
SCO7	0.08 — 6.75	88.88 <sup>ab</sup>		
BCQ	0.14 — 23.17	77.77 <sup>ab</sup>		
MeRO3	0.12 — 5.3	66.66 <sup>b</sup>		
BsQ11x BCM	0.1 — 0.45	11.11 <sup>c</sup>	85.71 <sup>d</sup>	2.48 <sup>ab</sup>
BsQ11x SCO1	0	ND	100 <sup>a</sup>	3.02 <sup>a</sup>
BsQ11x SCO2	0.37	5.55 <sup>c</sup>	93.75 <sup>b</sup>	2.30 <sup>ab</sup>
BsQ11x SCO7	0.11 — 0.68	11.11 <sup>c</sup>	87.5 <sup>c</sup>	2.55 <sup>ab</sup>
BsQ11x BCQ	0	ND	100 <sup>a</sup>	2.36 <sup>ab</sup>
BsQ11x MeRO3	0	ND	100 <sup>a</sup>	1.43 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Letras iguales (por columna) no hay diferencias significativas, Tukey nivel de significancia 95 %. ND, No detectable.

**DMS** Incidencia=0.31, **DMS** EB= 5, **DMS** BsQ11 Recuperado= 2.8

A partir de los datos obtenidos experimentalmente se realizó un análisis de factores que contribuyen en la aparición de la enfermedad, tal es el caso de las interacciones intrínsecas de la planta y los propios microorganismos empleados en el ensayo de antagonismo en hojas de vid. Por ello se generaron modelos generalizados lineales (GLMM, por sus siglas en inglés) de la infección con diferentes cepas de *Botrytis* en plantas de vid. Primero se establecieron los factores que contribuyeron con la incidencia de la enfermedad: la cepa, la presencia del microorganismo de biocontrol, la planta, la hoja y su posición. Cada uno de los parámetros fue examinado como variable explicativa, y la presencia o ausencia (1,0) de la enfermedad en las hojas como variable de respuesta. Al finalizar se obtuvo un modelo en el que destacaron 2 parámetros: La cepa de *Botrytis cinerea* y la presencia de BsQ11 (GLMM,  $p < 0.05$ , Cuadro 13) y, 3 de sus interacciones: BsQ11-planta, planta-hoja y, la cepa de *Botrytis*, con la planta, la hoja y su posición (GLM,  $p < 0.05$ , Cuadro 13).

El tipo de cepa y la presencia de BsQ11, son parámetros que aportaron directamente sobre la incidencia de la enfermedad (Cuadro 13). Los diferentes aislados de *Botrytis cinerea*, empleados en el ensayo, si bien podríamos considerar que pertenecen a la misma especie no se explica las variaciones a nivel fenotípico, ya que los patógenos poseen diferencias en cuanto a su patogenicidad y virulencia entre poblaciones o individuos (Fisher *et al.*, 2012; Raffaele y Kamoun, 2012). Otros factores que determinan estas últimas, son las variaciones a nivel espacial y temporal, es decir condiciones ambientales en determinado tiempo pueden influir en la adecuación del patógeno (Laine y Barrès, 2013).

Respecto a la influencia de BsQ11, como factor en el GLMM, experimentalmente se observó un efecto sobre la presencia de *Botrytis* y este fue reiterado en el modelo (Cuadro 13), Los distintos agentes de biocontrol emplean diferentes mecanismos para inhibir o controlar a un patógeno, las especies de *Bacillus subtilis* emplean la antibiosis (Di Francesco *et al.*, 2016). Este mecanismo consiste en la secreción de sustancias antimicóticas como son las quitinasas, los sideróforos y/o los lipopéptidos (Raaijmakers y Mazzola, 2012); el tipo y cantidad de estos compuestos puede estar definido por el patógeno a controlar o por la producción de manera constitutiva, lo cual permitirá generar productos comerciales de amplio espectro.

Cuadro 13. Análisis de las interacciones intrínsecas de la planta, de BsQ11 y, de los aislados de *Botrytis cinerea* sobre la incidencia de la enfermedad.

Parámetro	gl	F	P	Est.
Cepa de BC	7	5.86	7.9X10 <sup>-7</sup> ***	+
BsQ11	1	160.41	2.2X10 <sup>-16</sup> ***	-
Planta	1	0.002	0.96	-
Hoja	1	0.005	0.93	-
P-Hoja	1	0.49	0.48	-
Cepa de BC:BsQ11	5	2.04	0.069.	-
Cepa de BC: Planta	7	0.047	0.85	+
BsQ11: Planta	1	3.96	0.046*	-
Cepa de BC:Hoja	7	0.69	0.67	+
BsQ11: Hoja	1	2.16	0.14	-
Planta: Hoja	1	7.89	0.004**	+
Cepa de BC:P-Hoja	7	0.47	0.85	+
BsQ11: P-Hoja	1	0.015	0.9	-
Planta:P-Hoja	1	0.036	0.84	+
Hoja:P-Hoja	1	0.11	0.73	+
Cepa de BC:Planta:Hoja:P-Hoja	7	2.82	0.006**	+

**BsQ11:** *Bacillus subtilis* Q11 **P-Hoja:** Posición de la hoja en la planta.

Significado de códigos P: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

AIC: 258.99

Las interacciones sobresalientes en el modelo son relevantes en cuanto a su análisis debido a que se puede adjudicar un sinergismo o antagonismo entre parámetros y su papel sobre la incidencia de la enfermedad en las plantas de vid. La primera interacción que sobresalió fue BsQ11-planta (Cuadro 13), la relación de estas dos variables puede estar mediada por la influencia que tiene directamente los microorganismos con el hospedero. Es decir, la actividad que realiza el antagonista en la planta no es limitada solo a controlar los posibles patógenos que lleguen a su hospedero, se conoce que algunos puede promover el crecimiento de la planta al mejorar la disponibilidad de nutrientes (Sivasakthi *et al.*, 2014; Rojas-Solís *et al.*, 2016).



Por otra parte, es habitual que las bacterias con este potencial, también pueden estimular la defensa en plantas a través de la producción de compuestos. Por ejemplo, los lipopéptidos producidos por bacterias provocan cambios a nivel metabólico en las plantas al estimular la elaboración de especies reactivas de oxígeno, estas inhiben o limitan la penetración de patógenos en los tejidos (Cawoy *et al.*, 2014). Aunado a ello, *Bacillus* puede estimular cambios en la densidad de especies del microbioma de la planta, generalmente al aumentar la diversidad de microorganismos benéficos (Bach *et al.*, 2016; You *et al.*, 2016), estos cambios promuevan las defensas del hospedero.

La interacción hoja-planta (Cuadro 13) presentó una relación positiva sobre la incidencia del fitopatógeno, Lo que sugiere las diferencias intrínsecas de las plantas e incluso a nivel de las hojas, son variables y por lo tanto los patógenos son capaces de afectar de distintas formas. Por ejemplo, un componente crítico en la patogénesis es la secreción de proteínas, llamadas efectores, los cuales modulan la inmunidad las plantas y facilitan la infección (Raffaele y Kamoun, 2012). Estos efectores pueden ser variables según el estado de infección del patógeno y el órgano blanco, ya que exhiben cierta especificidad (Denancé *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Toruño *et al.*, 2016). Asimismo, la planta posee señales de respuesta, que pueden generarse en los órganos de manera local y sistémica (Baxter *et al.*, 2014). Estas respuestas pueden ser, la modificación de la distribución de metabolitos secundarios, y se ha demostrado que este cambio puede comprobarse a nivel cuantitativo de manera espacial, entre tejidos infectados y no infectados entre hojas o zonas de la misma hoja (Baxter *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016).

Asimismo, una respuesta de defensa también puede ser variable respecto a la edad de la hoja (Toruño *et al.*, 2016). La hipótesis de la defensa óptima, formulada por McKey en 1974, postula que las plantas emplean recursos limitados para producir metabolitos de defensa, estos son costosos, por lo que los recursos se destinan a órganos o tejidos de la planta que son más valiosos o vulnerables (Heil *et al.*, 2004; Meldau *et al.*, 2012). Uno de los órganos importantes para la planta son las hojas jóvenes, que al final contribuyen más al futuro de las plantas a diferencia de los tejidos viejos (Meldau *et al.*, 2012).

La última interacción importante en el ensayo fue la asociación de la cepa de *Botrytis*, con la planta, la hoja y la posición de esta última (Cuadro 13). Es relevante destacar que, se asignan un orden de los parámetros respecto a su probable orden de relevancia en la incidencia de la enfermedad. La información anterior ejemplificó que las cepas de un patógeno varían en cuanto a su patogenicidad y virulencia (Fisher *et al.*, 2012). Mediante la interacción de la planta y la hoja, se establece que existen variaciones en la defensa del hospedero a nivel de una planta, sus distintos órganos e incluso tejidos (Baxter *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016; Toruño *et al.*, 2016). En adición a esta interacción, se incluye la posición de la hoja, esta fue determinada conforme a Hunter *et al.*, (1994) que describen una clasificación de hojas en vid: las hojas apicales (jóvenes), que son las 6 primeras hojas externas, las hojas basales (viejas) primeras tres hojas donde inicia la rama (Figura 17, a y c). Se adicionó un tercero, considerando un nivel intermedio (hojas de mediana edad, Figura 17, b). Anteriormente, se ha hecho hincapié sobre el sistema de defensa en plantas asociado a la edad de los tejidos (Meldau *et al.*, 2012), de lo cual se puede agregar que éste hecho también se encuentra asociado respecto a la variabilidad de los microorganismos asociados (Junker y Keller, 2015), la incidencia de luz (Canessa *et al.*, 2013) y a aspectos nutricionales (Hunter *et al.*, 1994) que también, de manera indirecta, pueden repercutir sobre la incidencia de la enfermedad. Sin duda este tipo de mediciones deben ser consideradas para posteriores trabajos ya que estas características pueden demostrar mayor repercusiones en los modelos y demostrar así mayor precisión en la dinámica de infecciones en cultivos.

Mediante la modelación del GLMM se observó que existen diferentes características que repercuten sobre la incidencia de *Botrytis* en las plantas de vid. Es necesario establecer factores que determinen la presencia de una enfermedad, ya que al conocer estas se pueden prevenir o controlar. Aunado a ello, es importante hacer hincapié en que estas relaciones pueden variar en el tiempo.

