



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología

“Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinífera* L)”

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Braulio Carrillo Carrillo

Dirigido por:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

2020.

México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

“Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinifera* L)”

Tesis individual
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:
Braulio Carrillo Carrillo

Dirigido por:
Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Presidente

Firma

M. en C. José Alejandro Cabrera
Luna
Secretario

Firma

Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños
Vocal

Firma

Dr. Santiago Vergara Pineda
Vocal

Firma

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Vocal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2020.
México

Querétaro, Qro., 25 de septiembre de 2020.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Biología
P r e s e n t e

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado la **Tesis Individual** titulada "Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinifera* L)", de Braulio Carrillo Carrillo, con número de expediente 246078, de la Licenciatura en Biología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio** para que continúe con sus trámites de titulación.

Atentamente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Director

Querétaro, Qro., 25 de septiembre de 2020.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales

H. Consejo Interno de la Licenciatura en Biología

Presente

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado la **Tesis Individual** titulada "Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinífera* L)", de Braulio Carrillo Carrillo, con número de expediente 246078, de la Licenciatura en Biología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio** para que continúe con sus trámites de titulación.

Atentamente



Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños (14800)

Asesora

Querétaro, Qro., 25 de septiembre de 2020.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales

H. Consejo Interno de la Licenciatura en Biología

P r e s e n t e

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado la **Tesis Individual** titulada "Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinifera* L.)", de Braulio Carrillo Carrillo, con número de expediente 246078, de la Licenciatura en Biología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio** para que continúe con sus trámites de titulación.

Atentamente



Dr. Santiago Vergara Pineda (12190)

Asesor

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Querétaro, Qro., 25 de septiembre de 2020.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Biología
Presente

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado la **Tesis Individual** titulada "Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinifera* L)", de Braulio Carrillo Carrillo, con número de expediente 246078, de la Licenciatura en Biología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy mi voto aprobatorio para que continúe con sus trámites de titulación.

Atentamente

M. en C. José Alejandro Cabrera Luna (9393)

Asesor

Querétaro, Qro., 25 de septiembre de 2020.

H. Consejo Académico de la Facultad de Ciencias Naturales
H. Consejo Interno de la Licenciatura en Biología
P r e s e n t e

Por este conducto comunico a ustedes que he revisado la **Tesis Individual** titulada "Evaluación de agentes de control biológico de *Botrytis*, causante de la podredumbre gris en vid (*Vitis vinifera* L)", de Braulio Carrillo Carrillo, con número de expediente 246078, de la Licenciatura en Biología, y una vez habiéndolo encontrado satisfactorio, doy **mi voto aprobatorio** para que continúe con sus trámites de titulación.

Atentamente

Esquivel Naranjo Edgardo U.

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo (11699)

Asesor

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

RESUMEN

El uso de biofungicidas es una alternativa a los fungicidas convencionales, debido a su bajo impacto ambiental. El objetivo del estudio fue evaluar la eficiencia de las cepas bacterianas *Bacillus methylotrophicus* (FR4B12) y *B. subtilis* (P24), y la levadura *Metschnikowia pulcherrima* (NB9) como agentes de biocontrol de la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea*, en frutos de uva y plantas de vid. Para ello se realizaron ensayos *in vitro* mediante confrontaciones duales entre el patógeno y los antagonistas, donde se registró la inhibición del crecimiento micelial en cada tratamiento. Posteriormente, los antagonistas se llevaron a ensayos de control de infección en frutos de uva de mesa "Green seedless" previamente infectados con *Botrytis*, los valores obtenidos se convirtieron en grados angulares para su análisis de varianza y la prueba Post Hoc Tukey (95%). FR4B12 y NB9 fueron seleccionadas para aplicarse en dos variedades de vid (*Vitis vinifera* L.), "Cabernet Sauvignon" y "Syrah", inoculadas previamente con *B. cinerea*. Después de dos semanas, la necrosis causada por *Botrytis* en hojas fue registrada mediante captura de imágenes digitales en el software ImageJ, el análisis de datos se realizó mediante la comparación del daño foliar entre los tratamientos, aplicando un modelo lineal generalizado con distribución de error quasibinomial y función de ligamiento logit. En los ensayos duales la cepa FR4B12 mostró baja eficiencia para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* con un 40.9%. Mientras que en frutos, las cepas P24 y NB9 mostraron un 90.1% y 89.7%, respectivamente, en control de la infección, siendo similares entre ellos ($P > 0.05$). En los ensayos en planta en invernadero, el tratamiento con FR4B12 registró 6.5% del área dañada en las hojas, y NB9 un 19.7% de daño ($P < 0.05$). No encontrándose diferencias en la incidencia de daños en comparación con el control positivo ($P > 0.05$) (84.3%). En conclusión FR4B12 y NB9 presentan mejor efecto de biocontrol de *Botrytis* en hojas y frutos, respectivamente.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotrophicus*, *Metschnikowia pulcherrima*, antagonismo, Querétaro.

ABSTRACT

The use of biofungicides is an alternative to conventional fungicides, due to its low environmental impact. The objective in this study was to evaluate the efficiency of the bacterial strains *Bacillus methylotrophicus* (FR4B12) and *B. subtilis* (P24), and the yeast *Metschnikowia pulcherrima* (NB9) as biocontrol agents of gray rot caused by *Botrytis cinerea*, this in grape fruits and grape plants. For this, *in vitro* tests were carried out by means of dual confrontations between the pathogen and the antagonists, where the growth radius was measured in each treatment, the same antagonist strains were tested in grape fruits "Green seedless" that was previously induced infection, the damage values presented in both cases were converted into angular degrees for their analysis of variance and the Post Hoc Tukey test (95%). FR4B12 and NB9 were selected to be applied to two varieties of vine plants (*Vitis vinifera* L.), "Cabernet Sauvignon" and "Syrah", previously inoculated with *B. cinerea*. After two weeks, the necrosis caused by *Botrytis* in leaves was recorded by digital image capture in the ImageJ software, the data analysis was performed by comparing the leaf damage between the treatments, applying a generalized linear model with quasibinomial error distribution and logit linkage function. In the dual tests the strain FR4B12 showed low efficiency to inhibit the growth of *B. cinerea* with 40.9%. While in fruits, the P24 and NB9 strains showed 90.1% and 89.7%, respectively, of control in damage, being similar between them ($P > 0.05$). In the greenhouse plant trials, the treatment with FR4B12 registered 6.5% of the damaged area on the leaves, and NB9 a 19.7% damage ($P < 0.05$). No differences were found in the incidence of damage compared to the positive control ($P > 0.05$) (84.3%). In conclusion, FR4B12 and NB9 show a better biocontrol effect of *Botrytis* in leaves and fruits, respectively.

Key Words: *Bacillus subtilis*, *Bacillus methylotrophicus*, *Metschnikowia pulcherrima*, antagonism, Querétaro.

DEDICATORIAS

A mis padres, con cada sonrisa, abrazo, sacrificio, regaños y palabras me motivaron, por ellos llegué a este momento.

A mis hermanos, los cuales sé que siempre estarán ahí.

A Paola Isabel y Fátima Ojeda, quienes se convirtieron en mi segunda familia en este trayecto.

A Maximiliano Ruíz, quien con sus pláticas, salidas, risas, corajes, preguntas y compañía me ayudó a ver un mejor mundo.

A mis docentes, ahora amigos, los cuales siempre complementaron mi desarrollo profesional y personal, además de hacerme aceptar cada reto.

A mis nuevos amigos de Química, quienes me hicieron sentir bienvenido en su facultad.

“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian” – Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, que apoya el desarrollo del proyecto de problemas nacionales con número de registro FCQ201843, gracias al cual se pudo desarrollar esta propuesta.

Al Dr. Juan Ramiro Pacheco, quien me abrió las puertas de su laboratorio, además de sus consejos sobre cómo compartir, desarrollar y plasmar las ideas.

A la Universidad Autónoma de Querétaro que siempre motiva el desarrollo profesional de los alumnos que la conforman.

A todo el equipo del laboratorio, por sus consejos, dirección, comentarios, risas y buenos ratos en el desarrollo del proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
DEDICATORIAS.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE CUADROS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES.....	13
II.I Biología e importancia de la uva (<i>Vitis vinifera</i> L.)	13
II.II Producción de uva.....	14
II.III Enfermedades que afectan la vid	17
II.IV Biología de <i>B. cinerea</i>	20
II.V Reproducción y dispersión.....	20
II.VII Métodos de detección.....	23
II.VIII Tratamientos convencionales y nuevas alternativas del manejo de enfermedades	24
II.IX Biocontrol de <i>B. cinerea</i>	29
III. HIPÓTESIS.....	32
IV. OBJETIVOS.....	33
IV.I General.....	33
IV.II Específicos	33
V. METODOLOGÍA.....	34
V.I Material biológico.....	34
V.II Ensayo <i>in vitro</i> : cultivos duales	34
V.III Ensayo <i>in vivo</i> : frutos de vid	36

V.III Ensayo <i>in vivo</i> : invernadero	39
V.IV Área foliar afectada	43
V.V Incidencia y severidad de daño	45
VI. RESULTADOS.....	46
VI.I Ensayo <i>in vitro</i> : Cultivos duales	46
VI.II Ensayo <i>in vivo</i> : Frutos de vid	48
VI.II Resultados de ensayo en vivero	50
VII. DISCUSIÓN	54
VIII. CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	61
ANEXO.....	76

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales variedades y uso de uva cultivadas en México	16
Cuadro 2. Principales fungicidas químicos empleados en prevenir o combatir la pudrición gris	26
Cuadro 3. Principales fungicidas con base en extractos de plantas comercializados en México.	27
Cuadro 4. Características de morfología y de madurez de las uvas usadas en el ensayo.....	36
Cuadro 5. Analisis de datos entre los factores, donde se muestra a los tratamientos como variable significativa.....	51
Cuadro 6. Comparacion entre tratamientos, donde se muestra la diferencia que existe entre tratamientos.....	51
Cuadro 7. Porcentajes de incidencia y severidad para cada tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres morfológicos de la hoja de vid que permiten su caracterización a nivel de variedad.....	13
Figura 2. Proporciones de producción de uva en cada continente para el ciclo 2016-2017.....	15
Figura 3. Producción de uva neta en México para el ciclo 2016-2017.....	15
Figura 4. Enfermedades que afectan a la vid.	19
Figura 5. <i>B. cinerea</i> infectando un cotiledón de <i>Lisianthus</i> ; <i>B. cinerea</i> creciendo en medio enriquecido con jugo de tomate.....	20
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Botrytis</i>	21
Figura 7. Estructuras de resistencia desarrolladas por <i>Botrytis</i> según las condiciones, en placas petri.....	22
Figura 8. Cuerpo fructífero de <i>Botrytis</i> , llamado <i>Botryotinia fuckeliana</i>	22
Figura 9. Desarrollo de un agente de biocontrol para su futura comercialización.....	28
Figura 10. Establecimiento de cultivos duales para ensayos de confrontación.....	35
Figura 11. Placa petri que muestra el crecimiento de <i>B. cinerea</i> , previo al ensayo con antagonistas y, grupo de réplicas en los ensayos duales.	36
Figura 12. Proceso para la obtención de esporas del patógeno y obtención de células de los antagonistas provenientes de cultivos líquidos.....	37
Figura 13. Uvas estériles para el ensayo de control de infección y esquema del montaje.....	38
Figura 14. Distribución de las plantas de vid empleadas para el ensayo de control de infección en invernadero.	41

Figura 15. Montaje de la prueba en invernadero	42
Figura 16. Registro de las condiciones, temperatura y humedad relativa.....	42
Figura 17. Esquema de la captura de imágenes en el ensayo en invernadero	43
Figura 18. Imágenes capturadas para determinar el daño por <i>Botrytis</i> en hoja en cada tratamiento.....	44
Figura 19. Eficiencia de los agentes de control biológico sobre seis cepas de <i>B. cinerea</i> , de acuerdo al porcentaje de inhibición <i>in vitro</i>	46
Figura 20. Cultivos duales de <i>B. cinerea</i> vs antagonistas.....	47
Figura 21. Porcentajes de inhibición de cada antagonista sobre cada cepa de <i>B. cinerea</i> evaluada	48
Figura 22. Uvas de la variedad Green seedless empleadas para el ensayo.	49
Figura 23. Actividad inhibitoria de los agentes antagonistas en el ensayo en frutos.....	50
Figura 24. Porcentaje de área total foliar sana y con daño en cada tratamiento.....	52

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la producción de uva (*Vitis vinifera* L.) ha aumentado un 6.05% en nuestro país (SAGARPA, 2017) donde la calidad del fruto es lo que determina la rentabilidad del cultivo, Velásquez *et al.* (2013) indican que el mal manejo de los viñedos, la susceptibilidad a plagas y la incidencia de enfermedades merma la cosecha.

Entre las enfermedades con mayor incidencia en vid se encuentran la pudrición negra, la agalla de la corona, la enfermedad de Pierce, el enrollamiento de las hojas, el oídio y la podredumbre gris (Kiss *et al.*, 2016). *B. cinerea* es el agente causal de la podredumbre gris, reportado en más de 200 especies de plantas, tales como manzana, fresa, col, zanahoria, mostaza, pimiento y uva entre otros, en las que primeramente es observable un característico micelio gris que culmina en pudrición (Pande *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 2016).

Se le considera de importancia económica, ya que se calcula una inversión global de hasta mil millones de euros anuales en su prevención (Dean *et al.*, 2012; Kiss *et al.*, 2016), dicho impacto se considera un obstáculo para alcanzar los objetivos de comercialización de uva, tal es el caso de Querétaro, el cual cuenta con las condiciones climáticas necesarias para su cultivo, sin embargo, el alto costo de los insumos y servicios requeridos, la falta de capacitación, lo demandante y delicado que es atender el plantío de vid, entre otras, dando como resultado una baja producción según el potencial calculado (Amo-Flórez, 2018; SAGARPA-CMV, 2018; ENA, 2018).

El monitoreo temprano, evaluación e identificación de enfermedades en plantas es importante para evitar pérdidas. Al inicio resultaban costosos estos análisis; sin embargo, han mejorado y reducido sus costos, por lo que ha beneficiado diferentes áreas de estudio, tal es el caso de la farmacéutica, biotecnología y agronomía, entre otras (Kolukisaoglu y Thurow, 2010; Mayr y Bojanic, 2009) lo que ha permitido el desarrollo de alternativas para hacer frente a tales obstáculos.

El desarrollo de programas de software para estimar daños ha sido extenso, entre ellos destaca ImageJ, por ser de código libre y operar en cualquier sistema operativo (Abramoff *et al.*, 2004; Ferreira y Rasband, 2012), Papadupolus *et al.* (2007) describen al programa como una eficiente herramienta por su fácil adaptación según el objetivo de estudio.

Anteriormente, al observar señales de infección en cultivos, se hacía uso de fungicidas sintéticos para combatir la enfermedad, su adquisición y uso se regularizó por daños al ambiente y a la salud pública (Romanazzi y Feliziani, 2014; Romanazzi *et al.*, 2016). Sin embargo, disminuir su uso no resultaba factible por la demanda de alimentos por lo tanto es indispensable el desarrollo de alternativas sustentables para el control de enfermedades; el control biológico surgió como una alternativa para el tratamiento de enfermedades en diferentes cultivos (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Se define como biocontrol al conjunto de estrategias aplicadas para prevenir o tratar enfermedades usando otros organismos vivos como levaduras, hongos o bacterias o bien compuestos segregados por ellos, que presenten actividad antagónica sobre el patógeno, sin afectar al huésped o al humano (Romanazzi *et al.*, 2016; Haidar *et al.*, 2016; Flores-Ruíz *et al.*, 2015).

Shafi *et al.* (2017) y Tejera-Hernández *et al.* (2011) señalan a las bacterias del género *Bacillus* como eficientes al aplicarlas como control biológico. Por otro lado en las levaduras se reconocen representantes de los géneros *Candida*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces* y *Wickerhamomyces* como agentes antagonistas de patógenos (Manso y Nunes, 2011; Parafati *et al.*, 2015).

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el potencial antagónico de las bacterias *B. methylotrophicus* (Cepa FR4B12), *B. subtilis* (Cepa P24) y la levadura, *M. pulcherrima* (Cepa NB9), contra el hongo causante de la podredumbre gris (*B. cinerea*), mediante pruebas *in vitro*, en fruto y en plantas de vid infectadas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Biología e importancia de la uva (*Vitis vinifera* L.)

Rubio-Ramos (2011) describe la vid como arbusto o liana de tallo herbáceo con zarcillos opuestos a las hojas; Reynier (1995) señala a las hojas como estructuras que permiten el reconocimiento de las variedades de vid que se han desarrollado durante su domesticación (Figura 1).

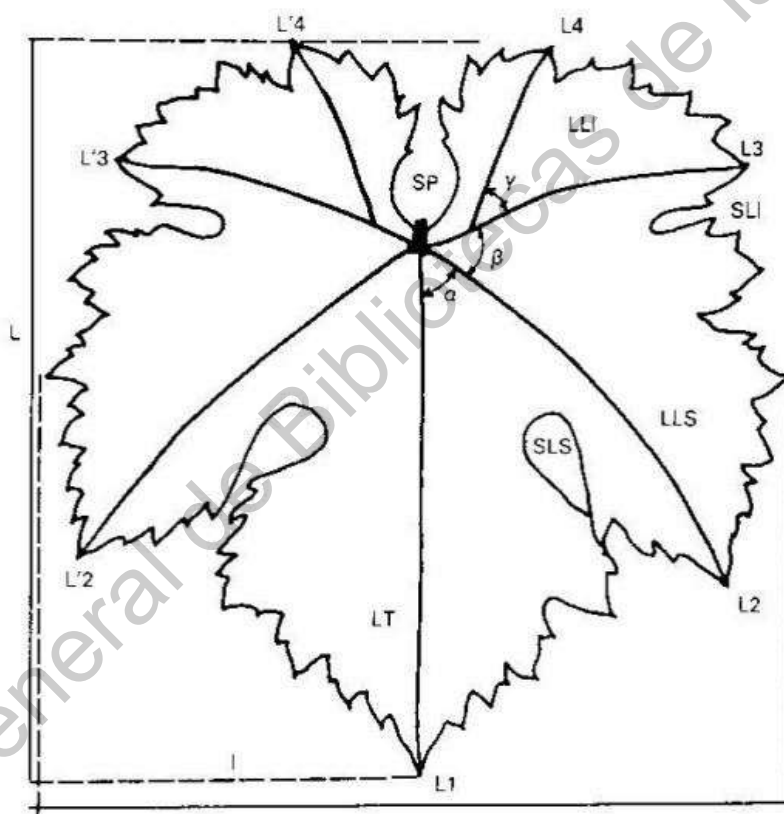


Figura 1. “Caracteres ampelográficos de la hoja, la hoja está organizada alrededor de las nervaduras [...]” Descripción básica de hoja, de la cual con sus cambios permite reconocer algunas variedades de vid (Reynier, 1995).