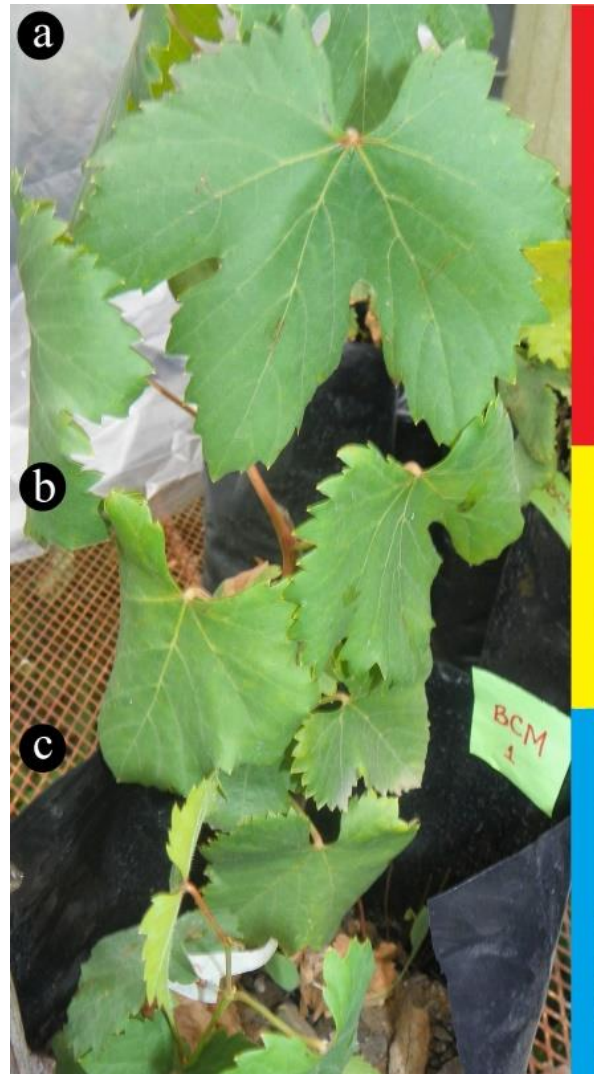


Figura 17. Clasificación de hojas según su posición en la planta. Esquema aproximado que representa la clasificación de hojas según su posición en la planta, a) Hojas apicales, b) Hojas intermedias y, c) Hojas basales.

### 7.3 Identificación de los compuestos relacionados al antagonismo de hongos en *Bacillus subtilis* Q11

#### 7.3.1 Evaluación del antagonismo del sobrenadante de *Bacillus subtilis* Q11

Los ensayos del antagonismo usando el sobrenadante de BsQ11 mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea* con respecto al control (Figura 18). El crecimiento se registró cada 24 horas hasta que las cepas cubrieron la totalidad de la superficie de la caja.

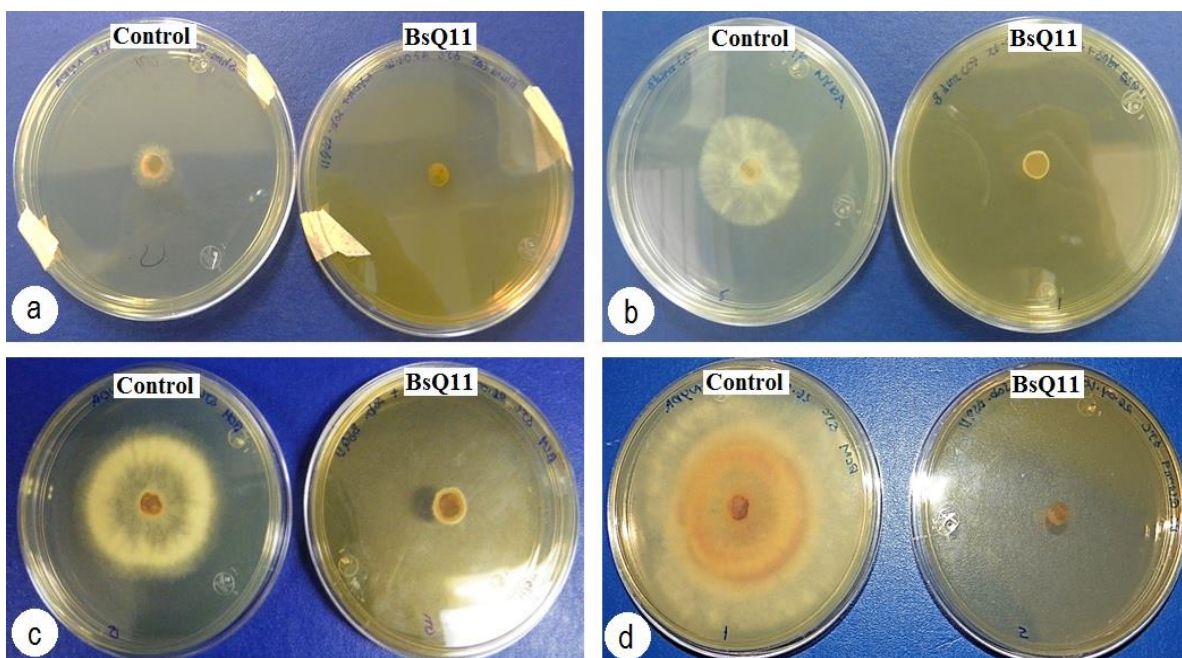


Figura 18. Efecto antagónico de sobrenadante de BsQ11 sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea* SCO7. a) 24 horas, b) 48 horas, c) 72 horas y, d) 96 horas.

El número de cepas tratadas con el lipopéptido crudo de BsQ11 fue de 13 cada una fue evaluada en cinco repeticiones, dentro de las cuales SCO5, Me-RO3, SCO2, BCM y SCO7 exhibieron crecimiento en un rango entre 27.52 a 3.5 % en el sobrenadante de BsQ11 (Figura 19).



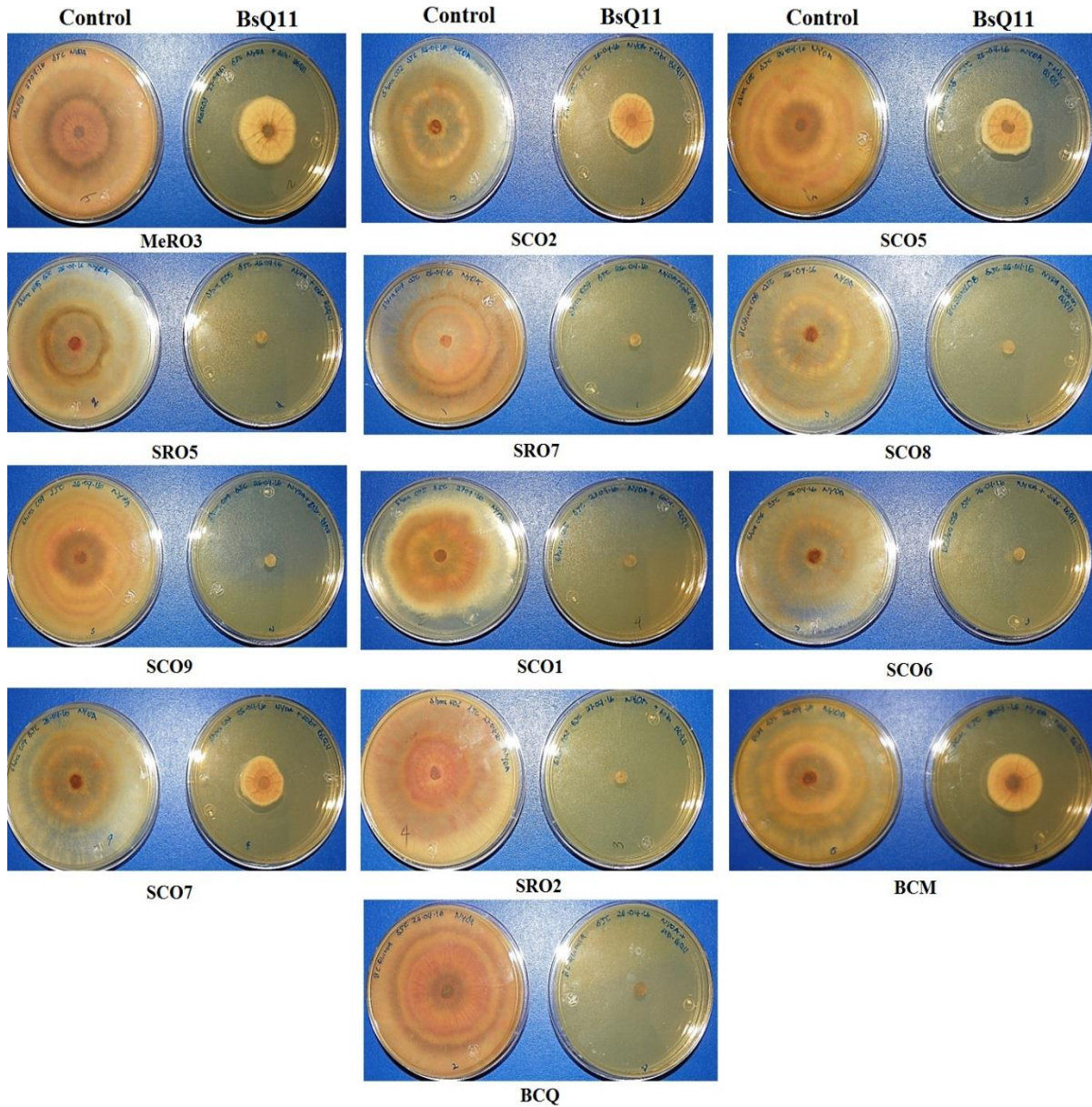


Figura 19. Antagonismo del sobrenadante de BsQ11 en las cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de vid. Cada imagen muestra en la parte inferior la clave de la cepa, del lado izquierdo se muestran los controles y del derecho las tratadas con el sobrenadante.

El análisis cuantitativo del crecimiento de los hongos en cada caja fue medido con un Vernier, los datos fueron registrados en centímetros comparando con los controles para determinar el porcentaje de inhibición, posteriormente estos últimos fueron transformados en grados angulares para realizar las pruebas estadísticas.