Las condiciones climáticas poseen una gran influencia en el ciclo fenológico y en la calidad del fruto, se conoce que es exigente de calor y humedad para su desarrollo, sin embargo puede resistir temperaturas bajas, entre los 10° y 30°C, llegando a tolerar hasta -15°C y una humedad relativa entre el 60 y 70%, resistiendo periodos de sequía (Rubio-Ramos, 2011; Song *et al.*, 2015).

El consumo de uva o sus productos se asocia a efectos positivos a la salud humana. Toscano-Tavares *et al.* (2015) reportan mejoras en el estado de humor en personas que usualmente se encontrarían bajo estrés por incluir vino en sus dietas; Esteves-Mar (2016) menciona beneficios en el consumo de jugos a base de uva para personas con diabetes. Sus propiedades benéficas lo han convertido en un cultivo atractivo no solo como alimento. México está colocado como el vigésimo noveno productor de uva en el mundo; de manera interna el 50% de la producción en México se destina como uva industrial, principalmente para elaborar vino (SAGARPA-SIAP, 2018).

II.II Producción de uva

Por sus características, propiedades y creciente popularidad, el cultivo de uva es uno de los de mayor producción, tan solo para el 2016 la FAO (por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization) (2019) registró una producción de 74, 992,047 toneladas y para el 2017 reportaron 74, 276,583 toneladas cosechadas globales. Siendo Europa quien se lleva la mayor producción de uva y Oceanía quien menos produce (Figura 2).

Durante los últimos años la producción en nuestro país ha ido en aumento; tan solo en el periodo 2015 - 2016 se registró un crecimiento del 6.05%, con 351,309 toneladas del fruto respecto al ciclo 2016 – 2017 donde se cosecharon 415, 889 toneladas de uva (FAO, 2019) (Figura 3).

En México se cultivan cerca de 80 variedades de uva (Cuadro 1), cuya producción se distribuye en 31,419 hectáreas del suelo nacional, de la uva obtenida el 50% se considera uva industrial (SAGARPA-SIAP, 2019), es decir, entra en proceso para obtener un producto, tal es el caso del vino; entre las variedades cultivadas principalmente, se encuentra Cabernet sauvignon como la favorita para obtener vino tinto (SAGARPA-SIAP, 2018).

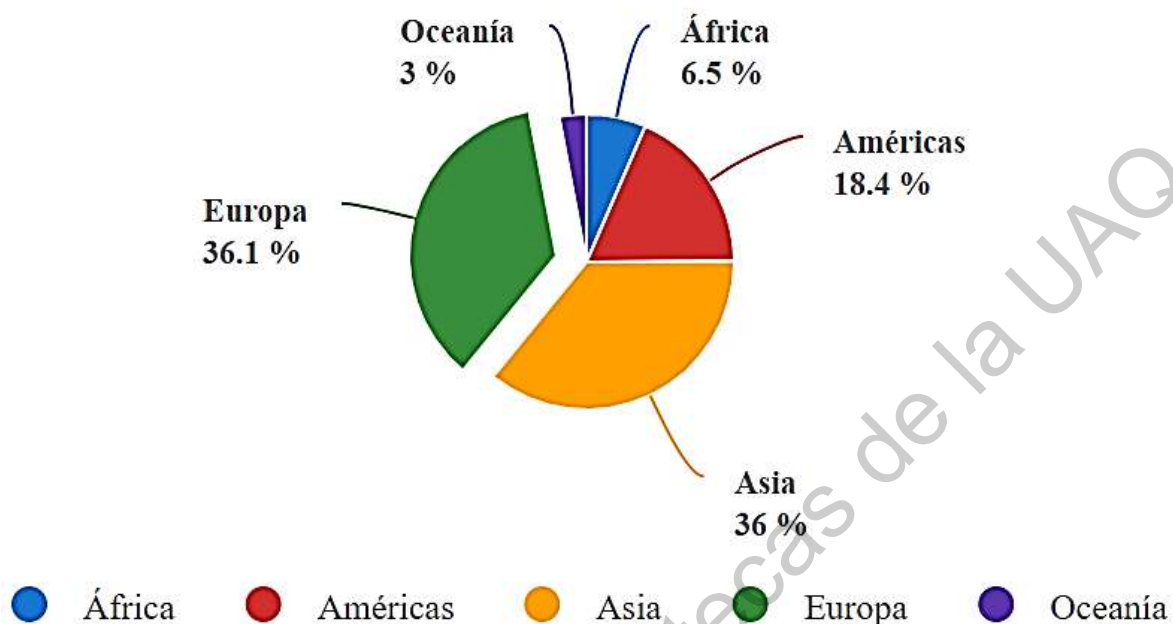


Figura 2. Proporciones de producción de uva en cada continente para el ciclo 2016-2017 (Tomado de FAO, 2019).

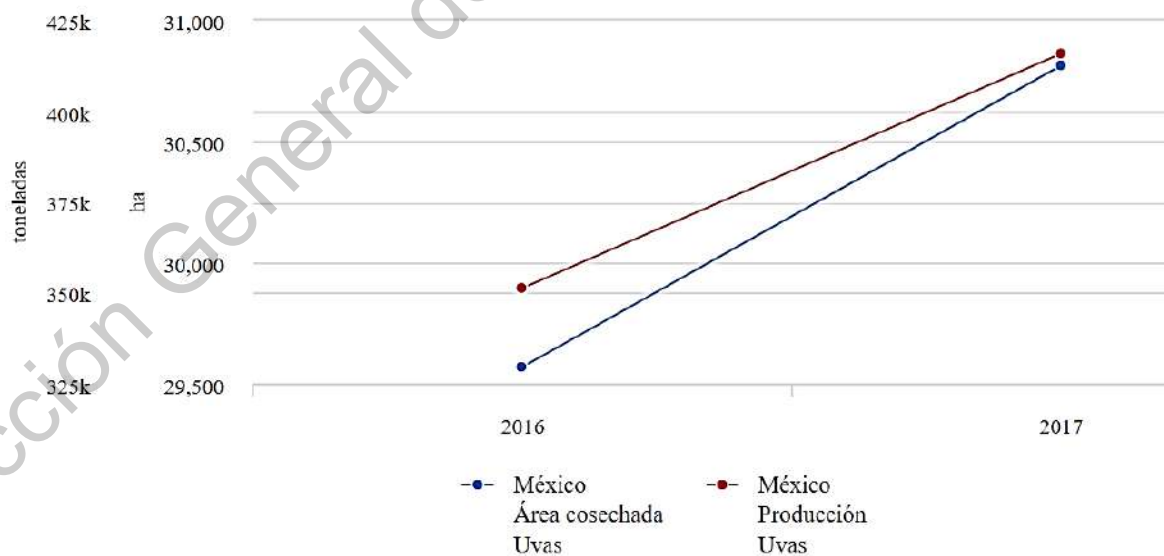


Figura 3. Producción de uva neta en México para el ciclo 2016-2017 (Tomado de FAO, 2019).

Registros de la SAGARPA-SIAP (2018) reporta a Baja California como el principal productor de uva industrial para México; en la sexta posición podemos encontrar a Querétaro, en el cual durante las últimas dos décadas ha tomado fuerza la producción de uva principalmente por el sector de turismo que crece a la par de la demanda del producto (SAGARPA-CMV, 2018).

Cuadro 1. Principales variedades y uso de uva cultivadas en México (Tomado de CEDRSSA, 2017).

Variedades	Tipo de vino
Tintas, Nebbiolo, Garnacha, Petit Cabernet y Turinga Nacional.	Tinto
Merlot, Syrah, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Moscatel, Lenuar, Globo Rojo, Malbec, Zinfandel y Chenin.	Vino de mesa (blanco, tinto y generoso)
Sauvignon Blanc, Macabeo, Pinot noir, Saint Emilio, Chenin Blanc y Chadonnay.	Vinos espumosos (80%) Vinos tranquilos (20%)
Syrah, Tempranillo, Cabernet Sauvignon, Salvador y Carignan.	Tinto reserva, Tinto joven, blancos y rosados.
Salvador y Carignan.	Tinto, Blanco, Brandy Leal y Aguardiente de uva.

El Consejo Mexicano Vitivinícola A.C. (2018) tiene registradas con mayor producción y consumo en el país las variedades rojas Cabernet Sauvignon, Merlot,

Syrah, Nebbiolo, Tempranillo, Zinfandel y Cabernet Franc y en variedades blancas están Chardonnay, Chenin Blanc, Sauvignon Blanc. En el estado de Querétaro las variedades que se cultivan principalmente son Cabernet Sauvignon, Carignan, Salvador, Merlot, Tempranillo y Syrah (SAGARPA-SIAP, 2018).

SIACON-SIAP (2019) reporta que en el estado de Querétaro se cultiva uva en los municipios de El Marqués, Ezequiel Montes, Huimilpan, Querétaro, San Juan del Río y Tequisquiapan; siendo Ezequiel Montes el mayor productor de uva en el estado y el municipio de Querétaro el menor con 1,073 y 3.4 toneladas, respectivamente para el año 2018, por lo que la producción de uva tiene un impacto en la economía del estado.

Querétaro cuenta con una de las dos rutas del vino más importantes de México, dicha ruta comprende los municipios de Ezequiel Montes, San Juan del Río y Tequisquiapan, en los que se considera de importancia económica por la derrama económica que representa para la población (Arévalo-Pacheco, 2018).

Según la AVQ (2011) las condiciones climáticas del estado, tales como la variación de calor y frío, entre estaciones como el día y la noche, la humedad relativa, radiación solar y vientos, entre otros, permiten cultivos de vid de calidad. La producción puede verse comprometida por retos sociales, sin embargo son los patógenos quienes afectan el rendimiento de la producción, principalmente de manera negativa (Citado en Juárez-Campusano, 2017, p. 6; Hunter y Bonnardot, 2011), por lo que el desarrollo de estrategias sustentables para prevenir o tratar enfermedades se convierte en una necesidad para los productores locales y no locales.

II.III Enfermedades que afectan la vid

Entre las principales enfermedades que afectan la producción de uva se encuentran la pudrición negra, la agalla de la corona, la enfermedad de Pierce, enrollamiento de las hojas, oídio y la podredumbre gris (Kiss *et al.*, 2016), tales enfermedades son las que afectan con mayor incidencia los cultivos alrededor del

globo, por lo que estudios sobre prevenirlas y tratarlas han tomado fuerza en los últimos años.

Guignardia bidwellii es el agente causal de la pudrición negra, germina después de haber tiempo húmedo prolongado, sólo afecta hojas jóvenes, por otro lado es el fruto donde el patógeno puede ingresar durante cualquier momento de su desarrollo (Figura 4A) (SENASICA, 2019).

Agrobacterium tumefaciens, es la bacteria a la que se le atribuye la agalla de la corona, afecta diversos cultivos, entre ellos la vid, producen una excesiva multiplicación de las células de las plantas disminuyendo su vigor hasta llegar al decaimiento de la planta (Figura 4C) (Coca-Morante, 2009).

Xillela fastidiosa es quien causa la enfermedad de Pierce, se caracteriza por desarrollar clorosis en los márgenes de las hojas, las cuales se van secando concéntricamente con el paso del tiempo, hasta que cae la lámina de la hoja dejando el peciolo pegado al tallo (Figura 4D) (Guevara-Lugo, 2005).

El enrollamiento de la hoja es atribuida a, por lo menos, nueve diferentes virus pertenecientes a la familia Closteroviridae, los cuales producen un enrollamiento de las láminas hacia abajo, junto con racimos de uva más pequeños y con menos cantidad de azúcar, los cuales también duran menos tiempo antes de pudrirse (Figura 4E) (Monis, 2008).

Erysiphe necator, hongo patógeno causante del Oídio en diferentes cultivos, entre ellos la vid, disminuye los sólidos solubles totales, cambia el color y aumenta la acidez de las plantas infectadas, es resistente a climas secos y extremadamente lluviosos (Figura 4F) (Campbell *et al.*, 2007).

B. cinerea se considera de importancia económica por las pérdidas que genera, ya que es el agente causal de la podredumbre gris (Figura 4B). Tal enfermedad puede manifestarse según la planta y el órgano infectado; sin embargo, tiende a pudrir tejidos y producir un característico micelio gris. La prevención de la

enfermedad se dificulta por su capacidad de desarrollo, infección, dispersión y resistencia. Se reporta como agente de infección en más de 200 especies de plantas, entre ellas la vid (Koike *et al.*, 2016).

Myresiotis *et al.* (2007) mencionan plasticidad adaptativa en *B. cinerea*, el cual desarrolla resistencia a fungicidas químicos que se aplicaban para su tratamiento o prevención, por otro lado, la misma característica le permite desarrollarse en tejidos dañados, senescentes o muertos. Sus estrategias de dispersión son conidios, esporas asexuales, racimos de esporas y esclerocios, ésta última le permite soportar condiciones secas, calurosas o frías.

Las características que se han reportado, le permiten dispersarse por aire, salpicadura de agua, herramienta y suelo que haya tenido contacto con alguna planta previamente infectada (Figura 4B) (Holz *et al.*, 2007), por lo que el desarrollo de estudios para tratar y prevenir la podredumbre gris se ha impulsado en los últimos años.

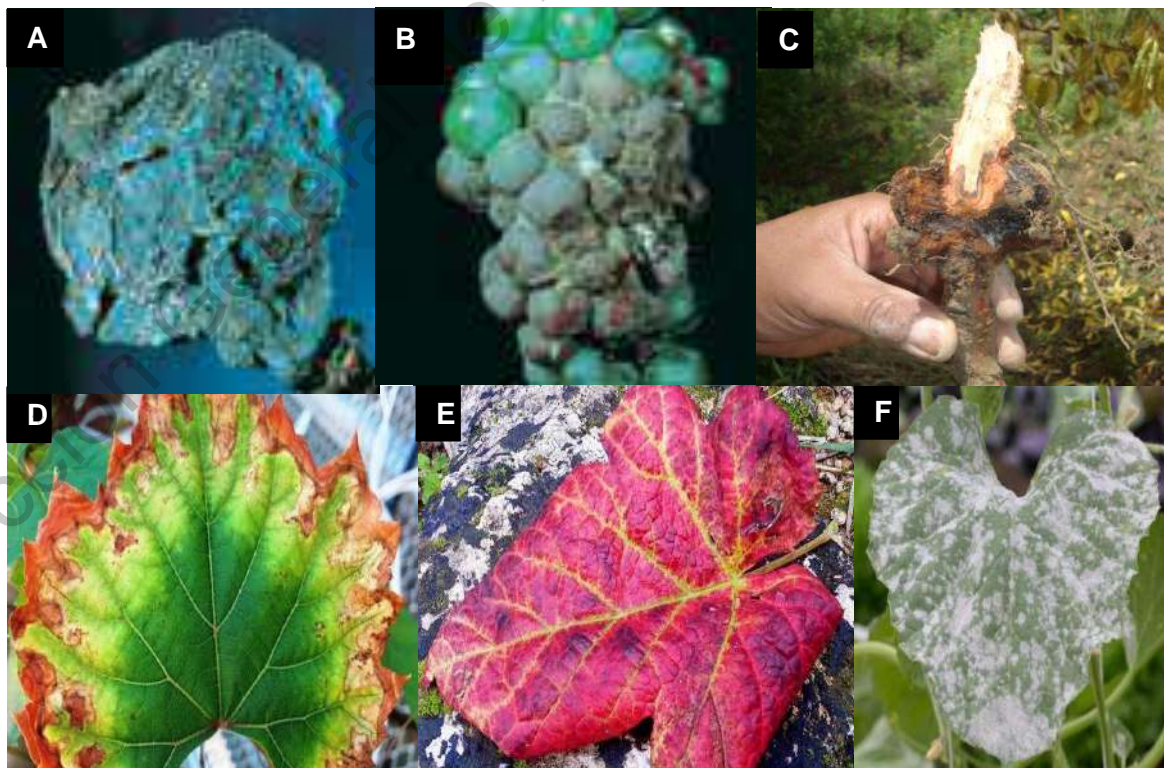


Figura 4. Ejemplos de enfermedades en vid: A) pudrición negra, B) Pudrición gris, C) Agalla de la corona, D) Enfermedad de Pierce, E) Enrollamiento de hoja y F) Oídio (Tomadas de SYNGENTA, 2011).

II.IV Biología de *B. cinerea*

El género *Botrytis* alberga más de 30 especies (Walker, 2016). De Miccolis-Angelini *et al.* (2016) señalan dos clados diferenciados, uno contiene cuatro especies patógenas exclusivas de eudicotiledóneas, mientras que el segundo alberga quince especies que afectan monocotiledóneas y tres patógenas de eudicotiledóneas.

Este patógeno tiene un estilo de vida necrotrófica, por lo que después de la infección y muerte de los tejidos, continua su ciclo reproductivo en los tejidos muertos (Koike *et al.*, 2016) tal comportamiento dificulta su control por lo que el registro de hospederos conocidos va en aumento, llegando a 596 géneros de plantas vasculares susceptibles (Figura 5A y 5B) (Elad *et al.*, 2016). Sanzani *et al.* (2012) señalan que su capacidad de mantenerse en latencia dificulta su detección, por lo tanto disminuye las oportunidades de prevención o mitigación de daños.



Figura 5. A) *B. cinerea* infectando un cotiledón de Lisianthus; B) *B. cinerea* creciendo en medio enriquecido con jugo de tomate (Tomado de Elad *et al.*, 2016).