El control promedio del lipopéptido crudo fue mayor a 82.8 %, siendo el orden como aparecen en el Cuadro 14. Esto se debe a la sensibilidad a nivel de membrana respecto a los componentes presentes en el medio, lo que consecuentemente produce una efecto antagonista (Islam *et al.*, 2012).

Cuadro 14. Inhibición in vitro de cepas de *Botrytis* empleando el lipopéptido crudo de BSQ11.

<b>Cepa</b>	<b>% de inhibición</b>
<b>SCO5</b>	72.48 <sup>b</sup>
<b>MeRO3</b>	73.37 <sup>b</sup>
<b>SCO2</b>	74.03 <sup>b</sup>
<b>BCM</b>	79.75 <sup>b</sup>
<b>SC07</b>	80.31 <sup>b</sup>
<b>SCO1</b>	96.5 <sup>a</sup>
<b>SRO2</b>	100 <sup>a</sup>
<b>SRO7</b>	100 <sup>a</sup>
<b>BCQ</b>	100 <sup>a</sup>
<b>SCO6</b>	100 <sup>a</sup>
<b>SCO8</b>	100 <sup>a</sup>
<b>SCO9</b>	100 <sup>a</sup>

Tukey (95 %) Letras en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). **DMS**= 11.39

Existen diferentes compuestos que puede producir una bacteria sobre el medio, algunos de estos son los lipopéptidos que pueden aumentar o disminuir conforme al estado nutricional del microorganismo, como lo son fuentes de carbono y nitrógeno (Balouiri *et al.*, 2016) y, las condiciones de cultivo como el pH y la temperatura (Islam *et al.*, 2012) y algunos cofactores enzimáticos o micronutrientes tales como manganeso.

Estudios adicionales, han señalado la presencia del patógeno como un componente importante en la modulación de la producción de lipopéptidos, esto puede ser mediante señales químicas emitidas por los patógenos que podrían percibir las bacterias para aumentar la producción de estos compuestos (Cawoy *et al.*, 2015). Entonces será ineludible considerar estos factores si se pretende incrementar la producción de estas sustancias a nivel industrial, por lo cual, será interesante crecer a *Bacillus subtilis* en presencia de diferentes patógenos, incluyendo a *Botrytis*.

### **7.3.2 Caracterización fisicoquímica del sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* Q11**

Los ensayos realizados para determinar la capacidad emulsificante del sobrenadante de BsQ11 (Figura 20) mostraron que el índice de emulsificación ( $EI_{24}$ ) fluctuó entre 10.31 y 29.41 %. Los mayores porcentajes de  $EI_{24}$  se registraron a las 48 y 72 horas de crecimiento a una temperatura de 30°C (Cuadro 15). Esta capacidad de emulsificar comprende la dispersión de un líquido en otro, encaminando a la mezcla de dos líquidos inmiscibles. Los surfactantes, entre ellos los lipopéptidos, poseen esta propiedad, y en general, aquellos de alto peso molecular son mejores emulsificadores que los de bajo peso (Mnif y Ghribi, 2015). Los agentes tenso-activos son compuestos anfifílicas que contienen partes hidrófilicas y lipofílicas, la emulsificación depende de sus estructura, cuando contiene proteínas se vuelven en moléculas de alto peso molecular lo que las hace migrar más lento de una interface a otra y por lo tanto estables (Deleu *et al.*, 1999). La capacidad de emulsificación es importante en cuanto a su permanencia, es decir la estabilidad de emulsificación ( $Es_t$ ), para lo cual se registró el nivel de emulsificación de cada incubación en un tiempo de hasta 120 horas (Cuadro 15). Lo que se observó fue que el valor de la  $Es_t$  no fue variable durante las 120 h en las 24, 48 y 72 h de crecimiento e independiente a la temperatura, 30 o 35°C (Cuadro 15), por lo que se puede decir que fueron estables. Mientras que las emulsiones de las 96 y 120 horas mostraron un decremento de esta propiedad.

El  $E_{s_t}$  también fue comparado entre los diferentes tiempos de incubación por cada tiempo registrado para la estabilidad (Cuadro 15).

Se reconoció que los valores de  $E_{s_t}$  de las 72 h de incubación a 30°C poseen la mayor estabilidad (Cuadro 15). Lo que puede indicar que una incubación de 72 h a 30°C son las condiciones de tiempo y temperatura apropiadas para la producción de los lipopéptidos. Cabe mencionar que, al ser una mezcla, no únicamente se observa la emulsificación de lipopéptidos, algunos otros autores como Zhu *et al.*, (2013) miden específicamente esta propiedad a diferentes concentraciones del compuesto puro.

Otros concluyen que la fuente de carbono influye sobre la producción de estos compuestos (Singh *et al.*, 2014), por lo que si se quiere aumentar será necesario evaluar las fuentes ya que existe variabilidad de condiciones para estimular una cepa bacteriana.

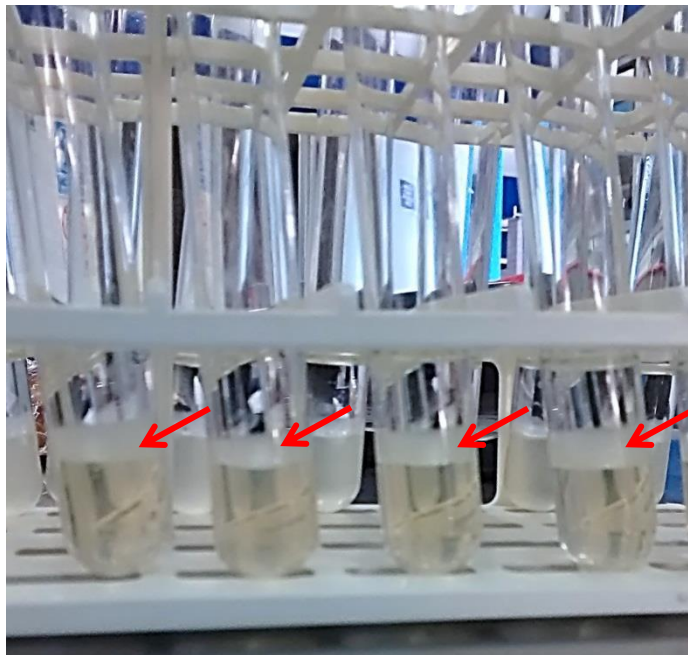


Figura 20. Ensayo de emulsificación del sobrenadante de BsQ11. Las flechas rojas muestran la emulsión del medio de cultivo donde se creció BsQ11.



Cuadro 15. Índices de emulsificación (EI<sub>24</sub>) y estabilidad de la emulsión (ES<sub>t</sub>) entre dos temperaturas de incubación de BsQ11.

Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	EI <sub>24</sub> (%)	ES <sub>t</sub> (%)				
			24h	48h	72h	96h	120h
30°C	Control	13.0 ± 1.8 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
	24 h	20.5 ± 3.5 <sup>c</sup>	73.1±15.8 <sup>a,ABC</sup>	67.4±11.5 <sup>a,ABC</sup>	66.7±17.9 <sup>a,ABC</sup>	62.2±18.4 <sup>a,AB</sup>	ND
	48h	26.00 ± 3.5 <sup>a</sup>	78.3±13.0 <sup>a,AB</sup>	75.9±15.9 <sup>a,AB</sup>	70.2±16.3 <sup>a,AB</sup>	65.3±17.0 <sup>a,AB</sup>	63.0±17.9 <sup>a,AB</sup>
	72h	29.4 ± 5.3 <sup>a</sup>	84.9±8.3 <sup>a,A</sup>	81.1±7.3 <sup>a,A</sup>	78.7±7.3 <sup>a,A</sup>	76.4±8.0 <sup>a,A</sup>	75.1±8.2 <sup>a,A</sup>
	96h	28.4 ± 3.2 <sup>ab</sup>	77.1±5.0 <sup>a,AB</sup>	70.3±4.9 <sup>ab,AB</sup>	67.2±4.7 <sup>bc,ABC</sup>	65.1±4.0 <sup>bc,AB</sup>	62.7±4.9 <sup>c,AB</sup>
	120h	28.8 ± 2 <sup>ab</sup>	74.3±7.8 <sup>a,ABC</sup>	64.8±11.8 <sup>ab,ABC</sup>	58.6±14.0 <sup>ab,ABC</sup>	56.5±13.5 <sup>ab,AB</sup>	53.7±11.7 <sup>b,B</sup>
35°C	Control	10.3 ± 1.4 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
	24 h	22.5 ± 2.1 <sup>bc</sup>	55.7±17.4 <sup>a,C</sup>	50.2±15.3 <sup>a,C</sup>	46.4±14.0 <sup>a,C</sup>	46.1±14.3 <sup>a,B</sup>	43.9±15.5 <sup>a,BC</sup>
	48h	11.5 ± 1.0 <sup>d</sup>	27.3±9.3 <sup>a,D</sup>	24.7±7.4 <sup>a,D</sup>	24.2±7.2 <sup>a,D</sup>	24.0±7.2 <sup>a,C</sup>	23.8±7.2 <sup>a,C</sup>
	72h	26.4 ± 7.0 <sup>abc</sup>	70.9±4.4 <sup>a,ABC</sup>	63.5±10.7 <sup>a,ABC</sup>	60.7±11.0 <sup>a,ABC</sup>	57.9±12.4 <sup>a,AB</sup>	54.0±14.4 <sup>a,B</sup>
	96h	23.8 ± 2.8 <sup>abc</sup>	63.1±9.2 <sup>a,BC</sup>	58.6±8.4 <sup>ab,BC</sup>	55.8±6.0 <sup>ab,BC</sup>	53.6±5.3 <sup>ab,B</sup>	50.8±6.5 <sup>b,B</sup>
	120h	25.5 ± 4.0 <sup>abc</sup>	74.5±12.8 <sup>a,ABC</sup>	67.9±13.3 <sup>a,ABC</sup>	62.6±15.5 <sup>a,ABC</sup>	56.7±11.6 <sup>a,AB</sup>	60.0±11.9 <sup>a,AB</sup>

“ND” No detectable. EI<sub>24</sub> (Índice de emulsificación), medias (n=7) con letras mayúsculas iguales no son significativamente diferentes (Tukey 95 %).