II.V Reproducción y Dispersión

Como muchos hongos, *B. cinerea* cuenta con dos fases de reproducción, sexual y asexual (Figura 6). En su estadio asexual produce numerosos conidios (Figura 7A), tales estructuras son de vida corta por su baja resistencia a las condiciones ambientales; sin embargo, también pueden producir estructuras de mayor

resistencia, tal es el caso de los esclerocios (Figura 7B), los cuales son considerados como la estructura más importante en la supervivencia y dispersión del patógeno; bajo condiciones controladas se calcula una vida media de doce semanas viable (Blanco *et al.*, 2006; Holz *et al.*, 2007).

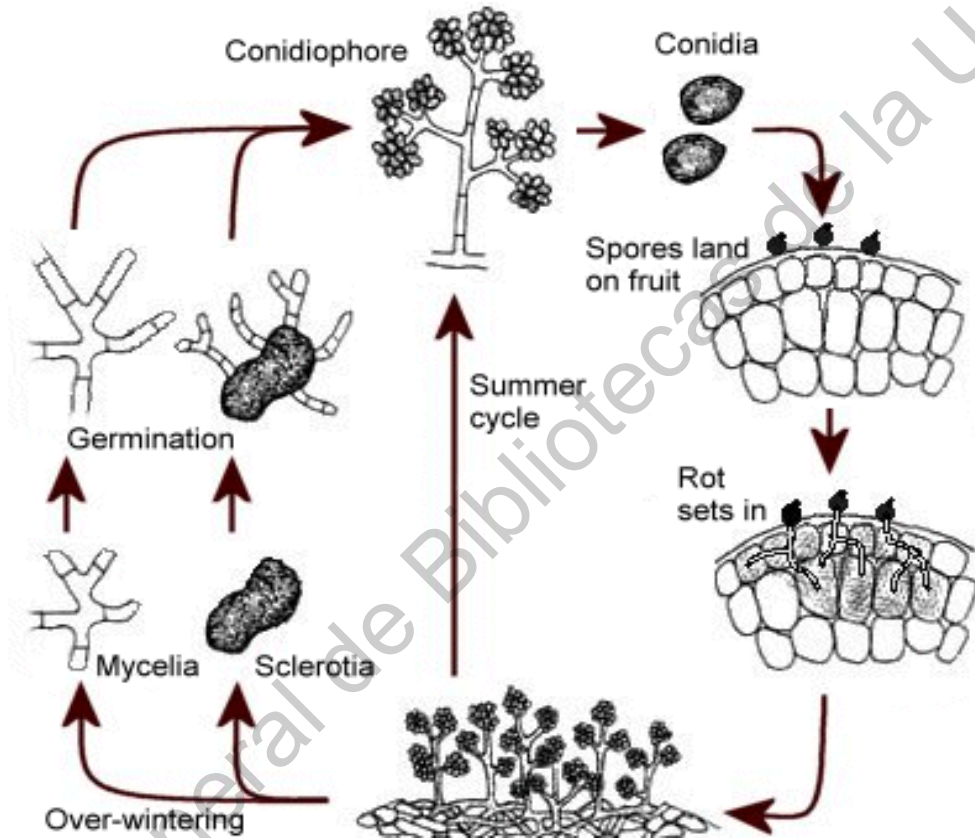


Figura 6. Diagrama del ciclo de vida de *B. cinerea* (Anónimo, 2018).

El estado teleomorfo de *B. cinerea* (Figura 8) es conocido como *Botryotinia fuckeliana*, su propagación es principalmente por viento (Dewey y Grant-Downton, 2015). Faretra y Antonacci (1987) y Faretra *et al.* (1988) reportaron protocolos para inducir la generación de apotecios de *B. cinerea* en condiciones de laboratorio (Citado en Beaver y Weeds, 2007), la poca información que se tiene sobre esta especie puede ser al no considerarle de importancia económica por la baja incidencia y casi nulos daños en cultivos de interés alimenticio.

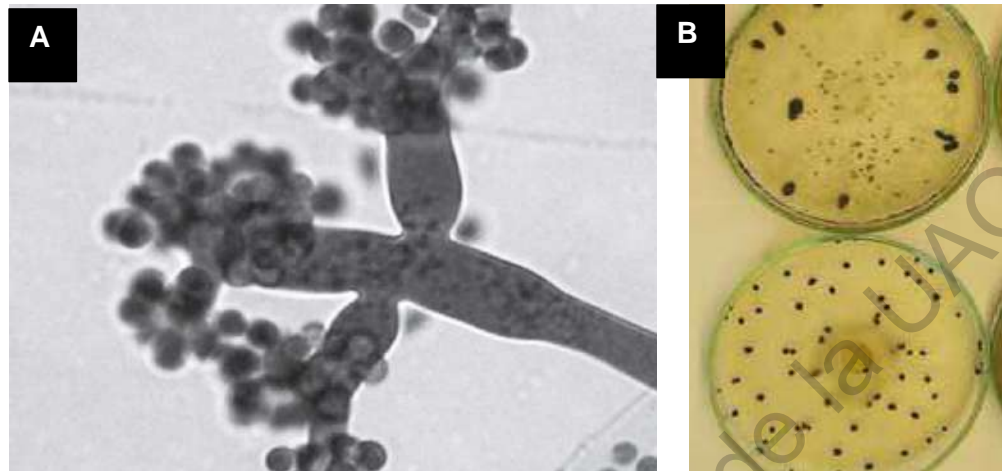


Figura 7. Estructuras de resistencia desarrolladas por *Botrytis* según las condiciones, A) conidióforos y B) esclerocios formados en placas petri (Tomado de Brankica *et al.*, 2014).



Figura 8. Cuerpo fructífero de *Botrytis*, llamado *Botrytinia fuckeliana* (Tomado de Beaver y Weeds, 2007).

Holz *et al.* (2007) señalan a los ciclos de vida de *B. cinerea* intrínsecamente relacionados con la fenología de las plantas hospedadas. La latencia del hongo, así como las estructuras que genera para resistir las condiciones climáticas, juegan un rol importante en los ciclos de la enfermedad (Miclea *et al.*, 2015) ya que cada parte del hongo, en cualquiera de sus ciclos, puede fungir como inóculo para dispersarse (Beaver y Weeds, 2007; Elad *et al.*, 2016).

La temperatura promedio para la proliferación de *B. cinerea*, a través de conidios y micelio, es de 20 °C. La edad de la planta influye en el desarrollo de la sintomatología producida por el patógeno además de las condiciones de humedad y temperatura, las cuales se consideran los factores más importantes para el desarrollo completo del ciclo de infección (Ciliberti *et al.*, 2015; Biratu, 2017).

La inversión para prevenir la enfermedad en nuestro país asciende a \$36,539 pesos por hectárea, esto con el uso de químicos y fungicidas comerciales, sin dejar las actividades básicas necesarias en el mantenimiento de los cultivos. El uso de dichos productos resta valor a la cosecha por la creciente popularidad de los llamados cultivos orgánicos por lo que en los últimos años se han registrado 80 centavos de utilidad por cada peso invertido en cultivos de uva (Borja-Bravo *et al.*, 2016), señalando la importancia del desarrollo de alternativas sustentables para dicho problema, haciendo los cultivos más rentables y competitivos en el mercado nacional e internacional.

II.VII Métodos de detección

Para la selección del método de prevención o tratamiento es necesario una correcta identificación del agente causal de la enfermedad. Convencionalmente se hace uso de claves dicotómicas, en las que por las estructuras morfológicas se identifica al organismo, por ejemplo el tamaño de conidios, apariencia de la colonia, color y forma de micelio, entre otras (Khazaeli *et al.*, 2010), por el desarrollo tecnológico se han aplicado nuevas técnicas en la identificación y detección del patógeno en los cultivos que son susceptibles, tales como autofluorescencia, métodos inmunológicos y PCR, entre otras (Dewey y Meyer, 2004; Staats, 2004; Belanger *et al.*, 2011; Brankica *et al.*, 2014).

La autofluorescencia implica una aplicación de luz con una onda conocida, la cual es reflejada con cierta longitud si la planta se encuentra sana o bien se encuentra enferma (Belanger *et al.*, 2011).

Los métodos inmunológicos consisten en la aplicación de anticuerpos monoclonales que se unen a regiones específicas de las proteínas o moléculas de las estructuras de *Botrytis* las cuales son observables mediante tinciones, reflexión de luz o con un microscopio óptico (Dewey y Meyer, 2004).

El PCR se hace mediante la amplificación de regiones conservadas del ADN de *Botrytis*, las cuales al correrse por una placa de gel y ubicar su presencia por el peso molecular se da como positiva o negativa su presencia (Staats, 2004).

II.VIII Tratamientos convencionales y nuevas alternativas de manejo

Sepúlveda (2017) hace hincapié en ubicar cultivos potencialmente susceptibles a alguna enfermedad, principalmente cuando se cubren las condiciones en el entorno que benefician al patógeno; tales necesidades a considerar incluyen la presencia de un hospedero, ambiente y el patógeno. Tales puntos permiten tomar acciones antes de tener un problema mayor.

De manera convencional se han usado fungicidas sintéticos (Cuadro 2) que intervienen en el desarrollo de *B. cinerea*; estos químicos se pueden clasificar en los que afectan la respiración del hongo, los que dañan la función de los microtúbulos, la osmorregulación o intervienen en la biosíntesis de algunos metabolitos esenciales para el hongo (Romanazzi y Feliziani, 2014).

El uso de químicos, aunado a los rápidos ciclos de vida de los microorganismos, provoca que se presenten casos de resistencia a estos compuestos, tales como a la Anilino pirimidina, Benzimidazol, Boscalide, Dicarboximida, Fenhexamida, Fenilpirrol y Hidroxianilida entre otros (Myresiotis *et al.*, 2007; Fillinger *et al.*, 2008; De Miccolis-Angelini *et al.*, 2010) dificultando los tratamientos cuando la enfermedad está presente.

La aparición de resistencias a los químicos originó la creación de asociaciones, quienes monitorean la eficiencia de los fungicidas para prolongar su uso en el mercado; tal es el caso de FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*),

NAFRAC (*North American Fungicide Resistance Action Committee*), FRAG UK (*Fungicide Resistance Action Group in United Kingdom*), FRAG NL (*Fungicide Resistance Action Group in Netherlands*), FRAC Brasil (*Fungicide Resistance Action Committee in Brazil*) y CropLife Australia, entre otras, quienes se encargan de monitorear problemas que se involucren el uso de químicos en la producción de alimentos, reúne información y la distribuye entre los que hacen uso de los químicos, brindan consejos e instrucciones para reducir la aparición de resistencia a dichos productos, se encargan de nombrar y clasificarlos con ayuda de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) considerando los mecanismos de acción del producto (FRAC, 2017; FRAC, 2019) además de evaluar sus riesgos y daños al ambiental o al humano.

El uso de los fungicidas se popularizó por aumentar la producción de alimentos (Romanazzi *et al.*, 2016) ya que disminuían considerablemente los daños o pérdidas por enfermedades o insectos, haciendo posible que se cubriera la creciente demanda a finales del siglo anterior. Años después del uso indiscriminado de químicos, fueron asociados con problemas en la salud humana y afectaciones al ambiente, principalmente por residuos que continuaban activos después de su aplicación. Por tales situaciones fueron regulados en cuanto a su comercialización y aplicación, además comenzó la búsqueda de alternativas sustentables para combatir enfermedades en cultivos.

Janisiewicz y Korsten (2002) reconocen la importancia de mantener fresco el producto desde su cosecha hasta su venta, el uso de químicos hizo posible preservar fresco el fruto postcosecha, al regular tales productos se fomentó el desarrollo de nuevas estrategias para evitar su uso de manera pre y pos-cosecha, además sin dejar de cubrir la demanda de productos.

Cuadro 2. Principales fungicidas químicos empleados en prevenir o combatir la pudrición gris (Tomado de Romanazzi y Feliziani 2014).

Ingrediente activo (%)	Nombre comercial	Compañía	Grupo químico	Código FRAC
Boscalid (70)	Cantus	Basf	Pirimidinas-carboximidias	7
Cyprodinil (37.5)+	Switch	Syngenta	Anilinopyrimidines+ phenylpyrroles	9 + 12
Fluodioxinil (25)				
Cyprodini (75)	Vanguard	Syngenta ArystaLife	Anilinopyrimidines	9
Fenexamid (50)	Elevate / Teldor	Science/ Bayer Crop Science	Hydroaxynilides	17
Fenpyrazamine (50)	Prolectus	Sumito Chemical Company	Aminopyrazolinone	17
Fluazinam (40)	Omega	Syngenta	2, 6- Dinitroanilines	29
Fluodioxonil (20.4)	Scholar	Syngenta	Phenylpyrroles	12
Fluodioxonil (50)	Geoxe	Syngenta	Phenylpyrroles	12
Fluopyram (50)	Luna Privilege	Bayer Crop Science	Pyridinyl-ethylbenzamides	7
Iprodione	Rovral	Basf	Dicarboximides	2
Pyraclostrobin (6.7) + Boscalid (26.7)	Signum	Basf	Qolfungicidas + Pyridinecarboxamides	7 + 11
Pyrimethanil (54.6)	Scala	Bayer Crop Science	Anilinopyrimidines	9

La producción de alimentos sin el uso de químicos podría verse comprometida, la relación producción y uso de químicos se ha reconocido (Romanazzi *et al.*, 2016), sin embargo por las consecuencias asociadas se han explorado alternativas, por

ejemplo Castillo-Reyes *et al.* (2018) señalan a los fungicidas con base en extractos de metabolitos secundarios de plantas como una alternativa sustentable que se ha explorado en las últimas décadas (Cuadro 3), la eficiencia de estos productos se ha probado *in vitro* y en cultivos. Por ejemplo, contra *B. cinerea*, donde se interrumpe la germinación de conidios, el crecimiento micelial, la esporulación y disminuye la incidencia de la enfermedad en cultivos (Vargas-Díaz *et al.*, 2014; Boiteux *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Principales fungicidas con base en extractos de plantas comercializados en México (Basado en reportes por Castillo-Reyes *et al.*, 2018).

Producto	Ingrediente Activo	Plaga	Empresa	Registro COFEPRIS
Agrilife	Ácido ascórbico y ácido cítrico	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> , <i>Pythium debaryanum</i> , <i>B. cinerea</i>	Ingenieria Industrial SA de CV	RSCO-MEZC-1393-301-375-002
Fubagro	Extracto de <i>Larrea tridentata</i> , de <i>Pinus pinaster</i> , de <i>Citrus limonum</i> (L.) Burm y <i>Citrus aurantium</i>	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> , <i>B. cinerea</i>	Ecoprotecto SA de CV	RSCO-MEZC-1302A-301-096-047
Fractal	Extracto de cítrico (<i>Citrus x aurantium</i> L.)	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>B. cinerea</i>	Berni Labs, S de R L (MI)	RSCO-MEZC-1301L-0417-013-10
Sedric 4x	Extracto de <i>Yucca schidigera</i> Ortgies	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Alternaria brassicae</i>	Biocampo SA de CV	RSCO-FUNG-0106Y-0145-2.16

El biocontrol comenzó como alternativa al uso de químicos ya que se busca mitigar el daño a plantas y al ambiente al aplicar organismos vivos que actúen de forma antagónica con el patógeno (Nicot *et al.*, 2016); por otro lado, Fravel (2005) remarca la importancia de los estudios previos para el uso de biocontrol y así afectar lo menos posible las interacciones ecológicas que ya se encontraban en el entorno.

El desarrollo de productos comerciables para biocontrol dio comienzo, por lo que se han descrito nueve pasos generales (Figura 9) para el desarrollo de un producto para biocontrol, los cuales muestran el tiempo mínimo requerido por las pruebas necesarias; por otro lado, hacen mención de los ensayos para disminuir los riesgos ecológicos (Köhl *et al.*, 2011). Se consideran puntos generales ya que pueden adaptarse, además de seleccionar el mecanismo de acción según la problemática.

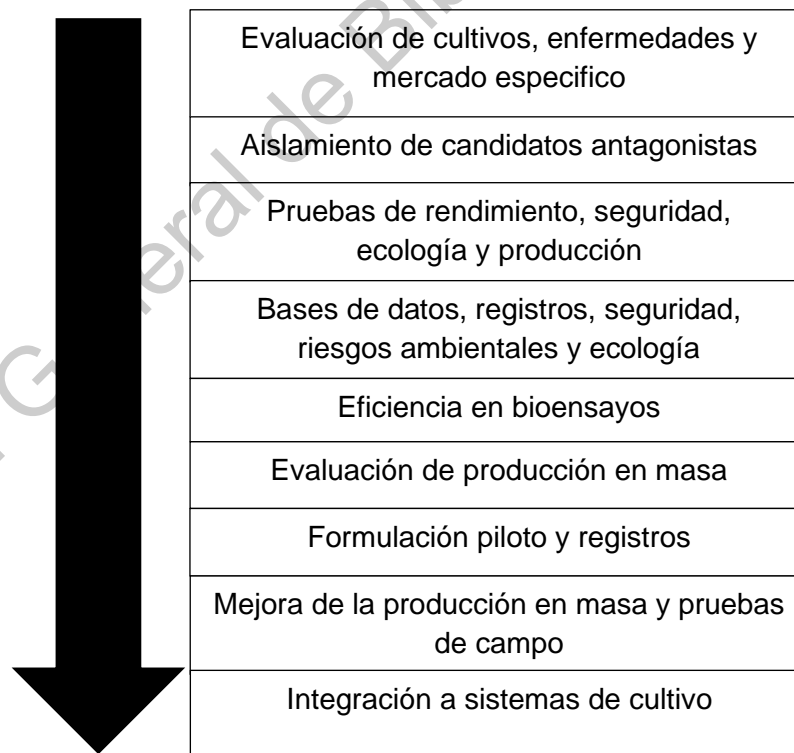


Figura 9. Pasos a cubrir durante el desarrollo de un agente de biocontrol para su futura comercialización (Basado en Köhl *et al.*, 2011).

El biocontrol se clasifica según el mecanismo de acción sobre el patógeno que se desee controlar, dichas clasificaciones son competencia, antibiosis, parasitismo, inducir resistencia en el hospedero y producción de metabolitos secundarios (Jamalizadeh *et al.*, 2011).

La competencia, ya sea, por nutrientes o espacio es un mecanismo de biocontrol asociado principalmente a levaduras, en el cual ambos organismos utilizan los mismos recursos y compiten; sin embargo, el agente de biocontrol debe verse beneficiado en velocidad respecto al patógeno (Spadaro y Gullino, 2004; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

Al mecanismo denominado antibiosis se le considera como la inhibición de microorganismos dañinos por sustancias que produce el agente de biocontrol, de manera tal que es imposible encontrar a uno si el otro se encontraba previamente en el producto (Melin *et al.*, 2007; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

El parasitismo se considera cuando el antagonista se alimenta del patógeno o lo usa para su beneficio, dejando a las plantas poco expuestas al daño potencial del patógeno (Bonaterra *et al.*, 2003; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

La inducción de resistencia se da cuando la planta aprovecha algunas sustancias producidas por microorganismos, nutriéndose de ellas fortaleciendo al hospedero y haciendo más difícil la entrada de algún organismo extraño o su establecimiento (Castoria *et al.*, 2001; Jamalizadeh *et al.*, 2011).

Los compuestos volátiles son aquellos con un bajo peso molecular y baja solubilidad en agua, por lo que se pueden volatilizar y llegar a varios puntos en lugares de almacenamiento cerrados, dichos compuestos usualmente interrumpen el ciclo de vida del patógeno de interés (Jamalizadeh *et al.*, 2011).

II.IX Biocontrol de *B. cinerea*

Para hacer uso de algunos organismos para control biológico se toman algunos puntos a considerar, principalmente en patógenos que se reportan en diferentes

puntos del mundo, tal es el caso de *B. cinerea*. Por ejemplo, hacer uso de antagonistas encontrados de manera natural o de antagonistas artificialmente introducidos, o bien, si la aplicación es pre o post cosecha, entre otras. Los ensayos según las necesidades y características del cultivo según el entorno, hace que se desarrolle una estrategia de control más eficiente y específica aunque sea el mismo patógeno (Sharma *et al.*, 2009).

Se han registrado diversos géneros de bacterias con actividad antagonica sobre *B. cinerea*, por ejemplo *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xenorhabdus*, entre otras, tanto *in vivo* como *in vitro* (Haidar *et al.*, 2016; Flores-Ruiz *et al.*, 2015).

Se han encontrado diferentes mecanismos de biocontrol sobre *B. cinerea*, por ejemplo *Paenibacillus elgii* quien inhibe el desarrollo de *B. cinerea* interrumpiendo la actividad de la enzima quitinasa; por otro lado, *Bacillus amyloliquefaciens*, se ha descrito como un microorganismo endófito que promueve el desarrollo vegetal, disminuyendo daños por *B. cinerea* y *Calonectria gracilis* (Paz *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

Bacillus es uno de los géneros de bacterias más estudiados en la línea de biocontrol, esto debido a sus características biológicas, tales como su desarrollo aerobio, su forma bacilar y su capacidad de formar endospora, la cual le permite vivir en condiciones de calor extremas, desecación y a diferentes pH, entre otras características, además se considera habitante común en cultivos (Calvo y Zúñiga, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Shafi *et al.* (2017) señalan algunas formas de acción de especies pertenecientes al género *Bacillus*, donde algunos pueden producir lipopéptidos y/o antibióticos, y hormonas que promueven el desarrollo vegetal, generan resistencia de las plantas contra algunos organismos patógenos y/o producen enzimas que degradan las paredes celulares de los hongos, tales como la quitinasa o β -1,3-glucanasa.

Por otro lado, Parafati *et al.* (2015) señalan algunos géneros de levaduras y hongos que también han mostrado actividad antagonista, entre ellas destacan los géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces* y *Wickerhamomyces* entre otras. Por ejemplo, *Candida pyralidae* y *Pichia kluyveri* han mostrado actividad inhibitoria sobre *B. cinerea*; de igual manera, *Metschnikowia pulcherrima* se asocia directamente con la disponibilidad de hierro, donde la levadura se ve beneficiada además de producir compuestos que inhiben la germinación de conidios y el crecimiento del micelio del patógeno, por la aplicación pre cosecha de *Metschnikowia* se han registrado bajas en la pérdida de frutos postcosecha (Karabulut *et al.*, 2003; Mewa-Ngongang *et al.*, 2018), tal diversidad de mecanismos muestra potencial uso como agentes de biocontrol no específicos.

El uso de químicos en cultivos fue una solución rápida a la creciente demanda de alimentos por la población; sin embargo, se reconocieron daños ocasionados por tales químicos al humano y a nuestro entorno, el control biológico se ha impulsado como parte de las estrategias para cubrir la demanda del mercado y evitar perjudicar la salud del humano y su entorno.

III. HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* (P24), *Bacillus methylotrophicus* (FR4B12), aisladas de huertos de manzano, y la levadura *Metschnikowia pulcherrima* (NB9), obtenida de mostos de fermentación, inhiben el crecimiento *in vitro* del hongo patógeno *Botrytis cinerea*, de igual manera disminuye daño en frutos de uva comercial y en hojas de dos variedades de plantas de vid (Cabernet Sauvignon y Syrah), causado por *Botrytis cinerea*.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

IV. OBJETIVOS

IV.I General

Evaluar la capacidad antagónica de las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* (P24), *Bacillus methylotrophicus* (FR4B12) y la levadura *Metschnikowia pulcherrima* (NB9) sobre el hongo parásito *Botrytis cinerea* en pruebas *in vitro*, en frutos de uva y en invernadero en las variedades de vid, Cabernet sauvignon y Syrah.

IV.II Específicos

1. Evaluar mediante ensayos *in vitro* de confrontación dual, la capacidad de los agentes de control biológico para inhibir el crecimiento radial de cepas de *B. cinerea*.
2. Determinar la actividad antagónica de P24, FR4B12 y NB9 respecto disminución de daño en frutos de uva comercial infectados con *B. cinerea*.
3. Evaluar el efecto de los agentes de biocontrol en la disminución de área foliar afectada, así como su eficiencia a partir de medidas de incidencia y severidad en dos variedades de plantas de uva (Cabernet sauvignon y Syrah) infectadas con *B. cinerea*.

V. METODOLOGÍA

V.I Material biológico

Las cepas de *B. cinerea* (B63, B134, B137, B145, B152 y B155) son aislados de distintos viñedos Queretanos, mientras que las cepas de los candidatos a antagonistas P24, FR4B12 y la levadura NB9 fueron aisladas de la filósfera del fruto de uva y manzana de diferentes cultivos del estado de Querétaro; tanto cepas del patógeno como de los antagonistas se secuenciaron genéticamente en trabajos previos, ambas colecciones se encuentran en el cepario del laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Las plantas de uva (*Vitis vinifera* L.) pertenecientes a las variedades de “Cabernet Sauvignon” y “Syrah” fueron obtenidas a través de su propagación mediante estacas, previamente trasplantadas a inicios del 2019 y se mantuvieron en el invernadero perteneciente al laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola.

V.II Ensayo *in vitro*: cultivos duales

Para la evaluación de potencial antagónico *in vitro* se usó la metodología descrita por Reinozo-Pozo *et al.* (2007) con algunas modificaciones; para ello se usaron placas con medio NYDA (8 g de caldo nutritivo, 2 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa y 20 g de agar), en las que se inoculó un círculo de micelio activo de 7 mm de diámetro de cada cepa de *B. cinerea* en su centro, dejándose crecer durante 48 h, pasado este tiempo, se inocularon los antagonistas a 1 cm del borde de la caja de manera lineal y equidistante entre ellos, dejándose crecer a temperatura ambiente (~ 25 °C) (Figura 10A).

Por cada cepa de *B. cinerea* se colocaron tres replicas con los tres antagonistas en cada placa (seis cepas con tres replicas cada una); de igual manera, por cada cepa de patógeno se colocaron tres placas control, únicamente con el hongo (seis placas control con tres replicas cada cepa) (Figura 10B). Los ensayos finalizaron hasta que los controles se extendieron por toda la caja, posteriormente se midió el

radio de los hongos con un Vernier digital Marca T&O Modelo 57-016-220 y el halo de inhibición en caso de presentarse (Figura 11A y 11B).

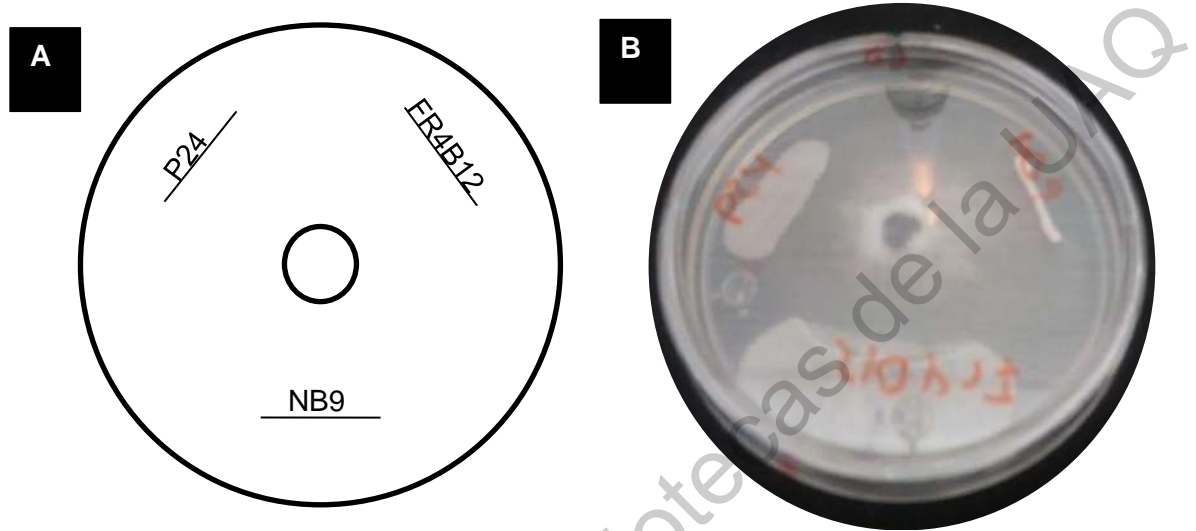


Figura 10. A) diseño de los cultivos duales, en el centro se inoculó *B. cinerea* y en líneas equidistantes se inocularon los candidatos a control biológico. B) placa evaluada durante el ensayo dual, se pueden ver los inoculos de patógeno y antagonistas al finalizar el ensayo.

El porcentaje de inhibición del hongo se calculó mediante la fórmula descrita por Chaiarn *et al.* (2009) de la siguiente manera:

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

Ecuación 1. Dónde *C* es el radio (cm) de la colonia control y *T* es el radio (cm) de la colonia tratada.

El manejo de los radios obtenidos se hizo conforme a Hernández-Gómez *et al.* (2016), los cuales se convirtieron en grados angulares para poder realizar un análisis de varianza para conocer el efecto del antagonista sobre la inhibición de cada cepa del patógeno, posteriormente para encontrar diferencias estadísticas entre tratamientos se aplicó una comparación de medias, con la prueba post-hoc de Tukey (95%), y se reportaron como porcentajes.

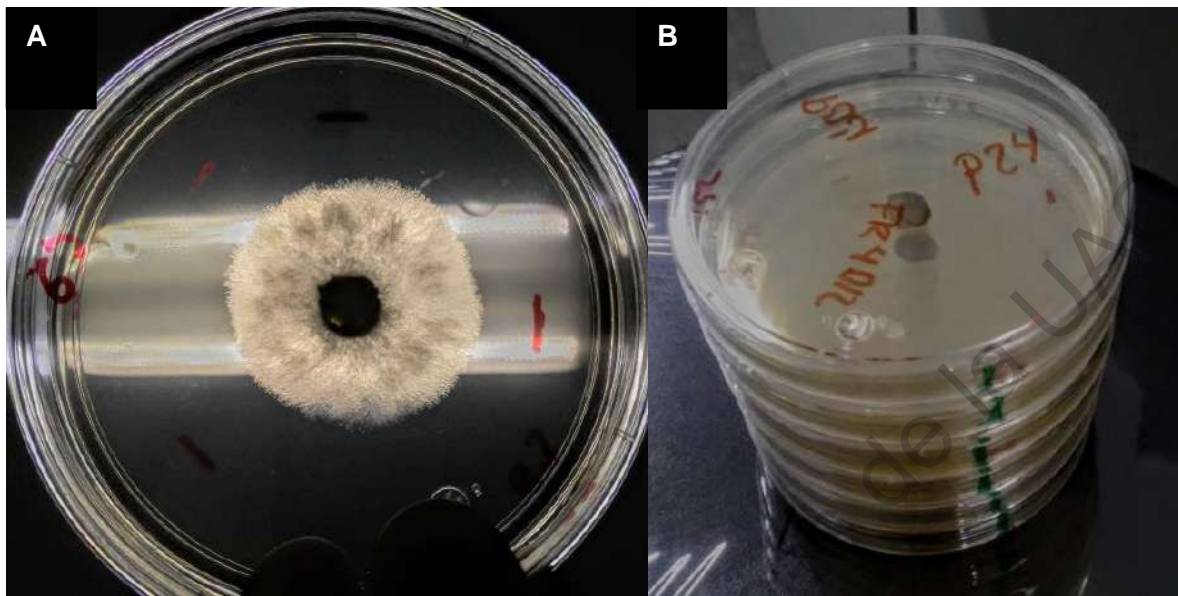


Figura 11. A) Placa petri que muestra el crecimiento de *B. cinerea*, donde fue realizado el ensayo dual previo a colocar los antagonistas y B) Grupo de réplicas en los ensayos duales, con los tres antagonistas, tres réplicas y tres placas control.

V.III Ensayo *in vivo*: frutos de vid

Las uvas empleadas fueron caracterizadas, para ello se midió su diámetro usando un Vernier digital; el contenido de sólidos solubles totales (SST) se obtuvo con el Pocket Refractometer PAL-1 Atago, para obtener su pH se emplearon dos uvas las cuales se licuaron en un mortero, al tener suficiente cantidad de líquido se colocó en una vaso de precipitado, y se usó un potenciómetro Hanna Edge Digital.

Cuadro 4. Características de morfología y de madurez de las uvas usadas en el ensayo.

Diámetro (mm)	Peso (gr)	SST (°Brix)	pH
20.42	8.5	21.7	3.9
23.49	7.4	20.8	4
22.41	9.0	22.1	3.98
22.40	7.8	20.7	
23.02	8.0	22.2	

Para los ensayos *in vivo* se usó la metodología descrita por Scuderi *et al.* (2009) parcialmente modificada. Las bacterias fueron cultivadas en 50 ml de Caldo nutritivo (CN) y la levadura en 50 ml de medio NYDB durante 18 h en agitación constante (180 rpm) y temperatura ambiente (~ 25 °C). Trascurrido este tiempo, se recolectaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 10 ml de tween 20 al 0.5%. Para su conteo, se empleó un hematocímetro y la concentración final de cada antagonista fue de 1×10^7 células/ml (Figura 12B) (citado en Parafati *et al.*, 2015).

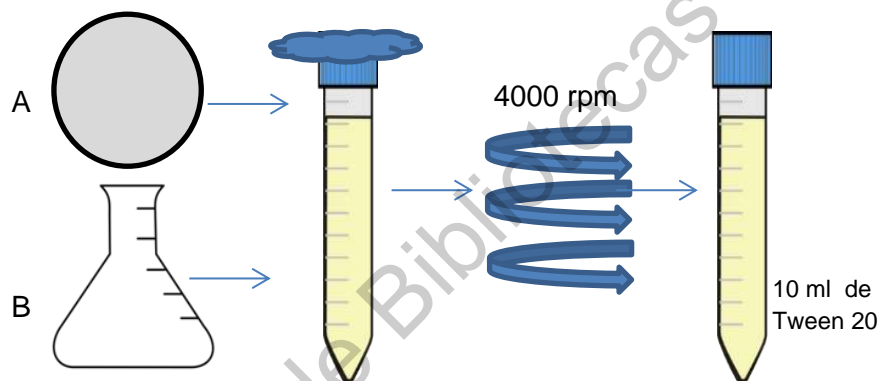


Figura 12. Esquema del proceso para la obtención de A) esporas del patógeno desde el raspado de placas con el patógeno, su filtrado y posterior recuperación del pellet al finalizar su centrifugación; B) obtención de células de los antagonistas desde medios líquidos, la cual se filtró en gasas para separar medio de las células, la alícuota fue centrifugada para recuperar el pellet con cada antagonista.

Para la obtención de esporas de la cepa del patógeno seleccionada (B134) se colocó tween 20 al 0.5% en cajas y de la superficie se obtuvieron las esporas con mediante un raspado, la mezcla se filtró con gasas estériles para separar el micelio. Se empleó un hematocímetro para contar las esporas, llevándose a una concentración final de 1×10^4 esporas/ml (Figura 12A).

Para inducir la infección con el patógeno en frutos se usó la metodología descrita por Parafati *et al.* (2015) con algunas modificaciones puntuales. Con ayuda de un sacabocado se hizo una herida a cada uva de 5 mm x 5 mm x 3 mm, donde se

colocaron 20 µl de agente de biocontrol (P24, FR4B12 y NB9), pasada una hora se aplicaron 20 µl del patógeno.

Se consideraron cinco tratamientos, tres de ellos fueron la interacción patógeno vs antagonista y los otros dos eran los tratamientos control, positivo y negativo. Cada tratamiento consto de cuatro cajas con tres divisiones, en cada división se colocaron dos uvas, siendo 24 uvas por tratamiento (para las interacciones patógeno y antagonista se emplearon 72 uvas, en los tratamientos control se emplearon 48 uvas; en total se usaron 120 uvas). Las uvas se dejaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente, transcurridos cinco días se tomaron mediciones de daño de cada uva con un Vernier digital, las cuales se midieron desde el punto de inoculación hasta una orilla, considerando los cuatro puntos cardinales (Figura 13A y 13B).