ES<sub>t</sub> (Estabilidad de la emulsión), medias (n=7) con letras mayúsculas (Columnas) y minúsculas (filas) iguales no son significativamente diferentes (Tukey 95 %).

### 7.3.3 Detección de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Q11 por FT-IR

El espectro IR (Figura 21) mostró diferentes bandas de absorción en  $3308\text{ cm}^{-1}$  debido al estrechamiento N-H y, al estrechamiento CO-N en  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Los patrones anteriormente mencionados son características de los péptidos, también se puede observar un segundo grupo de bandas propias de cadenas alifáticas en  $2924\text{ cm}^{-1}$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  por los modos de estrechamiento de CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Mientras que, un tercer grupo ubicado entre  $1207\text{ cm}^{-1}$  y  $1648\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la absorción de un carbonilo de lactona. Esto muestra la presencia de hidrocarburos alifáticos y grupos carbonilo que sugieren la estructura de un lipopéptido del grupo de la surfactina, fengicina e iturina, de acuerdo a como lo reportan Zhu *et al.*, (2013). Con estos resultados se infiere que uno de los componentes en el sobrenadante de *Bacillus subtilis* Q11 que tienen efecto antagónico son los lipopéptidos.

### 7.3.4 Evaluación del antagonismo del lipopéptido crudo de *Bacillus subtilis* Q11 sobre aislados de *Botrytis cinerea*

Después de la detección por FT-IR, se comprobó que los compuestos en el extracto crudo eran lipopéptidos, por lo que se realizó un ensayo de antagonismo contra las cepas de *Botrytis cinerea*, empleadas en los ensayos en hojas de vid. La Figura 22, muestra los halos de inhibición del lipopéptido crudo de BsQ11 en diferentes cantidades (20, 100 y 200  $\mu\text{g}$ ). Se observa de resistencia de BCQ (Figura 22, f) a los 20  $\mu\text{g}$ , pues esta crece sobre el círculo de papel, empero, en todos los aislados a partir de los 100  $\mu\text{g}$  es evidente la inhibición. Ongena *et al.*, (2005) reportan que los extractos crudos tienen la capacidad de inhibir hongos como *Fusarium oxysporum*, *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*, comparable con este estudio los autores emplearon 200  $\mu\text{g}$  del extracto crudo de la cepa denominada M4 de *Bacillus subtilis*.

La efectividad del extracto crudo ha sido demostrado en otros estudios (Waewthongrak *et al.*, 2015), y se tiene conocimiento que estos pueden inhibir no sólo el desarrollo del micelio de hongos fitopatógenos, sino también de conidios, que son estructuras con mayor resistencia.

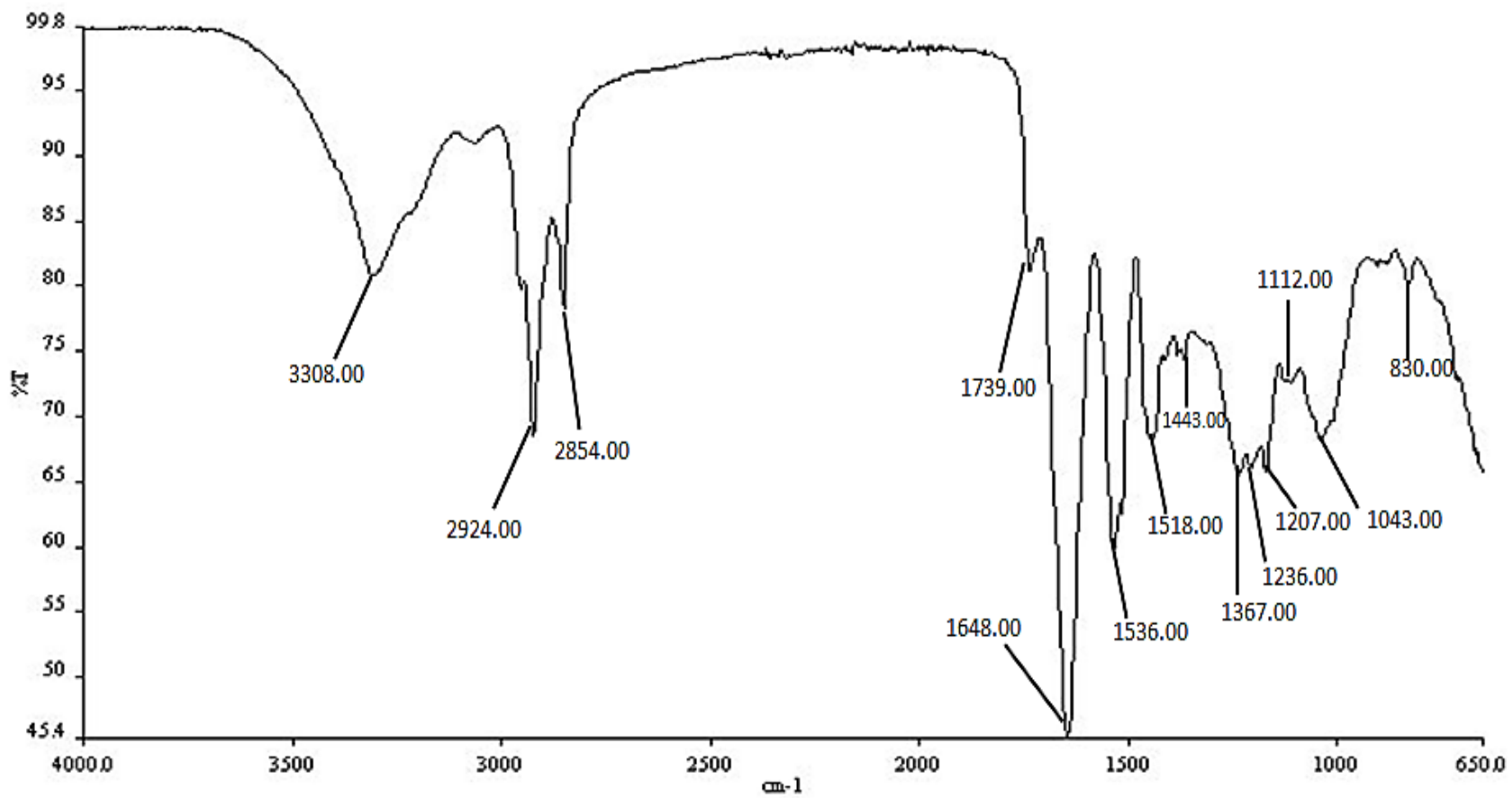


Figura 21. Espectro Infrarrojo del extracto seco obtenido de la BsQ11

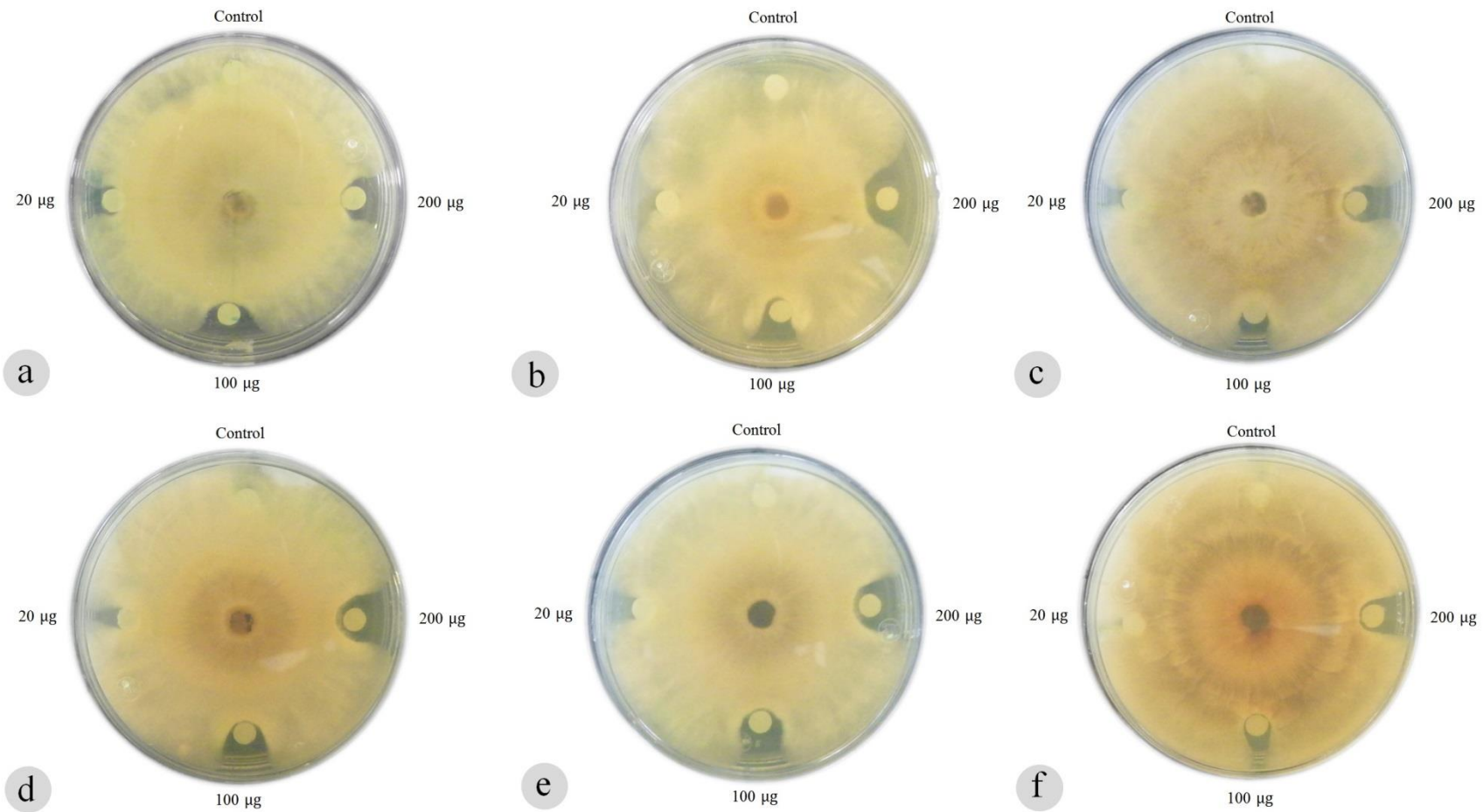


Figura 22. Inhibición de diferentes concentraciones del extracto seco de BsQ11 sobre aislados de *Botrytis cinerea*. a) SCO1, b) SCO2, c) MeRO3, d) SCO7, e) BCM y f) BCQ.

### 7.3.5 Identificación y actividad antagonista de los lipopéptidos de *Bacillus subtilis* Q11

El HPLC del lipopéptido seco de BsQ11 produjo un cromatograma donde se muestran 22 fracciones abundantes (Figura 23). Cada una de estas fue evaluado en ensayos de inhibición contra el hongo *Rhizoctonia solani*, lo cual permitió determinar que las fracciones 9, 11 y 12 (Figura 24), presentan un efecto antimicrobiano.

La identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF RM mostró un patrón característico de la familia de las iturinas (Figura 25). Conforme a la masa (m/z) mostrada en el espectro, la fracción 9 es abundante en iturinas con cadenas de ácidos grasos de 13 carbonos como sustituyentes, mientras que, las fracciones 11 y 12, poseen sustituyentes de 13-17 carbonos (Cuadro 16) (Hiradate *et al.*, 2002). Todas las fracciones poseen aductos de sodio y potasio lo cual incrementa su m/z (Figura 25), la aparición de estos con sus especies protonadas es una característica común en estudios de espectros de masas de péptidos bajo un MALDI convencional (Pathak y Keharia, 2014), debido a la presencia de sales de sodio o potasio en el medio de cultivo (Cuadro 16).

Las iturinas son una de las familias de lipopéptidos más abundantes entre cepas de *Bacillus subtilis* (Ongena y Jacques, 2008; Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012). Se considera que esta familia de lipopéptidos es la más potente contra hongos fitopatógenos, debido a su actividad citotóxica contra micelio y esporas (Bionda *et al.*, 2016). Su actividad citotóxica, se debe a la alteración de la superficie de tensión de las membranas, se forman poros de un diámetro promedio de 32 Å que permiten la salida del potasio y otros iones vitales para el hongo lo que finalmente causa la muerte (Inès y Dhouha, 2015; Lee y Kim, 2015). Esta propiedad, se ha observado contra un amplio espectro de hongos tales como *Monilinia fructicola* (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012; Lee y Kim, 2015), *Fusarium graminearum*, *Podosphaera fusca* (Gong *et al.*, 2015), *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Colletotrichum musae*, *Sclerotium rolfsii*, *Glomerella cingulata*, *Rhizoctonia solani* (Hsieh *et al.*, 2008). En otros estudios se ha reportado que la micosubtilina, que se encuentra dentro de la familia de las iturinas, es la que posee fuerte actividad contra *Botrytis cinerea*, pues inhibe la germinación de esporas de este (Farace *et al.*, 2015) y también se ha sido probado contra este hongos en plantas de tomate (Kefi *et al.*, 2015).

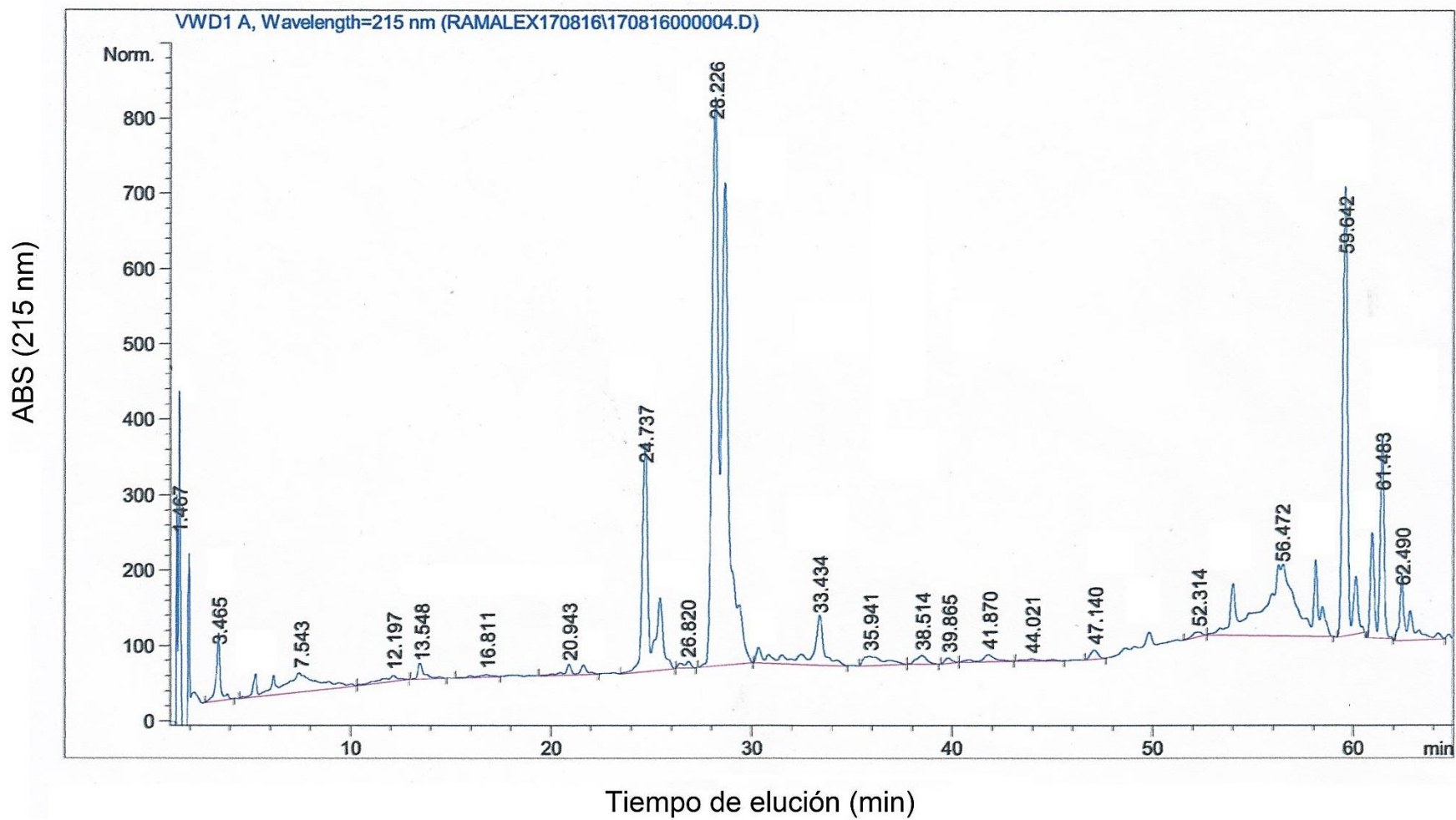


Figura 23. Cromatograma de HPLC de compuestos obtenidos de BsQ11.

Cuadro 16. Principales picos de masa (m/z) de los lipopéptidos caracterizados por MALDI-TOF/TOF y su identificación.

<b>Fracción</b>	<b>Peso molecular (m/z)</b>	<b>Posible iturina</b>	<b>Referencia</b>
9	1071	Aspargina-C13 Bacilomicina F C16-Iturin A6/A7 C16 [M+H] <sup>+</sup> (C16-Iturina [M+H] <sup>+</sup> )	(Lee <i>et al.</i> , 2008) (Pathak y Keharia, 2014)
9	1093	C16-Iturin A6/A7[M+Na] <sup>+</sup> C16-Iturina [M+Na] <sup>+</sup>	(Pathak y Keharia, 2014) (Athukorala <i>et al.</i> , 2009)
9	1109	(C16) Iturin A6/A7[M+K] <sup>+</sup>	(Pathak y Keharia, 2014)
11	1085	C17-Iturina [M+ H] <sup>+</sup>	(Kefi <i>et al.</i> , 2015)
11	1107	C17-Iturina [M+ Na] <sup>+</sup>	(Pathak y Keharia, 2013)
11	1123	C17-Iturina [M+K] <sup>+</sup>	(Vater <i>et al.</i> , 2002)
12	1107	Aminoacido inespecífico- C16 Bacilomicina F	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
12	1122	C17-Iturina [M+K] <sup>+</sup>	(Vater <i>et al.</i> , 2002; Pathak y Keharia, 2013)

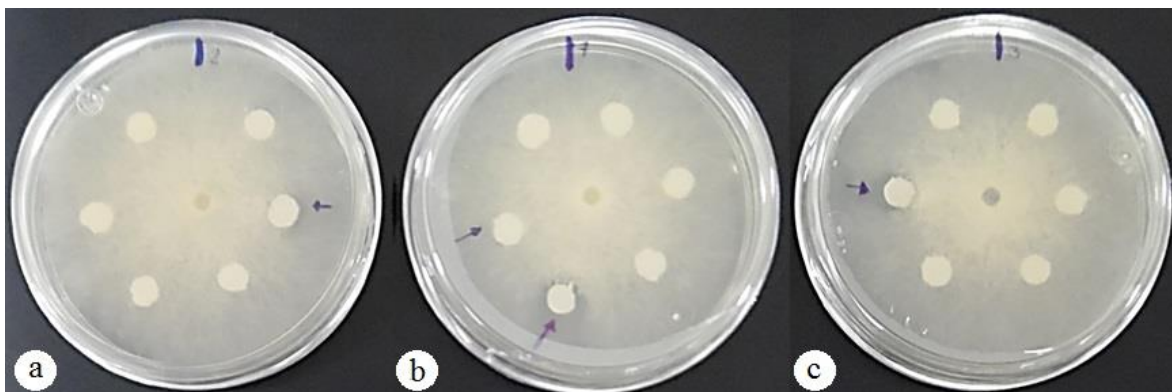


Figura 24. Efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas del HPLC de lipopéptidos de BsQ11 en *Rhizoctonia solani*. La imagen muestra actividad antimicrobiana de las fracciones a) 9, b) 11 y c) 12 de las fracciones obtenidas por HPLC de BsQ11.