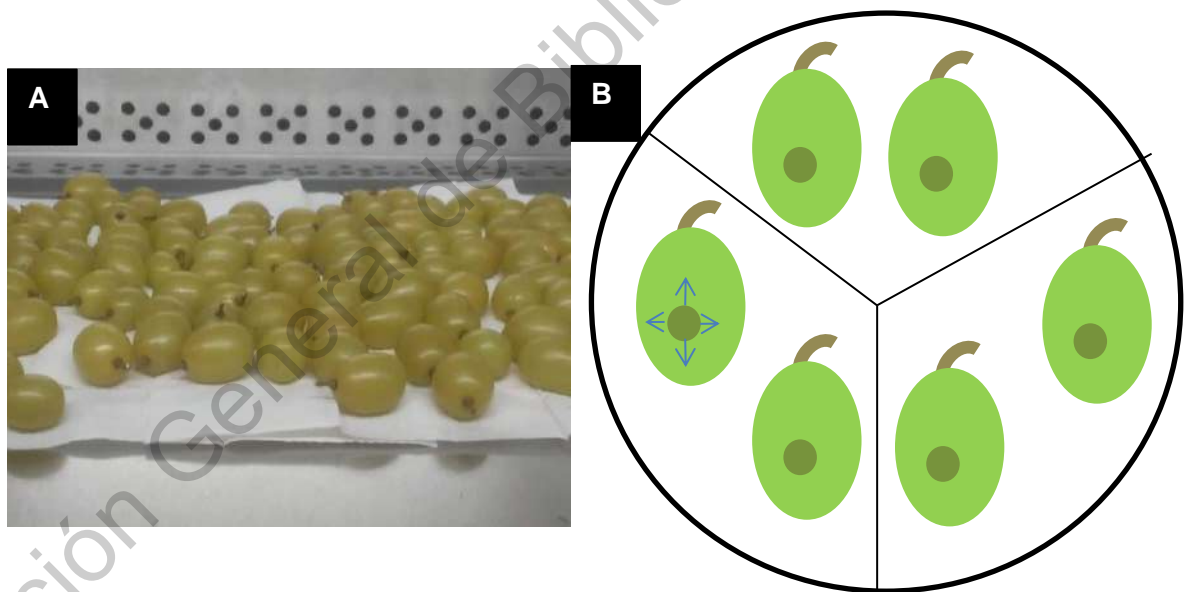


Figura 13. A) uvas estériles a usar en el ensayo. B) esquema de montaje para el ensayo en frutos y los cuatro puntos a medir desde las heridas (4 cajas x 6 uvas = 24 uvas por tratamiento)

El porcentaje de inhibición del hongo se calculó con la ecuación 1, descrita previamente. Para el análisis de inhibición, los porcentajes fueron convertidos a grados angulares, sobre los cuales se hizo un análisis de varianza para reconocer el efecto de antagonistas sobre el patógeno; posteriormente se aplicó una

comparación de medias usando la prueba post-hoc de Tukey (95%) para encontrar diferencias significativas entre tratamientos (Hernández-Gómez *et al.*, 2016).

V.III Ensayo *in vivo*: invernadero

El ensayo se realizó en el invernadero del laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, el cual inició el 4 de octubre de 2019.

Para inducir la infección de las plantas de vid se hizo según la metodología descrita por Molina-Mercader *et al.* (2006) con algunas adaptaciones. Se obtuvieron inóculos de las cepas FR4B12 y NB9 como antagonistas, seleccionados por los resultados previos; por otro lado, para el inóculo de *B. cinerea* se empleó una combinación de las seis cepas del hongo, por no encontrar antagonismo entre las mismas en un ensayo previo.

Para obtener las células de FR4B12 se dejaron crecer 24 h en 1.2 l de Caldo Nutritivo, por otro lado NB9 se inoculó en 1.2 l de NYDB, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos, al obtener las pastillas estas se re suspendieron y se contaron en una cámara de Neubauer hasta obtener la concentración 1×10^7 células/ml en ambos casos, las cuales fueron colocadas en agua destilada con 0.01% de carboximetilcelulosa como agente adherente.

Para la obtención de esporas del patógeno se usaron placas Petri con *B. cinerea* de 2 semanas de crecimiento previo, las cuales fueron raspadas con una asa estéril y se aplicó solución tween 20 al 0.5%, la mezcla se filtró con gasas estériles para separar el micelio y se hizo el conteo de las esporas ajustando a 1×10^4 esporas/ml.

Los grupos de interacción (hongo + FR4B12 y hongo + NB9), así como los grupos control positivo (Solo patógeno) y negativo (Sin patógeno y sin antagonista) se conformaron por seis plantas de la variedad "Cabernet Sauvignon" y seis de la

variedad “Syrah”; por otro lado, para descartar daño por uso de los agentes candidatos se consideraron tratamientos control para los antagonistas (Figura 14 y 15).

Tales inóculos se asperjaron de manera uniforme a cada planta en 40 ml de solución con los agentes y el patógeno, se dejó un intervalo de doce horas en la aplicación de los agentes de biocontrol y la aplicación del patógeno. La aplicación de cada inóculo se hizo con una Pistola eléctrica ergonómica Master Hardware SKU#123881 de manera uniforme en cada planta.

Durante el ensayo, se registró temperatura y humedad relativa diariamente a la misma hora usando un termómetro digital Steren Ter-140; el seguimiento de los registros se muestra a detalle en la Figura 16.

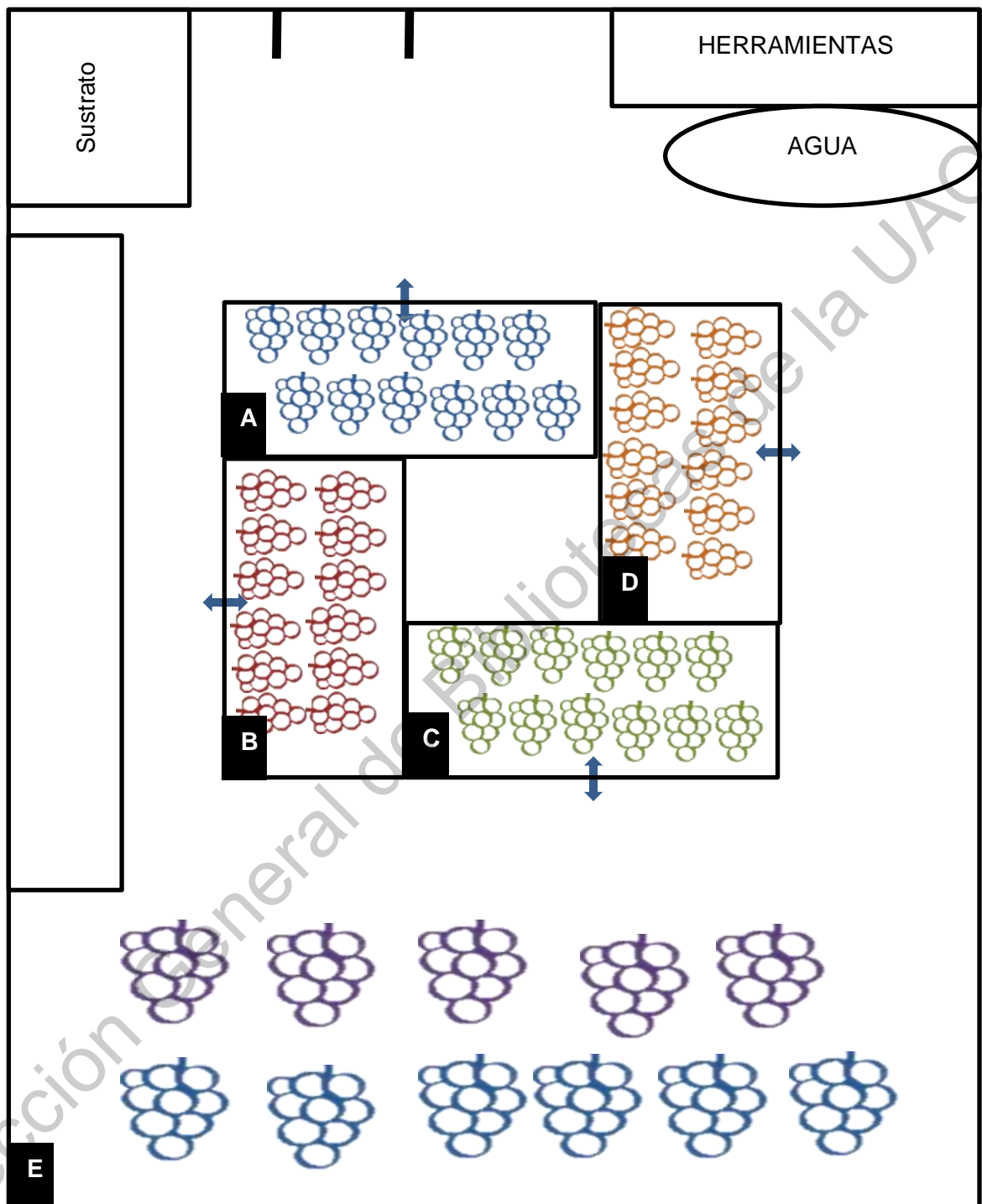


Figura 14. Esquema del invernadero y el acomodo que se dio para el ensayo en plantas. A) Control Negativo, B) Hongo + FR4B12, C) Control Positivo, D) Hongo + NB9, E) Grupos control de FR4B12 y NB9.

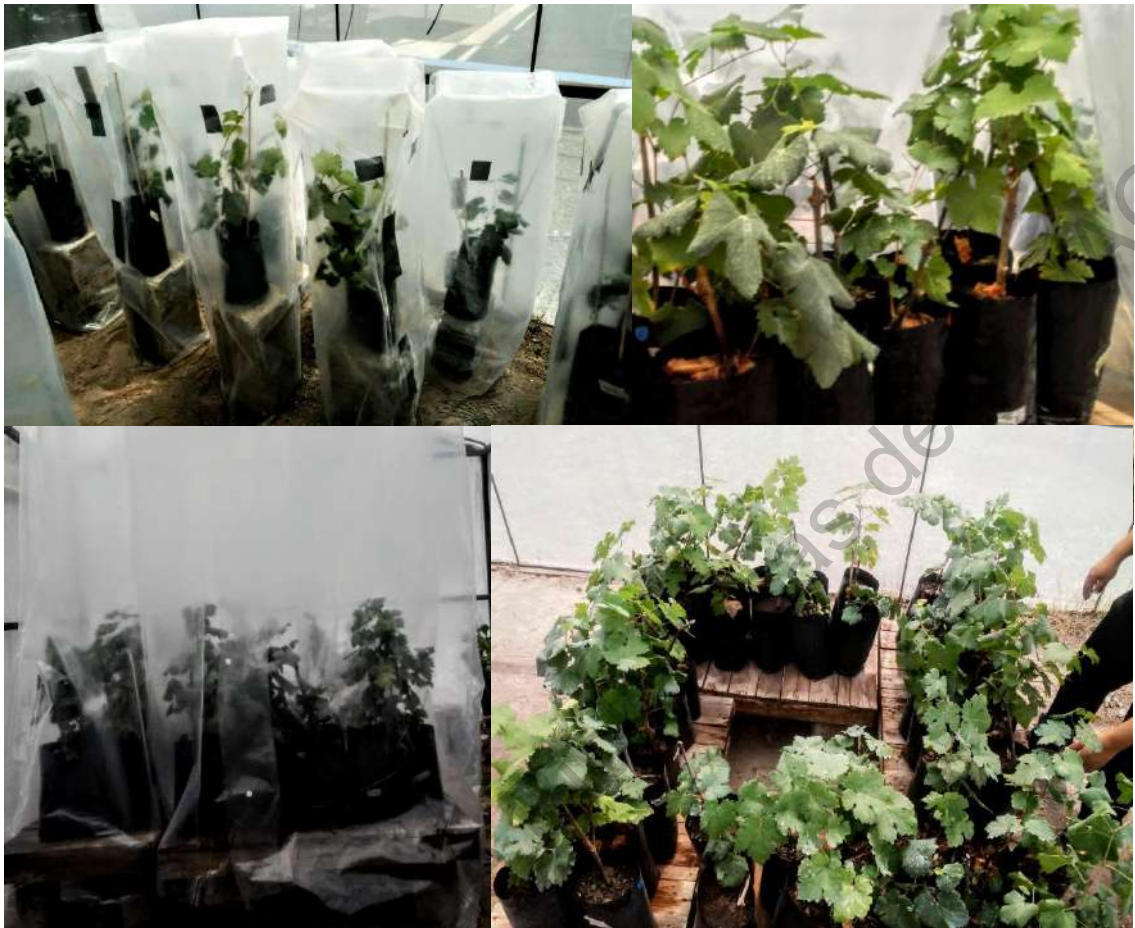


Figura 15. Montaje de la prueba en invernadero, cada tratamiento fue cubierto con plástico, cada entrada ubicada hacia un lado, la distribución de plantas fue al azar.

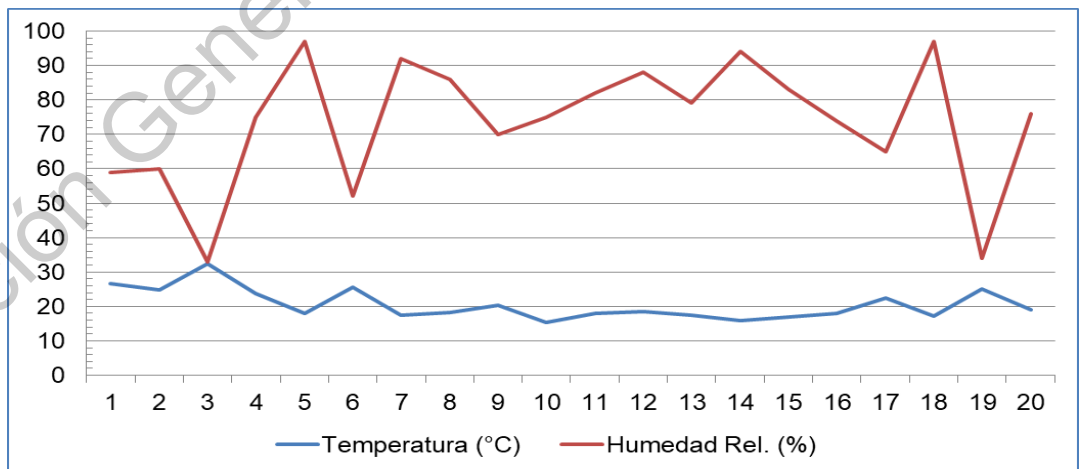


Figura 16. Registro de las condiciones, temperatura y humedad relativa, presentadas durante los días del ensayo.

V.IV Área Foliar Afectada

Para estimar el Área Foliar Afectada (AFA) se capturaron imágenes acorde a lo descrito por Rincón-Guerrero *et al.* (2012), con algunas adaptaciones. El registro fotográfico se realizó el 19 de octubre con una cámara digital SAMSUNG LENS WB35F; la captura se hizo de la parte media de las plantas para cada tratamiento, con ayuda de una base adherida a una regla se tomaron a 20 cm de distancia, se obtuvieron 221 fotografías totales (Figura 17).

Los comandos para calcular el área foliar sana y con daño, fueron los mencionados por Rincón-Guerrero *et al.* (2012) y Aday-Díaz *et al.* (2017) usando la versión ImageJ2; se tomó como escala un centímetro en la base, se obtuvo el área total y posteriormente las áreas con daño para obtener los valores de área sin daño.

Las áreas con daño a medir en las láminas foliares fueron puntos necróticos “achocolatados”, puntos con clorosis, puntos café oscuro, puntos necróticos alargados con apariencia de ser quemaduras y necrosis en el borde del limbo (González-Loza, 2004) (Figura 18).

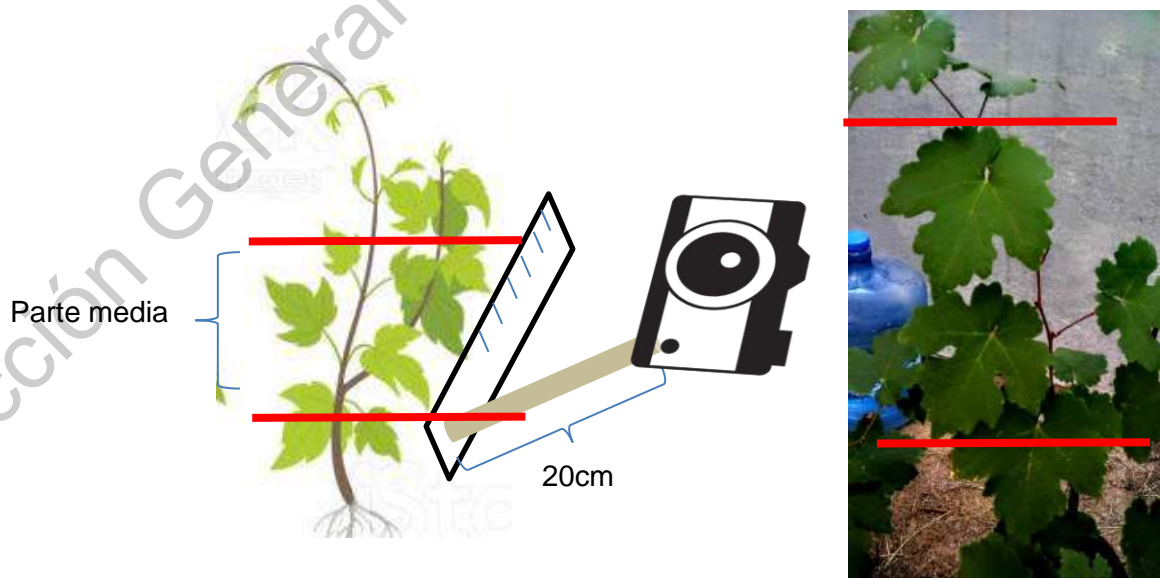


Figura 17. Esquema de la captura de imágenes en el ensayo en invernadero, para determinar daño en hojas.

Para el análisis de datos se usaron las áreas con daño y sin daño, por grupo (hongo+FR4B12, hongo+NB9, control positivo y control negativo) y variedad de uva (Cabernet sauvignon y Syrah); por la diferente cantidad de imágenes obtenidas por tratamiento se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés) con distribución de error quasibinomial y función de ligamiento logit (Díaz-Limón *et al.*, 2016).