La información antes descrita, demuestra que el efecto de los compuestos producidos por las diferentes cepas de *Bacillus subtilis* es de gran utilidad contra una gran cantidad de hongos (Farace *et al.*, 2015) de importancia agrícola. Por esta razón, resulta de vital importancia ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de producción. Como ejemplo, se ha descrito que los metabolitos antifúngicos, en *Bacillus subtilis*, se elaboran en la fase exponencial tardía y la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012; Sajitha y Dev, 2016). En condiciones naturales, el tipo de lipopéptidos se puede modificar por la fuente de carbono y nitrógeno, y las condiciones ambientales como pH y temperatura (Islam *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2014). Asimismo, las bacterias de la especie ya mencionada también pueden modificar la producción de lipopéptidos en respuesta a la presencia de patógenos (Sajitha y Dev, 2016).

Las especies endófitas de *Bacillus subtilis* tienen la capacidad de sintetizar iturinas, y a su vez fabricar otros tipos de lipopéptidos. También pueden elaborar otros metabolitos de distinta naturaleza, y con capacidad antimicrobiana, como lo son la quitina, y péptidos, con las cuales se mejoran las propiedades en términos de actividad y especificidad por parte de estas cepas para su uso en el control biológico (Kefi *et al.*, 2015; Lee y Kim, 2015).



Por otra parte, la comercialización y producción de estos compuestos dirigidos al control de enfermedades en los cultivos, resulta una alternativa ideal ante otros productos, ya que son de baja toxicidad, altamente biodegradables y eficientes aún en altas temperaturas, pH y salinidad (Inès y Dhouha, 2015). Lo que denota la repercusión que tiene la investigación de compuestos, que sean de bajo costo y no tóxicos con la salud ambiental y humana (Balouiri *et al.*, 2016). Igualmente, se ratifica que la aplicación de compuestos o de bacterias pueden inducir el crecimiento vegetal e inductores de mecanismos de defensa, como un arma adicional contra los fitopatógenos (Shafi *et al.*, 2017).

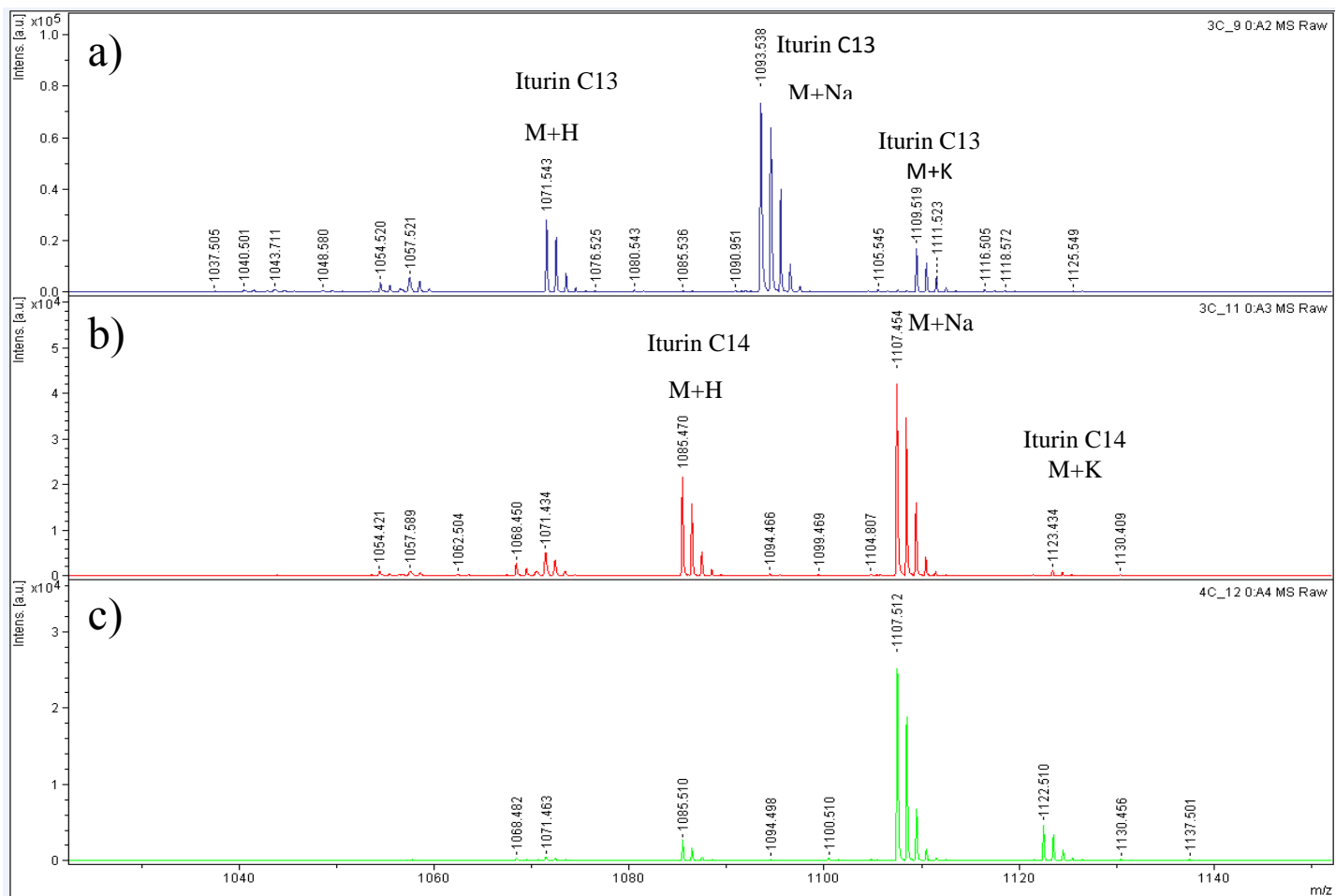


Figura 25. Espectro de MALDI-TOF/TOF RM obtenido de las fracciones con actividad antifúngica de los lipopéptidos de BsQ11. Se muestra espectros individuales de las fracciones a) 9, b) 11 y c) 12, obtenidas por HPLC y que mostraron un efecto antagónico contra el hongo *Rhizoctonia solani*.

## VIII. CONCLUSIONES

Se mostró la importancia de la detección y la dinámica del control de *Botrytis cinerea* en plantas de vid mediante la aplicación de diferentes herramientas tecnológicas, cumpliendo los objetivos planteados se concluyó lo siguiente:

- La amplificación de marcadores C729+/-, específicos de *Botrytis cinerea* permitieron su detección en frutos de cultivos de vid. Con lo cual se pudo determinar los valores de incidencia en los viñedos muestreados. La diferencia obtenida en la incidencia podría atribuirse al manejo cultural del viñedo y al inóculo primario presente en campo, puesto que no se encontró relación con las condiciones climáticas.
- La cepa Q11 de *Bacillus subtilis* presentó un efecto antagonista sobre diferentes cepas de *Bacillus cinerea* en plantas de vid. La información recabada a nivel experimental permitió determinar los factores: hospedero y patógeno, como determinantes de la presencia de enfermedad en los GLMM.
- Por último, los compuestos encontrados en mayor proporción y que son inhibidores del crecimiento de hongos, producidos por la cepa Q11 de *Bacillus subtilis*, son los lipopéptidos de la familia de las iturinas.

## IX. PERSPECTIVAS

Respecto a la detección oportuna evaluada, se espera poder mejorar o aplicar diferentes técnicas para el tratamiento previo de muestras, con el objetivo de disminuir tiempos en el diagnóstico. Así como probar otras variantes de la PCR en campo que permitan generar información para determinar condiciones de inóculo en campo y su impacto sobre éste.

En cuanto al antagonismo de la cepa Q11 de *Bacillus. Subtilis*, se deben probar su empleo en campo para determinar las dosis y uso adecuado. También su uso contra otros patógenos en diferentes hospederos. Se espera que este tipo de control se proponga como parte de un manejo integrado y sostenible.

Por último, en cuanto a los compuestos producidos por la cepa Q11 de *Bacillus subtilis*, las iturinas, se podría intervenir en una mayor producción de éstas para aumentar el biocontrol. Para lo cual se podría realizar ensayos con estos compuestos en campo o simplemente mejorar la producción de compuestos por parte de *Bacillus*.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* 223, 143-151.
- Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M.S., Khan, Q.M. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 331-336.
- Agueero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. L., Labavitch, J. M., Meredith, C. P., Dandekar, A. M. 2005. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology*, 6(1), 43-51.
- Alfonzo, A., Piccolo, S.L., Conigliaro, G., Ventorino, V., Burruano, S., Moschetti, G. 2012. Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. *Annals of Microbiology* 62, 1593-1599.
- Alkan, N., Espeso, E.A., Prusky, D. 2013. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxidants and Redox Signaling* 19, 1012-1025.
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., Aquino-Martínez, J. G. 2017. *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 170-185.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of applied microbiology* 108, 386-395.
- Athukorala, S.N.P., Fernando, W.G.D., Rashid, K.Y. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian journal of microbiology* 55, 1021-1032.
- AVQ, Asociación de Vitivinicultores de Querétaro. 2011. Estudio de impacto productivo de un viñedo. Ed. Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, Querétaro, México.

- Aziz, A., Verhagen, B., Magnin-Robert, M., Couderchet, M., Clément, C., Jeandet, P., Trotel-Aziz, P. 2016. Effectiveness of beneficial bacteria to promote systemic resistance of grapevine to gray mold as related to phytoalexin production in vineyards. *Plant and Soil* 405, 141-153.
- Bach, E., dos Santos Seger, G.D., de Carvalho Fernandes, G., Lisboa, B.B., Passaglia, L.M.P. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology* 99, 141-149.
- Baindara, P., Mandal, S.M., Chawla, N., Singh, P.K., Pinnaka, A.K., Korpole, S. 2013. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK. DU. 4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express* 3, 1.
- Balado-Dacosta, M. 2009. Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en *Vibrio anguillarum*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
- Barros, L. B., Biasi, L. A., Carisse, O., De Mio, L. L. M. 2015. Incidence of grape anthracnose on different VITIS labrusca and hibrid cultivars and rootstocks combination under humid subtropical climate. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 397-403.
- Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229-1240.
- Bernard, E., Larkin, R.P., Tavantzis, S., Erich, M.S., Alyokhin, A., Sewell, G., Lannan, A., Gross, S.D. 2012. Compost, rapeseed rotation, and biocontrol agents significantly impact soil microbial communities in organic and conventional potato production systems. *Applied Soil Ecology* 52, 29-41
- Bionda, N., Fleeman, R. M., De La Fuente-Núñez, C., Rodriguez, M. C., Reffuveille, F., Shaw, L. N., Pastar, I., Davis, S. C., Hancock, R. E. W., Cudic, P. 2016. Identification of novel cyclic lipopeptides from a positional scanning combinatorial library with enhanced antibacterial and antibiofilm activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108, 354-363.

- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H., White, J.-S.S. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 24, 127-135.
- Bridle, H. 2013. *Waterborne pathogens: Detection methods and applications*. Newnes. London, UK. 416 pp.
- Brink, J. C., Holz, G., & Fourie, P. H. 2017. Effect of fungicide spray cover on *Botrytis cinerea* infection in grape bunches. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 51-56.
- Bryan, G.T., Daniels, M.J., Osbourn, A.E. 1995. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 681-689.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., Teixidó, N. 2013. Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology* 62, 510-519.
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M.A., Tudzynski, P., Larrondo, L.F. 2013. Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: characterization of the White Collar Complex. *PLoS One* 8, e84223.
- Carisse, O., Bacon, R., Lasnier, J., McFadden-Smith, W. 2006. *Identification Guide to the Major Diseases of Grapes*. Agriculture and Agri-Food. Québec, Canada. pp. 52-74
- Castaño, E., Domínguez, J. 2010. *Diseño de experimentos: Estrategias y análisis en Ciencia y Tecnología*. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology* 8, 281-295.
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommès, J., Ongena, M. 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 87-100.
- Chen, X., Zhang, Y., Fu, X., Li, Y., Wang, Q. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology* 115, 113-121.

- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., Viaud, M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters, 277, 1-10.
- Ciliberti, N., Fermaud, M., Languasco, L., Rossi, V. 2015. Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 105(3), 325-333.
- Collins, D.P., Jacobsen, B.J., Maxwell, B. 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. Biological Control 26, 224-232.
- Creasy, G., L, Creasy, L.L. 2009. Grapes. CABI. New York, USA. 331 pp.
- Crespo-Sempere, A., Estiarte, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2013. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. International Journal of Food Microbiology 165, 214-220.
- Dabauza, M., Velasco, L., Pazos-Navarro, M., Pérez-Benito, E., Hellín, P., Flores, P., Gómez-Garay, A., Martínez, M.C., Lacasa, A. 2015. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* in genetically-modified *Vitis vinifera* L. plants over-expressing the grapevine stilbene synthase gene. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120, 229-238.
- De Boer, S.H., López, M.M. 2012. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. Annual Review of Phytopathology 50, 197-218.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13, 414-430.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., Paquot, M. 1999. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152(1), 3-10.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., Molina, A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. Frontiers in Plant Science 4, 155.



- 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*, 1-7.
- El-Hassan, S. A., Gowen, S. R. 2006. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Phytopathology*, 154(3), 148-155.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47, 25-35.
- Elmer, P.A.G., Michailides, T.J. 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. *In: Botrytis: Biology, pathology and control*. pp. 243-272. Springer, Netherlands.
- Erlich, H. 2015. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Springer. pp. 243-272. New York, USA. 246 pp.
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, Y. 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89-97.
- Fang, Y., Ramasamy, R. P. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*, 5(3), 537-561.
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E.A., Jacquard, C., Dorey, S. 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology* 16, 177-187.
- Fernández, J.G., Fernández-Baldo, M.A., Muñoz, C., Salinas, E., Raba, J., Sanz, M.I. 2014. Detection transposable elements in *Botrytis cinerea* in latent infection stage from symptomless apples. *Journal of Coastal Life Medicine* 2 (7): 125-131.
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., Schnabel, G. 2015. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 105(4), 424-432.

- Figueiredo, A., Monteiro, F., Sebastiana, M. 2015. First clues on a jasmonic acid role in grapevine resistance against the biotrophic fungus *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3), 645-652.
- Fillinger, S., Elad, Y. (Eds.) 2016. Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Springer International Publishing. London, UK. 486 pp.
- Fisher, A.A., Labenski, M.T., Monks, T.J., Lau, S.S. 2011. Utilization of MALDI-TOF to determine chemical-protein adduct formation *in vitro*. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, 691: 303-316.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., Gurr, S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186-194.
- Fraaije, B.A., Lovell, D.J., Rohel, E.A., Hollomon, D.W. 1999. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology* 86, 701-708.
- Fukushima, T., Allred, B.E., Sia, A.K., Nichiporuk, R., Yersen, U.N., Raymond, K.N. 2013. Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 13821-13826.
- García, T.R., Mudaparra, P.L. 2008. Buenas prácticas en producción ecológica “Cultivos de vid”. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España.
- Genov, N., Llop, P., Lopez, M. M., Bobev, S. G., Alvarez, B. 2015. Molecular and phenotypic characterization of *Agrobacterium* species from vineyards allows identification of typical *Agrobacterium vitis* and atypical biovar 1 strains. *Journal of Applied microbiology*, 118(6), 1465-1477.
- Ghafil, J.A. 2013. Extraction and purification of chitinase from *Bacillus subtilis*. *World Journal of Experimental Biosciences* 1, 5-9.
- Girón, P. 2014. El mercado del Vino en México. Estudios de mercado. ICEX España Exportación e inversiones. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México DF

- Gong, A.-D., Li, H.-P., Yuan, Q.-S., Song, X.-S., Yao, W., He, W.-J., Zhang, J.-B., Liao, Y.-C. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10, e0116871.
- Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2010. Quantification of fungal infection of leaves with digital images and Scion Image software. *Molecular and Cell Biology Methods for Fungi*, 638, 125-135. *In: Molecular and Cell Biology Methods for fungi.* (pp 125-135) Springer Science Business Media, Netherlands.
- Google-earth. 2016. Fotografías de viñedos Queretanos: Finca el Rosario, Viñedos Azteca y Bodegas de Cote. <https://www.google.com.mx/intl/es/earth/>. Última consulta 24 de noviembre de 2016.
- Govrin, E.M., Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Green, M.R., Sambrook, J. (Eds.) 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA. 2344 pp.
- Gupta, V.K., Sreenivasaprasad, S., Mach, R.L. 2015. *Fungal bio-molecules: Sources, applications and recent developments*. John Wiley & Sons. Oxford, UK. 408 pp.
- Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., O'Donovan, A. 2012. *Laboratory protocols in fungal Biology: Current methods in fungal biology*. Springer Science & Business Media. London, UK. 604 pp.
- Heil, M., Feil, D., Hilpert, A., Linsenmair, K.E. 2004. Spatiotemporal patterns in indirect defence of a South-East Asian ant-plant support the optimal defence hypothesis. *Journal of Tropical Ecology* 20, 573-580.
- Hibbett, D.S., Taylor, J.W. 2013. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology* 11, 129-133.
- Hiradate, S., Yoshida, S., Sugie, H., Yada, H., Fujii, Y. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* 61, 693-698.
- Hsieh, F.-C., Lin, T.-C., Meng, M., Kao, S.-S. 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Current Microbiology* 56, 1-5.

- Huang, T., Geng, H., Miyyapuram, V.R., Sit, C.S., Vederas, J.C., Nakano, M.M. 2009. Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity. *Journal of Bacteriology* 191, 5690-5696.
- Hunter, J. J., Skrivan, R., Ruffner, H. P. 1994. Diurnal and seasonal physiological changes in leaves of *Vitis vinifera* L.: CO<sub>2</sub> assimilation rates, sugar levels and sucrolytic enzyme activity. *Vitis*, 33(4), 189-195.
- Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T., Shirakawa, M. 2000. Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13654-13661.
- Inès, M., Dhouha, G. 2015. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* 71, 100-112.
- Islam, M., Jeong, Y.T., Lee, Y.S., Song, C.H. 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40, 59-66.
- Jacques, P. 2011. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. *In: Biosurfactants: from genes to applications*. Springer. pp. 57-91. London, UK.
- Jambhulkar, P.P., Sharma, P. 2014. Development of bioformulation and delivery system of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight of rice (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). *Journal of Environmental Biology* 35 (5): 843-849.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40, 411-441.
- Jasim, B., Sreelakshmi, K. S., Mathew, J., Radhakrishnan, E. K. 2016. Surfactin, Iturin, and Fengycin Biosynthesis by Endophytic *Bacillus*. *Microbial Ecology*, 72(1), 106-119.
- Jin, H., Zhang, X., Li, K., Niu, Y., Guo, M., Hu, C., Wan, X., Gong, Y., Huang, F. 2014. Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. *PloS One* 9, e111171.
- Jones, G.V., Davis, R.E. 2000. Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 249-261.
- Junker, R.R., Keller, A. 2015. Microhabitat heterogeneity across leaves and flower organs promotes bacterial diversity. *FEMS microbiology ecology* 91, fiv097.

- Kaelin, P., Gadani, F. 2000. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. *Current Microbiology* 40, 205-209.
- Kefi, A., Slimene, I.B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., Limam, F. 2015. Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1967-1976.
- Keller, M. 2015. *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. Academic Press. Prosser, WA, USA. 522 pp.
- Kennedy, S. 2011. *PCR troubleshooting and optimization: The essential guide*. Horizon Scientific Press. Edinburgh, UK. 235 pp.
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., Bayat, H. 2012. Morphological and Molecular Identification of *Botrytis cinerea* Causal Agent of Gray Mold in Rose Greenhouses in Central Regions of Iran. *International Journal of Agricultural Science and Research* 1, 19-24.
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology* 97, 942-949.
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.-T. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology Biotechnology* 20, 138-145.
- Kisluk, G., Hoover, D.G., Kneil, K.E., Yaron, S. 2012. Quantification of low and high levels of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on leaves. *LWT-Food Science and Technology* 45, 36-42.
- Kiss, L., Holb, I. J., Rossi, V., Cadle-Davidson, L., Jeger, M. J. 2016. Foreword: Special issue on fungal grapevine diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 144(4), 693-694.

- Konstantinou, S., Veloukas, T., Leroch, M., Menexes, G., Hahn, M., Karaoglanidis, G. 2015. Population structure, fungicide resistance profile, and *sdhB* mutation frequency of *Botrytis cinerea* from strawberry and greenhouse-grown tomato in Greece. *Plant Disease*, 99(2), 240-248.
- Kose, B. 2014. Phenology and ripening of *Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L. varieties in the maritime climate of Samsun in Turkey's black sea region. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35, 90-102.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M.A. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5, e1000696.
- Laine, A.L., Barrès, B. 2013. Epidemiological and evolutionary consequences of life-history trade-offs in pathogens. *Plant Pathology* 62, 96-105.
- Lee, H., Churey, J. J., Worobo, R. W. 2008. Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssoschlamys fulva* H25. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 663-673.
- Lee, D.W., Kim, B.S. 2015. Antimicrobial cyclic peptides for plant disease control. *The Plant Pathology Journal*, 31, 1-11.
- Lemanceau, P., Maron, P. A., Mazurier, S., Mougel, C., Pivato, B., Plassart, P., Ranjard, L., Revellin, C., Tardy, V., Wipf, D. 2015. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 67-81.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13
- Madhu, A.N., Prapulla, S.G. 2014. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 1777-1789.
- Magnin-Robert, M., Quantinet, D., Couderchet, M., Aziz, A., Trotel-Aziz, P. 2013. Differential induction of grapevine resistance and defense reactions against *Botrytis cinerea* by bacterial mixtures in vineyards. *BioControl*, 58(1), 117-131.

- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L.R. 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 1-25.
- Martínez-Álvarez, J.C., Castro-Martínez, C., Sánchez-Peña, P., Gutiérrez-Dorado, R., Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32, 1-10.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A., Ward, E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59, 129-142.
- Melander, B., Rasmussen, I.A., Bàrberi, P. 2005. Integrating physical and cultural methods of weed control-examples from European research. *Weed Science* 53, 369-381.
- Meldau, S., Erb, M., Baldwin, I.T. 2012. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of Botany* 110, 1503-1514.
- Mnif, I., Ghribi, D. 2015. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science* 104, 129-147.
- Molina-Quijada, D.M.A., Medina-Juárez, L.A., González-Aguilar, G.A., Robles-Sánchez, R.M., Gámez-Meza, N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. *CyTA—Journal of Food* 8, 57-63.
- Molitor, D., Rothmeier, M., Behr, M., Fischer, S., Hoffmann, L., Evers, D. 2015. Crop cultural and chemical methods to control grey mould on grapes. *VITIS-Journal of Grapevine Research* 50 (2), 81-87.
- Murakami, P.F., Turner, M.R., van den Berg, A.K., Schaberg, P.G. 2005. An instructional guide for leaf color analysis using digital imaging software. United States Department of Agriculture Publication. Delaware, OH. USA. 33p.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20 (22), 6115.

- Myung, K., Klittich, C. J. 2015. Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs?. *Drug Discovery Today*, 20(1), 7-10.
- Narasimhan, A., Shivakumar, S. 2012. Optimization of chitinase produced by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* using Plackett-Burman design. *European Journal of Experimental Biology* 2, 861-865.
- Narayananasamy, P. 2013. *Biological Management of diseases of crops*. Springer, New York, USA. 364 pp.
- Nasir, M. N., Laurent, P., Flore, C., Lins, L., Ongena, M., Deleu, M. 2013. Analysis of calcium-induced effects on the conformation of fengycin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 110, 450-457.
- Nicholson, P., Lees, A.K., Maurin, N., Parry, D.W., Rezanoor, H.N. 1996. Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 257-271.
- OIV. 2016. *World vitiviniculture situation: OIV statistical report on world vitiviniculture*. International Organisation of Vine and Wine, Paris. 16 pp
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(1), 29-38.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J-L., Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Ongena, M., Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16, 115-125.
- O'neal, M.E., Landis, D.A., Isaacs, R. 2002. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *Journal of Economic Entomology* 95, 1190-1194.



- Pande, S., Galloway, J., Gaur, P.M., Siddique, K.H.M., Tripathi, H.S., Taylor, P., MacLeod, M.W.J., Basandrai, A.K., Bakr, A., Joshi, S. 2006. *Botrytis* grey mould of chickpea: a review of biology, epidemiology, and disease management. *Crop and Pasture Science* 57, 1137-1150.
- Parry, D.W., Nicholson, P. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45, 383-391.
- Pathak, K. V., Keharia, H. 2013. Characterization of fungal antagonistic bacilli isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) using intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry (ICMS). *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1300-1310.
- Pathak, K.V., Keharia, H. 2014. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech* 4, 283-295.
- Percival, D.C., Sullivan, J.A., Fisher, K.H. 2015. Effect of cluster exposure, berry contact and cultivar on cuticular membrane formation and occurrence of bunch rot (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) with 3 *Vitis vinifera* L. cultivars. *VITIS-Journal of Grapevine Research* 32, 87.
- Pettitt, T. R., Wakeham, A. J., Wainwright, M. F., White, J. G. 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology*, 51(6), 720-727.
- Piepho, H.P. 1999. Analysing disease incidence data from designed experiments by generalized linear mixed models. *Plant Pathology* 48, 668-674.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2012. *Fungi and food spoilage*. Springer Science & Business Media. Sydney, Australia. 593 pp.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., Ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K., Van Kan, A. L. 2013. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *In: Fungal Pathology*. Springer Science & Business Media. pp. 33-64. Netherlands
- Qiu, W., Feechan, A., Dry, I. 2015. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture Research*, 2, 15020.

- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.
- Raaijmakers, J.M., Mazzola, M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 50, 403-424.
- Rabinow, P., 2011. Making PCR: A story of biotechnology. University of Chicago. Chicago, USA. 198 pp.
- Raffaele, S., Kamoun, S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* 10, 417-430.
- Reglinski, T., Elmer, P.A.G., Taylor, J.T., Parry, F.J., Marsden, R., Wood, P.N. 2005. Suppression of *Botrytis* bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Australasian Plant Pathology* 34, 481-488.
- Reynier, A. 2002. Manual de Viticultura: Guía técnica de viticultura. Mundi-Prensa Libros. Lavoisier, Francia. 297 pp.
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., Viret, O. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 209, 169-174.
- Rigotti, S., Viret, O., Gindro, K. 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Phytopathologia Mediterranea* 45, 253-260.
- Rimelspach, J.W., Hicks, T.E., Hand, F.P. 2004. Families of fungicides for turfgrass. <https://turfdisease.osu.edu/sites/turfdisease/files/imce/Fungicide%20chart%202014.pdf>. Última consulta 23 marzo 2017.
- Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C.E., Santoyo, G. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 22, 45-57.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., Droby, S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69-76.

- Ronseaux, S., Clément, C., Barka, E.A. 2013. Interaction of *Ulocladium atrum*, a potential biological control agent, with *Botrytis cinerea* and grapevine plantlets. *Agronomy* 3, 632-647.
- Rosslenbroich, H.-J., Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19, 557-561.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L.L. 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53, 303-317.
- Sajitha, K.L., Dev, S.A. 2016. Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. *Biological Control* 96, 78-85.
- Santos, A., Sánchez, A., Marquina, D. 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159, 331-338.
- Sanzani, S.M., Schena, L., De Cicco, V., Ippolito, A. 2012. Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 68, 64-71.
- Settanni, L., Corsetti, A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. *Journal of Microbiological Methods* 69, 1-22.
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-14.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50, 205-221.
- Simberloff, D. 2012. Risks of biological control for conservation purposes. *BioControl* 57, 263-276.
- Singh, A.K., Rautela, R., Cameotra, S.S. 2014. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microbial Cell Factories* 13 (1): 67.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultura Research* 9, 1265-1277.
- Snowden, A.L. 2010. Post-harvest diseases and disorders of and vegetables. Manson Publishing. London, UK. 320 pp.

- Song, J., Smart, R., Wang, H., Damberg, B., Sparrow, A., Qian, M. C. 2015. Effect of grape bunch sunlight exposure and UV radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food chemistry*, 173, 424-431.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845-857.
- Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A., Entian, K.-D. 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2349-2353.
- Su, F., Gilard, F., Guérard, F., Citerne, S., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N., Dhondt-Cordelier, S. 2016. Spatio-temporal responses of arabidopsis leaves in photosynthetic performance and metabolite contents to *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Frontiers in Plant Science* 7: 403.
- Toruño, T.Y., Stergiopoulos, I., Coaker, G. 2016. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology* 54, 419-441.
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S. 2012. Bacterial inoculants for field applications under Mountain Ecosystem: Present initiatives and future prospects. *In: Bacteria in agrobiology: Plant probiotics*. Springer. pp. 15-44. London, UK.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S. S. 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255, 571-586.
- Waewthongrak, W., Pisuchpen, S., Leelasuphakul, W. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 44-49.
- Walters, D. 2009. Disease control in crops: Biological and environmentally-friendly approaches. Wiley-Blackwell, Singapore, India. 280 pp.

- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., McCartney, H. A. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145(1), 1-16.
- Wijekoon, C.P., Goodwin, P.H., Hsiang, T. 2008. Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software. *Journal of Microbiological Methods* 74, 94-101.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561-580.
- Wintermute, H.E. 2015. Pixlr. Technical Services Quarterly. Taylor & Francis, pp. 226-228. <http://pixlr>.
- Xue, Q.-Y., Chen, Y., Li, S.-M., Chen, L.-F., Ding, G.-C., Guo, D.-W., Guo, J.-H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control* 48, 252-258.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Teixidó, N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132(4), 609-619.
- You, C., Zhang, C., Kong, F., Feng, C., Wang, J. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl–mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. *Ecological Engineering* 91, 119-125.
- Yuan, J., Li, B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q., Huang, Q. 2012. Production of bacillomycin-and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 2976-2981.
- Yuan, S., Wang, L., Wu, K., Shi, J., Wang, M., Yang, X., Shen, Q., Shen, B. 2014. Evaluation of *Bacillus*-fortified organic fertilizer for controlling tobacco bacterial wilt in greenhouse and field experiments. *Applied Soil Ecology* 75, 86-94.
- Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y., Zheng, X. 2008. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. *Biological Control* 47, 60-65.

Zhu, Z., Zhang, J., Wu, Y., Ran, W., Shen, Q. 2013. Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 2105-2114.