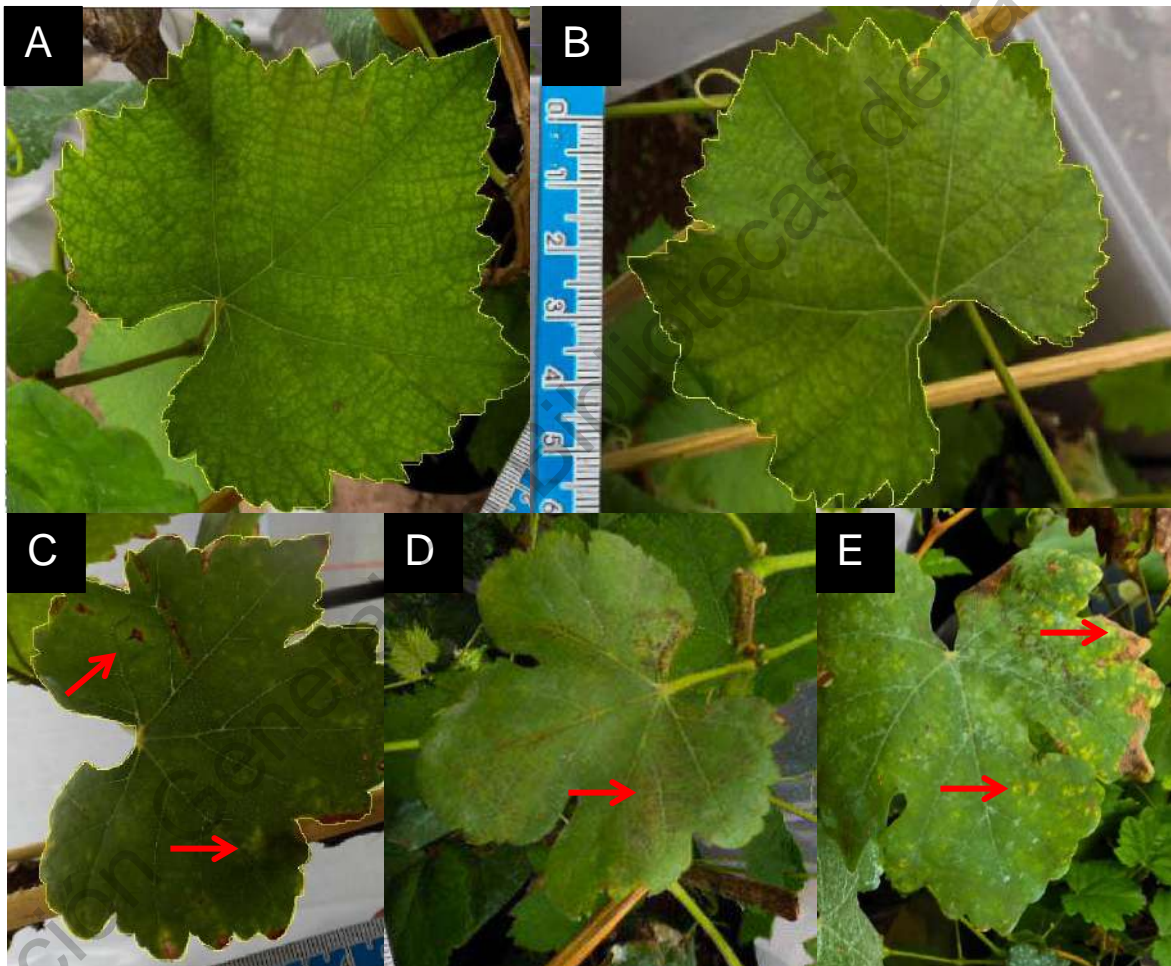


Figura 18. Imágenes capturadas para determinar daño en cada tratamiento, A y B) hojas sin daño aparente atribuido a *B. cinerea*, C) puntos necróticos “achocolatados” alargados y con clorosis, D) puntos café oscuro sobre la lámina foliar y E) hoja con puntos necróticos con apariencia de quemadura y con clorosis.

V.V Incidencia y Severidad de Daño

Para la evaluación en la disminución de la incidencia y el daño se usó la metodología descrita por Díaz-Limón *et al.* (2016) y Queijeiro-Bolaños *et al.* (2013) con algunas modificaciones; los cálculos se hicieron mediante la infección de hojas. La muestra total fue la cantidad de imágenes de hojas obtenidas (221), aquellas que no presentaban daño se consideraron como sanas, por otro lado las que presentaban área con daño se consideraron como infectadas; la incidencia se consideró como la cantidad de órganos que desarrollaron síntomas al aplicar de manera uniforme el patógeno el cual se comparó con el control positivo.

$$\text{Incidencia (\%)} = (HD/HT) * 100$$

Ecuación 2. Dónde, *HD* es el número de hojas con daño, por cada tratamiento, y *HT* es el número de hojas totales por cada tratamiento.

$$\text{Severidad (\%)} = (AD * 100) / AT$$

Ecuación 3. Dónde, *AD* es el área con daño (cm²) y *AT* es el área total (cm²) de las hojas para cada tratamiento.

Para el análisis de los datos se consideró a comparar *HD* y *AD* de cada tratamiento, se les aplicó un GLM con distribución de error quasibinomial y función de ligamiento logit para identificar los efectos entre variables y encontrar diferencias significativas entre tratamientos, se reportan porcentajes.

VI. RESULTADOS

VI.I Ensayo *in vitro*: Cultivos duales

Al finalizar el ensayo la cepa FR4B12 mostró 40.9% de inhibición en el crecimiento micelial de *B. cinerea*, respecto al grupo control; por otra parte la cepa de la levadura NB9 tuvo un control del 22.19% sobre el desarrollo del hongo. Entre tratamientos se encontraron diferencias (Figura 19).

Las cepas de *B. cinerea* probadas mostraron diferente resistencia a los antagonistas (Figura 20); con un 42.48% de inhibición en su crecimiento, la cepa B137 fue la más susceptible a los agentes probados; por otro lado B152 fue quien tuvo mayor resistencia en las pruebas, con un 16.77% de inhibición, no se encontraron diferencias significativas entre la capacidad inhibitoria de las cepas B137 y B63 (Figura 21) ($F=4.27$, $G.L.=20.44$ $P<0.05$).

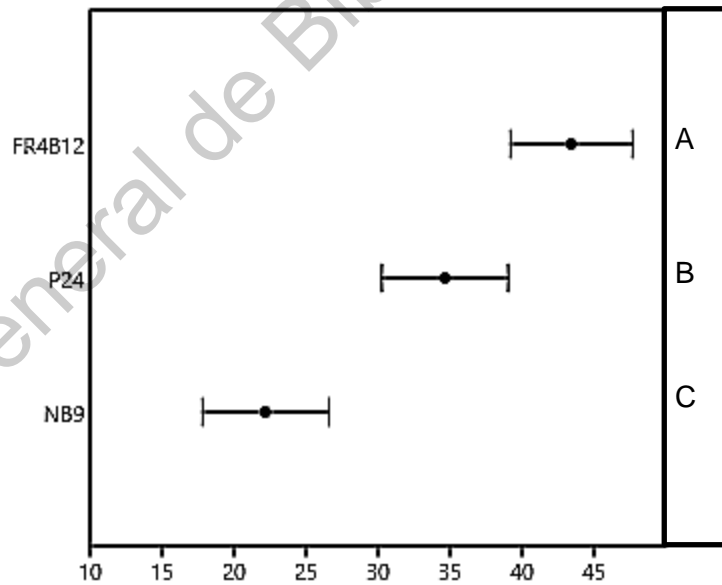


Figura 19. Eficiencia de los agentes de control biológico sobre seis cepas de *B. cinerea*, según el porcentaje de inhibición en las cepas. Pruebas de Medias de Tukey 95%, diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos ($P<0.05$).

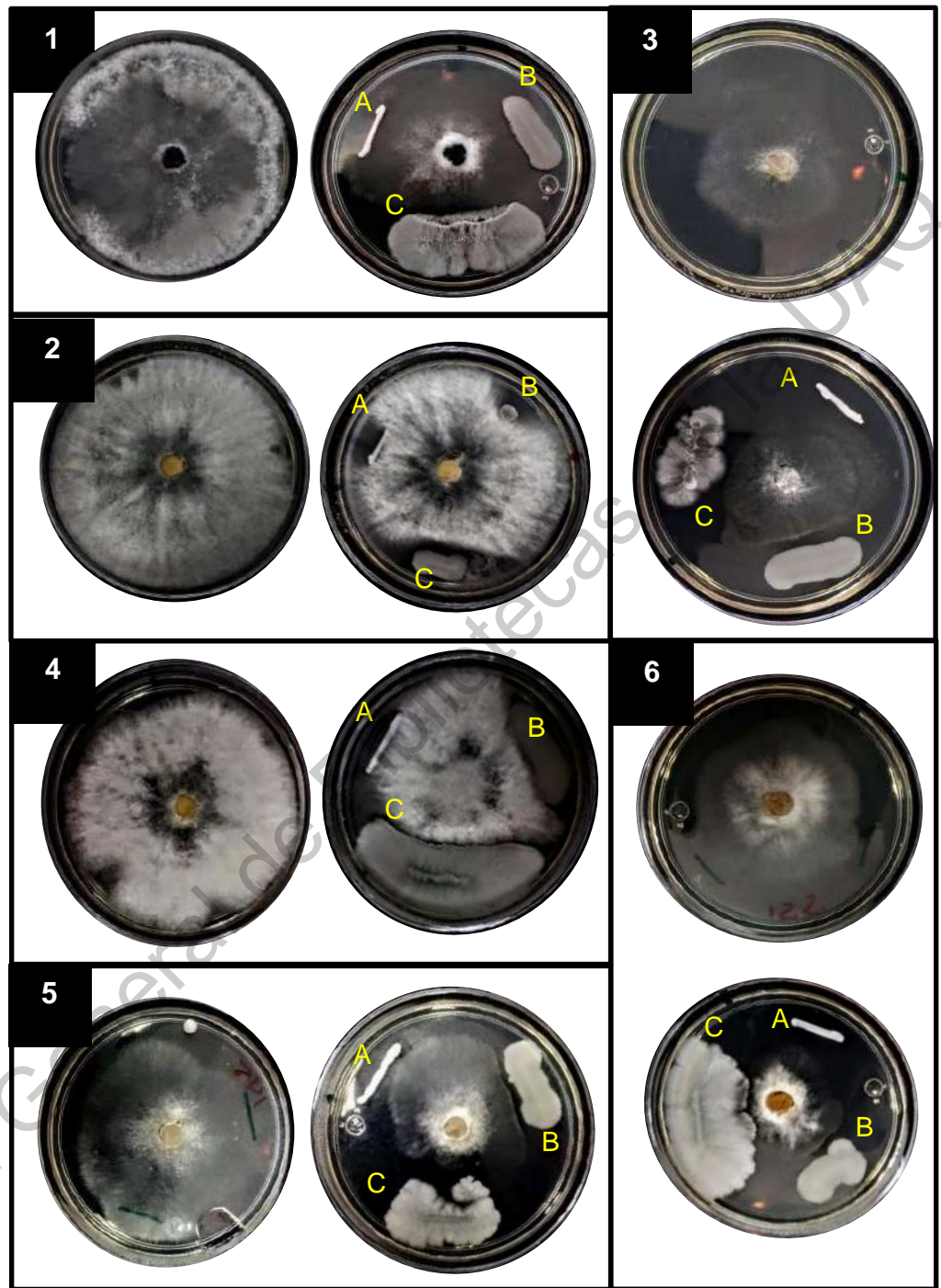


Figura 20. Cultivos duales de *B. cinerea* y antagonistas; Placa control de cepa 1) B63, 2) B134, 3) B152, 4) B137, 5) B145 y 6) B155; A- NB9, B- P24 y C-FR4B12.

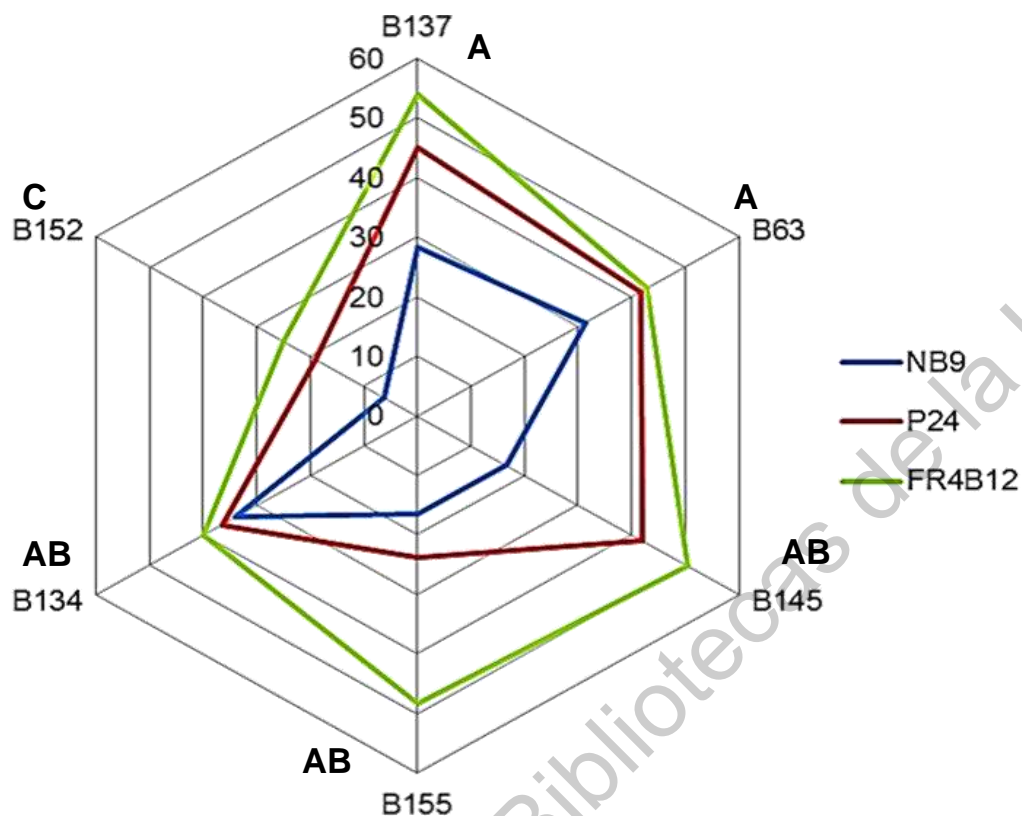


Figura 21. Porcentajes de inhibición de cada antagonista sobre cada cepa de *B. cinerea* evaluadas. Prueba de medias de Tukey (95%), donde letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

VI.II Ensayo *in vivo*: Frutos de vid

Para las pruebas *in vivo* en fruto se seleccionó la cepa B137 para infectar los frutos (Figura 22), debido a su comportamiento en las pruebas *in vitro*, donde mostró baja susceptibilidad pero lo suficiente para que su control sea cuantificable.

En el ensayo en frutos fue la cepa P24 quien mostró el mejor papel como agente de biocontrol con un 90.17% de inhibición, siendo muy similar a NB9 y ambas siendo significativamente diferentes a FR4B12 (Figura 23) ($F=5.57$, $G.L.=173.5$ $P<0.05$).

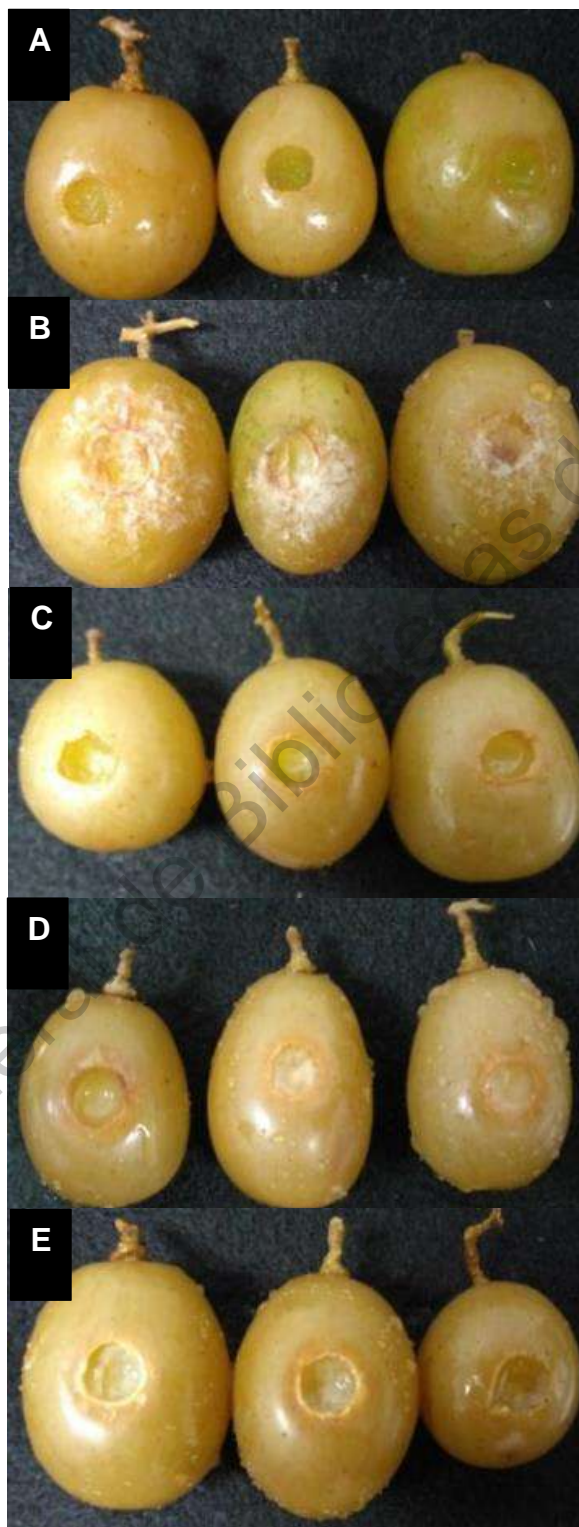


Figura 22. Uvas de la variedad Green seedless empleadas para el ensayo. A) Uvas sin *B. cinerea*, B) sólo con *B. cinerea*, interacción entre cepas de *B. cinerea* C) cepa B137 x P24, D) cepa B137 x FR4B12 y E) cepa B137 x NB9.

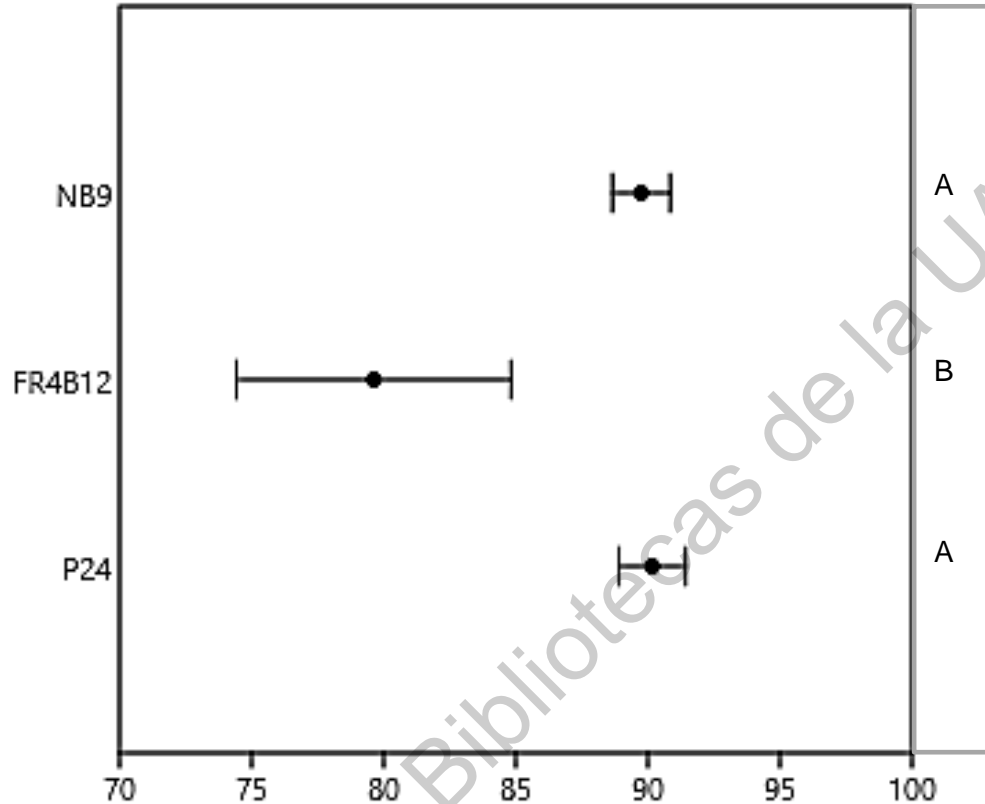


Figura 23. Actividad inhibitoria de cada candidato a antagonista en el ensayo en frutos. Prueba de medias de Tukey (95%), mismas letras indican no diferencias significativas entre los tratamientos.

VI.II Resultados de ensayo en vivero

En la evaluación del daño e incidencia en las plantas infectadas del ensayo en invernadero no se encontraron diferencias de susceptibilidad al daño entre las variedades de vid infectadas, caso contrario la comparación de tratamientos donde se encontraron diferencias (Cuadro 5).

El porcentaje de daño en tratamientos control de FR4B12 fue de 1.12%, por otro lado NB9 registró 2.06% de daño, por lo tanto, su aplicación no afecta las plantas de vid; en el apartado “Anexo” ejemplos de hojas sanas y con daño.

De los tratamientos infectados, la interacción hongo x FR4B12 mostró un área promedio total de 4.28 cm² con daño.

Por otro lado, el comportamiento de la infección en los diferentes tratamientos mostró diferencias significativas entre ensayos positivo y negativo, además entre las interacciones hongo x FR4B12 y hongo x NB9; mostrando la cepa FR4B12 mayor eficiencia obtenida en disminución de daño en hojas (Cuadro 6) (Figura 24).

Cuadro 5. Análisis de datos entre los factores, donde se muestra a los tratamientos como variable significativamente diferente marcada con ***.

	<i>DF</i>	<i>Deviance residuals</i>	<i>DF</i>	<i>Residuals</i>	<i>P</i>	
Variedad	1	2.99	46	357.34	0.391	
Tratamiento	3	201.24	43	156.101	1.08E-10	***

Cuadro 6. Comparación entre tratamientos, los valores significativamente diferentes están marcados con ***; comparación entre los niveles de tratamiento en la escala logarítmica ajustada con el método de tukey.

<i>Contrast</i>	<i>Estimate</i>	<i>SE</i>	<i>DF</i>	<i>z.ratio</i>	<i>P.value</i>	
H-FR4B12 - H-NB9	1.236	0.326	Inf	3.791	0.0009	***
H-FR4B12 – Negativo	-1.246	0.592	Inf	-2.104	0.1518	
H-FR4B12 – Positivo	1.102	0.328	Inf	3.362	0.0043	***
H-NB9 – Negativo	-2.482	0.553	Inf	-4.487	<.0001	***
H-NB9 – Positivo	-0.134	0.251	Inf	-0.535	0.9505	
Negativo – Positivo	2.348	0.554	Inf	4.236	0.0001	***

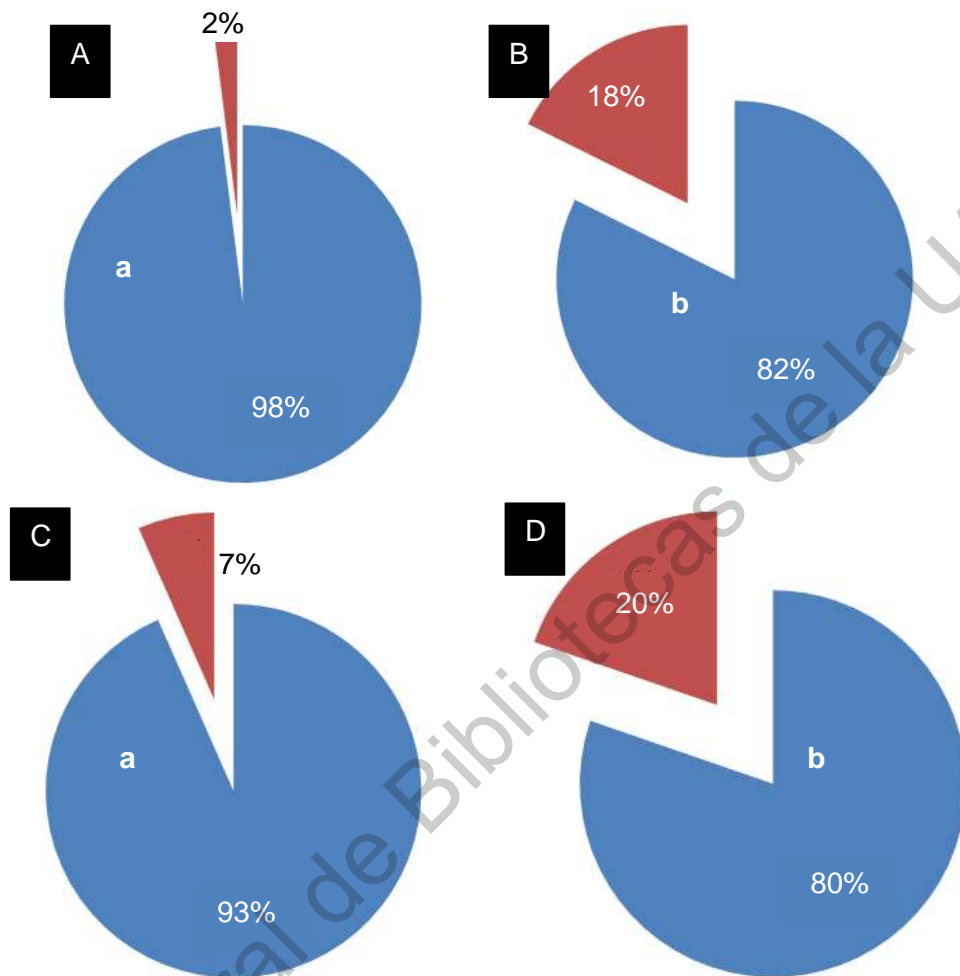


Figura 24. Porcentaje de área total foliar sana (azul) y con daño en cada tratamiento (vino); A) Grupo control negativo, B) Grupo control positivo, C) Plantas infectadas y tratadas con FR4B12 y D) Plantas infectadas y tratadas con NB9. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas encontradas entre grupos.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) sobre la incidencia del patógeno; al finalizar el ensayo, el tratamiento hongo x FR4B12 mostro 91.4% de incidencia de daño en hojas, en el caso del tratamiento hongo x NB9 el porcentaje fue 78.8%, por lo que solo el grupo control negativo reporta diferencias; por otro lado, la severidad disminuye en el tratamiento con FR4B12 (16.7%) a diferencia del tratamiento con NB9 (19.7%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Promedio de áreas con daño y sanas, porcentajes de incidencia y severidad para cada tratamiento en el ensayo de invernadero. Diferencias significativas señaladas con ***; comparación de tratamientos en escala logarítmica ajustada con tukey.

Tratamiento	Área (Cm)			Sano%	Daño%	Incidencia%	Severidad%
	Sana	Dañada	Total				
Negativo	54.32	1.12	55.44	97.98	2.02	43.9	2 ***
Positivo	53.15	11.40	64.56	82.34	17.66	84.3	17.7
H + FR4B12	60.79	4.29	65.08	93.41	6.59	91.4	16.7
H+ NB9	49.36	12.13	61.49	80.27	19.73	78.8	19.7

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

VII. DISCUSIÓN

VII.I Ensayos *In vitro*: cultivos duales

Para seleccionar organismos como agentes de biocontrol, se procura que sean aislados del entorno natural. El conocer las características biológicas, necesidades ambientales y mecanismos de acción de las cepas candidatas a antagonistas es importante para manejarlas y aplicarlas de manera eficiente.

Por tales motivos las cepas evaluadas para fungir como agente de biocontrol fueron *B. subtilis*, *B. methylotrophicus* y *M. pulcherrima*, de las cuales mediante ensayos previos se encontró potencial de biocontrol. En ensayos *in vitro* se determinaron sus eficiencias como agentes de biocontrol a través del porcentaje de inhibición en el desarrollo de micelial de *B. cinerea* comparado con cultivos control, aunque no se tomaron en cuenta los mecanismos de acción. Los resultados señalan a FR4B12 como mejor antagonista en pruebas *in vitro*, lo cual permite considerarla para las siguientes pruebas.

Se han reportado diversos mecanismos de *B. subtilis* en su papel como agente de biocontrol, donde el corto tiempo de respuesta le permite competir por espacio; la producción de lipopéptidos modifican y perforan la pared celular de los hongos, además de que inducen respuestas de defensa en las plantas (Nicot *et al.*, 2016). Dunlap *et al.* (2019) señalan el grupo de Iturinas como los principales lipopéptidos que intervienen en el biocontrol de enfermedades en plantas; además, promueve el crecimiento de su hospedero, reduciendo la susceptibilidad de las plantas a diversas enfermedades esto al secretar citoquininas (Shafi *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2018); Gupta *et al.* (2000) la asocian con la producción de precursores de fitohormonas que se involucran en la activación de genes para defensa del hospedero, mientras que Leelasuphakul *et al.* (2006) describen como defensa inducida por *B. subtilis* la degradación de pared celular de patógenos a través de la enzima a β -1,3-glucanasa, por lo que su eficiencia mostrada puede asociarse a su característica de expresar varios mecanismos de acción para inhibir el desarrollo micelial del patógeno.

La especie *B. methylotrophicus* ha sido poco estudiada; coloniza lento, crece entre los 25° C y 45° C en un rango de pH entre 2 y 10, además de soportar altas concentraciones de metano (Madhaiyan *et al.*, 2010). Trabajos previos reportan inhibición de patógenos en pruebas *in vitro*, donde se le atribuye la producción de antibióticos y cianuro de hidrógeno (Rios-Velasco *et al.*, 2016); Zhang *et al.* (2012) señalan su potencial en biorremediación, ya que ha mostrado capacidad de remover nitratos y amoníaco en ambientes eutrofizados, además de compuestos orgánicos volátiles que aumentan concentraciones de auxina, un promotor de crecimiento (Pérez-Flores *et al.*, 2017).

Se menciona a *M. pulcherrima* como buen agente de biocontrol postcosecha, ya que es capaz de resistir bajas temperaturas, lo que le permite seguir activa durante el almacén y transporte del producto (Saravanakumar *et al.*, 2008); diversos trabajos previos muestran que la aplicación de *M. pulcherrima* y hierro afecta directamente el desarrollo de *B. cinerea*, pero estas adiciones deben ser a concentraciones bajas, de lo contrario la eficiencia de la levadura se ve comprometida (Ruiz-Moyano *et al.*, 2016; Morata *et al.*, 2019); se ha registrado también la secreción de diversas enzimas proteolíticas, entre ellas la quitinasa, la cual degrada las paredes celulares de los hongos fitopatógenos que están conformadas por quitina (Pretscher *et al.*, 2018), las necesidades tan específicas para la expresión de los mecanismos de acción sumado a su naturaleza de levadura podrían ser causas de la eficiencia que reportó en el ensayo.

Esta plasticidad de mecanismos reportados para las cepas puede variar según las características del ambiente o el estrés al que esté sometido el agente; por lo tanto, su actividad inhibitoria puede verse comprometida, además de variar entre cepas o especies, por lo que ser aislados del entorno podría permitir una adaptación más eficaz; tal es el caso de las cepas de *B. cinerea* quienes se puede categorizar según su resistencia, las cepas B137 y B63 fueron las más susceptibles, seguidas de las cepas B134, B145 y B155, finalmente la cepa con mayor resistencia a los agentes de biocontrol fue B152. Tales variaciones

concuerdan con De Miccolis-Angelini *et al.* (2016) y Valiuškaitė *et al.* (2010) quienes mencionan que *B. cinerea* cuenta con polimorfismo genético; a dicha característica se le atribuye su gran rango de plantas hospederas, por lo que la diferencia en porcentajes de inhibición concuerda con esta característica genética de la especie.

De manera general, el considerar únicamente la inhibición del desarrollo micelial es útil para fines de un primer acercamiento, cubriendo así el objetivo de evaluar su eficiencia y confirmar antagonismo; sin embargo, incluir sus mecanismos de acción nos permitiría conocer las condiciones donde el agente desarrollaría un mejor papel, por lo que es recomendable probar los mecanismos que podrían presentar las cepas.

VII.II Ensayos *In vivo*: Frutos de vid

La eficiencia reportada en los ensayos *In vitro* fue un primer acercamiento con el cual vimos la expresión de mecanismos antagonísticos; sin embargo, la actividad en un ambiente con disponibilidad de recursos variables hizo que el desempeño del biocontrol no sea similar entre ellos. Un buen control en ensayos *in vitro* no asegura el mismo comportamiento en los ensayos *in vivo*.

Los valores reportados por *B. subtilis* se ven relacionados con la cantidad de mecanismos de acción que se le han descrito, tales como su capacidad de producir surfactinas, iturina y fengicina, principalmente, las cuales interfieren en procesos intracelulares, convirtiéndose en factores importantes para la inhibición de hongos (Cawoy *et al.*, 2014); Pedraza *et al.* (2020) citan la gran cantidad de mecanismos presentados por *B. subtilis* en pruebas *in vivo*, tales como la producción de compuestos antimicrobianos, síntesis de enzimas líticas y compuestos orgánicos volátiles; la gran diversidad de mecanismos reportados bajo diferentes condiciones y probado ante diversos patógenos, posiciona a la cepa como uno de los agentes de biocontrol más estudiado en los últimos años.

M. pulcherrima con potencial para prevenir pérdidas post-cosecha en frutos, por su producción de compuestos orgánicos volátiles, dichos compuestos son productos en fase gaseosa a base de carbono, estando entre los sólidos solubles totales en frutos lo que permite obtener los carbohidratos simples necesarios para *M. pulcherrima*, aunque su capacidad fermentativa sea baja es suficiente para generar sus productos (Castrillo *et al.*, 2016 y Morata *et al.*, 2019); de igual manera, su capacidad de competencia por hierro, dificulta el crecimiento de algunos patógenos (Oro *et al.*, 2014); algunos autores la asocian en la prevención de cambios de color de la cascara, firmeza del fruto, sólidos solubles del fruto y concentraciones de vitamina C (Prendes, 2016; Tian *et al.*, 2017). Su actividad durante el ensayo puede relacionarse a los nutrientes disponibles en las uvas probadas según los mecanismos antagónicos mencionados en pruebas *in vivo* para la cepa.

Diversos autores mencionan a *B. methylotrophicus* como promotor del desarrollo y crecimiento vegetal; por ejemplo, la presencia del gen *acdS* codificante para 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC) precursor inmediato de etileno, involucrado en la maduración de frutos (Madhaiyan *et al.*, 2010); caso similar durante su aplicación en *Arabidopsis thaliana* donde se reporta como promotor del desarrollo de raíces a través de la acetoina, clasificado como compuesto orgánico volátil, donde la levadura es señalada como responsable de aumentar las concentraciones de auxina en las zonas meristemáticas (Pérez-Flores *et al.*, 2017). De igual manera se le reconoce como promotor de resistencia en hojas de uvas por estimular la actividad de LOX, PAL y quitinasas (Trotel-Aziz *et al.*, 2008); sin embargo, su baja actividad puede relacionarse con la ausencia de celulasa, arginina dihidrolasa, ureasa, β -galactosidasa y de no fermentar glucosa, puesto que los azúcares representan la mayor concentración en frutos, posiblemente su baja capacidad de usarlos la puso en desventaja ante el patógeno.

La importancia de conocer la biología, considerar sus necesidades ambientales y las características químicas de sus compuestos inhibitorios otorga mayor peso a la selección de agentes de biocontrol y en el sistema de manejo que sea apropiado aplicar, permitiendo diseñar planes para la prevención o tratamiento de enfermedades.

Debido a las consideraciones anteriores y los datos mostrados, se escogieron las cepas NB9 y FR4B12 para probar su eficiencia en la disminución de daño en plantas de uva.

VII.III Ensayo en invernadero

La presencia de organismos dañinos para el humano es común en nuestro entorno; sin embargo, su población se ve controlada por las interacciones que existen, algunas se promueven entre ellos, otros se inhiben. Esta red de interacciones se ve comprometida por el excesivo uso de plaguicidas, por lo que la red trófica del entorno natural es importante que deba ser considerada en el uso de organismos como agentes de biocontrol (Castrillo-Cachón, 2018).

A través del tiempo y con la intervención del humano, se crearon las variedades de uva según las características que preferían, por lo que hay diferencias entre las variedades de uva “Cabernet sauvignon” y “Syrah”, tales como la actividad fotosintética, y concentraciones en xilema de ABA, actividad estomática, transpiración y potencial hídrico de hojas. Estas características se reportan como factores en el desarrollo de dichas variedades, por ejemplo en la longitud de los brotes, el área foliar, concentración de clorofila, densidad de estomas, temperatura media de las hojas y composición de frutos (Rogiers *et al.*, 2009), por lo que considerar tales datos de las variedades de uva durante las evaluaciones de biocontrol debe ser de importancia para futuros ensayos.

Tian *et al.* (2017), para *M. pulcherrima*, señalan la presencia de hierro, pH de 4.5~6 y glucosa como elementos necesarios para la síntesis de Compuestos

Orgánicos Volátiles (COV), que son mencionados como su principal mecanismo de inhibición, por lo que es un factor de importancia en su desempeño como agente, relacionado con su eficiencia aquí mostrada. Por otro lado, al no depender de una sola ruta de inhibición muestra disminución de la incidencia de daño en hojas por el desarrollo de biofilm a corto plazo, permitiendo una rápida colonización sobre las hojas (Oro *et al.*, 2014) por lo tanto su aplicación es eficiente para tratamientos postcosecha, donde cuenta con fuentes de carbono disponibles para expresar la producción de compuestos orgánicos volátiles.

Por otro lado, *B. methylotrophicus* y la eficiencia antagonica que obtiene sobre *B. cinerea* en plantas de vid concuerda con los mecanismos de acción reportados, tales como promover el desarrollo vegetal al inducir la expresión de genes codificantes para defensa de las plantas, por ejemplo ACC deaminasa, GUS, LOX, PAL, quitinasas y acetoina las cuales inducen en el crecimiento y/o desarrollo vegetal (Madhaiyan *et al.*, 2010). Bézier *et al.* (2002) mencionan algunos genes que se han descrito durante la defensa de plantas de uva, por ejemplo PAL, StSy, VCH3, VCHIT1b, quitinasa y compuestos orgánicos volátiles, sin embargo, la activación de estas estrategias son lentas, la infección total de hojas se registra completa en no más de tres días (Pérez-Flores *et al.*, 2017), por lo que la eficiencia aquí registrada puede mejorar; por lo tanto la cepa es buen candidato para su uso en disminución de daño asociado a la infección por *B. cinerea* en plantas de vid.

VIII. CONCLUSIONES

Los datos mostrados en las pruebas *in vitro*, en fruto e invernadero muestran poca correlación en el desempeño del antagonista sobre el patógeno, fungiendo como primer acercamiento a la presencia de antagonismo.

Los agentes de biocontrol evaluados presentan diferentes rangos de inhibición de *B. cinerea* en cada escenario, donde la levadura NB9 mostró mayor efecto en fruto.

La cepa FR4B12 tiene menor eficiencia en frutos y mayor control de daño en hojas, por lo que la actividad mostrada en dichos órganos la señala como candidato a usarse en invernadero, por otro lado NB9 se desempeña mejor en frutos que en hojas apuntando su potencial uso en frutos, además hay organismos como P24 que se expresan bien en diversas condiciones.

De manera específica sirven como un primer acercamiento para corroborar la competencia entre organismos y poder buscar las características de los entornos que benefician la eficiencia de cada antagonista.

VIII.I Perspectivas de estudio

- Identificar los mecanismos de acción de FR4B12 y NB9 para su uso en cultivos.
- Identificar los mecanismos de acción de *M. pulcherrima* y mejorar su eficiencia para conservar frutos de vid.
- La cepa *B. methylotrophicus* puede considerarse para identificar sus mecanismos de acción y poder considerar su aplicación en plantas de vid.
- Evaluar la eficiencia antagónica de los agentes en diferentes momentos de desarrollo de la planta.
- Tomar en cuenta la biología de los agentes es importante para evitar deficiencias en su desempeño mostrado.

LITERATURA CITADA

- Abramoff, D. M., Magalhaes, P. J. y Ram, S. J. (2004). *Image Processing with ImageJ. Biophotonics International*, 2: 36-42.
- Aday-Díaz, O. de la C., González-Hernández, R., Díaz-Mujica, F. R., Reyes-Esquirol, C., Gil-Cruz, Y., Reyes-Pérez, S. y Barroso-Melillo, J. (2017). *Aplicación del software ImageJ® 1.43u en la caracterización de los síntomas de la mancha anular de la caña de azúcar*. *Revista Centro Agrícola*, 44(2): 83-88.
- Amo-Flórez, J. (2018). *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.
- Anónimo. (2018) *¿Qué es la Botrytis o moho gris?* Disponible en <https://www.alchimiaweb.com/blog/que-es-la-botrytis-o-moho-gris/> consultado el 29 de octubre de 2019.
- Arévalo-Pacheco, G. J. (2018). *La ruta turística enológica como en Querétaro y Baja California, México*. *Rev. Tury. Turismo y Desarrollo*, 25(11): 1-15.
- Beever, R. E., y Weeds, P. L. (2007). *Taxonomy and Genetic Variation of Botrytis and Botryotinia*. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 29–52.
- Belanger, M. C., Roger, J. M., Cartolaro, P. y Fermaud, M. (2011). *Autofluorescence of grape berries following Botrytis cinerea infection*. *International Journal of Remote Sensing*, Taylor y Francis, 32(14): 3835 - 3849.
- Bézier, A., Lambert, B. y Baillieul, F. (2002). *Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 111–120.
- Biratu, K. H. (2017). *Review Paper on Status, Distribution and the Management of Chickpea, Botrytis Grey Mould (Botrytis cinerea)*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(3): 21-32.

- Blanco, C., De Los Santos, B. y Romero, F. (2006). *Relationship between concentrations of Botrytis cinerea conidia in air, Environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and Fruits. European Journal of Plant Pathology*, 114: 415–425.
- Boiteux, J. J., Hapon, M. V., Fernández, M. de los Á., Lucero, G. S. y Pizzuolo, P. H. (2015). *Efecto del extracto acuoso de chañar (Geoffroea decorticans Burkart) sobre Botrytis cinerea, como posible alternativa para su control durante postcosecha de uva de mesa. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 47(1): 241-250.
- Bonaterra, A., Mari, M., Casalini, L., y Montesinos, E. (2003). *Biological control of Monilinia laxa and Rhizopus stolonifer in postharvest of stone fruit by Pantoea agglomerans EPS125 and putative mechanisms of antagonism. International Journal of Food Microbiology*, 84(1): 93–104.
- Borja-Bravo, M., García-Salazar, J. A., Reyes-Muro L. y Arellano-Arciniega S. (2016) *Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (Vitis vinifera) para mesa e industria en Aguascalientes, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). ASyD*, 13: 151-168.
- Brankica, T., Hrustic, J., Mihajlovic, M., Grahovac, M. y Delibasic, G. (2014). *Botrytis cinerea in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. Pesticidi i fitomedicina*, 29: 237-247.
- Calvo, P. y Zúñiga, D. (2011). *Physiological characterization of Bacillus spp. strains from potato (Solanum tuberosum) rhizosphere. Ecol. Apl.*, 9(1): 31-39.
- Campbell, P., Bendek, C. y Latorre, A. B. (2007). *Riesgo de oídio (Erysiphe necator) de la vid en relación con el desarrollo de los racimos. Cien. Inv. Agr.*, 34(1): 5-11.
- Castillo-Reyes, F., Castillo-Quiroz, D., Muñoz-Flores, H. J., y Rueda-Sánchez, A. (2018). *Uso de bio-pesticidas de origen vegetal en el manejo de enfermedades de cultivos*

en México. Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México, 4 (5): 107-121.

Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., y De Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22(1): 7–17.

Castrillo D., Sánchez, M. y Blanco, P. (2016). *Diversidad de levaduras en uva y mostos de producción ecológica en Galicia*. En Simón Fernández X.; Copena Rodríguez, D.; Pérez Neira, D. (Eds). *Construyendo Conocimiento Agroecológico. Cambiando los modelos de consumo para construir sistemas agroalimentarios sustentables*. Pp. 258-268. Universidad de Vigo: Grupo de investigación en Economía Ecológica, Agroecología e Historia.

Castrillo-Cachón, D. (2018). *Study of yeast diversity in organic and conventional grapes from Galicia: biogeographic patterns and influence on the chemical and sensory characteristics of wine*. Tesis de Doctorado. Universidad de León, León.

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De-Pauw, E., Thonart, P. y Ongena, M. (2014). *Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8: 281–295.

Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., y Lumyong, S. (2009). *Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 1919–1928.

Ciliberti, N., Fermaud, M., Languasco, L., y 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.

Coca-Morante, M. (2009). *Agalla de corona del duraznero (Prunus pérsica L.) causada por Agrobacterium tumefaciens en el Valle Alto de Cochabamba*, 1: 31-36.

- Consejo Mexicano Vitivinícola (CMV). (2018). *Datos de la industria*. Disponible en: <https://uvayvino.org.mx/> (Consultado el 26 de septiembre de 2019).
- De Miccolis-Angelini, R. M., Habib, W., Rotolo, C., Pollastro, S., y Faretra, F. (2010). *Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea) resistant to the fungicide boscalid*. *European Journal of Plant Pathology*, 128(2): 185–199.
- De Miccolis-Angelini, R. M., Pollastro, S., y Faretra, F. (2016). Genetics of *Botrytis cinerea*. *BioGer. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London*. Fillinger, S. y Elad, Y. (Eds.), 3: 35-53.
- 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.
- Dewey, F. M. y Grant-Downton, R. (2015). *Botrytis-Biology, Detection and Quantification*. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, 17–34.
- Dewey, F. y Meyer, U. (2004). *Rapid, quantitative Tube immunoassays for on-site detection of Botrytis, Aspergillus and Penicillium antigens in grape juice*. *Analytica Chimica Acta*, 513: 11-19.
- Díaz-Limón, M. P., Cano-Santana, Z., y Queijeiro-Bolaños, M. E. (2016). *Infección por muérdago en un bosque urbano en la Ciudad de México*. *Urban Forestry & Urban Greening*, 17: 126–134.
- Domínguez, I., Cedeno, L., Briceño, A., Pino, H., Quintero, K. y Rodríguez, L. (2019). *Primer reporte en Venezuela de Botrytis cinerea causando quema foliar en Lisianto (Eustoma grandiflorum)* First report of *Botrytis cinerea* in Venezuela causing leaf blight on Lisianto (*Eustoma grandiflorum*). *Revista Forestal Venezolana*, 52(2):173-176.

- Dunlap, C., Bowman, M. J. y Rooney, A. P. (2019). *Iturinic Lipopeptide Diversity in the Bacillus subtilis Species Group – Important Antifungals for Plant Disease Biocontrol Applications*. *Front. in Microbiol.*, 10: 1794.
- Elad, Y., Pertot I., Cortes-Prado M. A. y Stewart A. (2016). *Plant Hosts of Botrytis spp. BioGer*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. Fillinger, S. y Elad, Y. (Eds.), 4: 413-489.
- Encuesta Nacional Agropecuaria. (2018). Porcentaje de unidades de producción agrícola según problemas que afectan el desarrollo de las actividades agrícolas por cultivo principal. Consultado el 10 de febrero de 2020. Disponible en: www.ineqi.org.mx/ena
- Esteves-Mar, A. I. (2016). *Efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes inducida*. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y FAOSTAT (Statistics Division). (2019). Cultivos. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (Consultado: 27 de octubre de 2019).
- Ferreira, T. y Rasband, W. (2012). *ImageJ User Guide*. IJ146r. En sitio web: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide> Fecha de consulta: 25 de junio, 2015.
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Al-Hajj, C. y Debieu, D. (2008). *Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52(11): 3933–3940.
- Flores-Ruíz, M. N., Oyoque-Salcedo, G., Mena-Violante, H. y Angoa-Pérez, M. V. (2015). *Uso de extractos bacterianos para el control de Botrytis cinerea in vitro*. *Agricultura Sostenible*. Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible A.C. Colegio de Postgraduados, 1(1): 185-197.

- Fravel, D. R. (2005). *Commercialization and Implementation of Biocontrol. Annual Review of Phytopathology*, 43(1): 337–359.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). (2017). *About FRAC and Home*. Disponible en: <https://www.frac.info/home> (Consultado el 29 de noviembre de 2019).
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). (2019). *Clasificación de Fungicidas y bactericidas según el modo de acción*. España: 1 edición.
- González-Loza, E. P. (2004). *Plagas, enfermedades y sistemas de conducción de la vid (Vitis vinifera L.)*. Tesis de Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, División De Agronomía. Saltillo, Coahuila.
- Guevara-Lugo, J. G. (2005). *La Enfermedad de Pierce en México*. INIFAP. Memorias del II seminario internacional de Vitivinicultura. Pp. 65-70.
- Gupta, V, Bochow, H, Dolej, S, Dolej, S. y Fischer, I. (2000). *Ein das Pflanzenwachstum fördernder Bacillus subtilis-Stamm als potentieller Resistenzinduktor gegen die Fusarium-Welke an Tomaten [Plant growth-promoting Bacillus subtilis strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against Fusarium wilt]*. *J Plant Dis Prot.*, 107(2): 145-154.
- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-garrido, C., Roudet, J. y Deschamps, A. (2016). *Modes of action for biological control of Botrytis cinerea by antagonistic bacteria*. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3): 301–322.
- Hernández-Gómez, M. de los Á., Malagón-Sánchez, A. K. y Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). *Efecto antagónico de Bacillus subtilis Q11 contra el hongo fitopatógeno Sclerotium rolfsii*. *Revista de Ciencias de la Salud*, 3(6): 28-30.
- Holz, G., Coertze, S., y Williamson, B. (2007). *The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces*. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 9–27.

- Hunter, J.J. & Bonnardot, V. (2011). *Suitability of some climatic parameters for grapevine cultivation in South Africa, with focus on key physiological processes*. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 32(1): 137-154.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., y Alizadeh, A. (2011). *A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage*. *EPPO Bulletin*, 41(1): 65–71.
- Janisiewicz, W. J. y Korsten, L. (2002). *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40: 411–41.
- Juárez-Campusano, Y. S. (2017). *Detección de Botrytis cinerea mediante PCR en cultivos de vid y evaluación del biocontrol con Bacillus subtilis Q11*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
- Karabulut, O., Smilanick, J. L., Gabler, F. y Mansour, M. (2003). *Near-Harvest Applications of Metschnikowia fructicola, Ethanol, and Sodium Bicarbonate to Control Postharvest Diseases of Grape in Central California*. *Plant Disease*, 87(11): 1384-1389.
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., y Bayat, H. (2010). *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(1): 19-24.
- Kim, Y. C., Hur, J. Y., y Park, S. K. (2019). *Biocontrol of Botrytis cinerea by chitin-based cultures of Paenibacillus elgii HOA73*. *European Journal of Plant Pathology*.
- Kiss, L., Holb, I. J., Rossi, V., Candle-Davidson, L., Jeger, J. M. (2016). *Foreword: Special issue on fungal grapevine diseases* Foreword: *Special issue on fungal grapevine diseases*. *Eur J Plant Pathol.*, 144: 693–694.

- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M. y Blum, B. (2011). *Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria*. *Biological Control*, 57: 1–12.
- Koike, S. T. y Bolda M. (2016). *El moho gris, o pudrición de la fresa*. Comisión de la fresa de California. Guía de producción, 13: 1-6.
- Kolukisaoglu, U. y Thurow, K. (2010). *Future and frontiers of automated screening in plant sciences*. *Plant Science*, 178: 476–484.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. y Phongpaichit, S. (2006). *Purificación, caracterización y actividad sinérgica de β -1,3-glucanasa y extracto antibiótico de un *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 antagonista contra la explosión de arroz y el tizón de la vaina*. *Tecnología de enzimas y microbios*, 38 (7): 990–997.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W. y Sa, T.-M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10): 2490–2495.
- Manso, T. y Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 61: 64–71.
- Mayr, L. M. y Bojanic, D. (2009). *Novel trends in high-throughput screening*. *Current Opinion in Pharmacology*, 9: 580–588.
- Melin, P., Sundh, I., Håkansson, S., y Schnürer, J. (2007). *Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects*. *Biotechnology Letters*, 29(8): 1147–1154.
- Mewa-Ngongang, M., du-Plessis, H.W., Ntwampe, S.K.O., Chidi, B.S., Hutchinson, U.F., Mekuto, L. y Jolly, N.P. (2018). *Fungistatic and fungicidal properties of *Candida pyralidae* Y1117, *Pichia kluyveri* Y1125 and *Pichia kluyveri* Y1164 on the biocontrol*

of Botrytis cinerea. 10th Int'l Conference on Advances in Science, Engineering, Technology & Healthcare (ASETH-18) Nov. 19-20, Cape Town (South Africa).

- Miclea, R., Suciú, L., Dobrin, I. y Puia, C. (2015). *The Biology of Botrytis Cinerea Pers. Isolated from Different Geranium Varieties. Bulletin USAMV series Agriculture*, 72(1): 292-294.
- Molina-Mercader, G., Zaldúa-Flores, S., González-Vargas, G. y Von-Stowasser, E. S. (2006). *Selección de hongos antagonistas para el control biológico de Botrytis cinerea en viveros forestales en Chile. BOSQUE*, 27(2): 126-134.
- Monis, J. (2008). *Propagación de la enfermedad del enrollamiento de la hoja en el viñedo: estrategias para prueba, gestión y control de la enfermedad. Revista Enología*, (5)3: 1-5.
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., Del-Fresno, J. M., Bañuelos, M. A. y Suárez-Lepe, J. A. (2019). *Applications of Metschnikowia pulcherrima in Wine Biotechnology. Fermentation*, 5(3): 63-71.
- Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S. y Tzavella-Klonari, K. (2007). *Resistance of Botrytis cinerea isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. Plant Dis.*, 91: 407-413.
- Nicot, P. C., Stewart, A., Bardin, M. y Elad, Y. (2016). *Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis -Incited Diseases. BioGer. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London*. Fillinger, S. y Elad, Y. (Eds.). Cap. 9: 165-187.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., y Comitini, F. (2014). *Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by Saccharomyces cerevisiae Disva 599, Metschnikowia pulcherrima Disva 267 and Wickerhamomyces anomalus Disva 2 strains. Postharvest Biology and Technology*, 96: 64–68.

- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., y Comitini, F. (2018). *Volatile organic compounds from Wickerhamomyces anomalus, Metschnikowia pulcherrima and Saccharomyces cerevisiae inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. International Journal of Food Microbiology*, 265: 18–22.
- 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.
- Papadopulos, F., Spinelli, M., Valente, S., Foroni, L., Orrico, C., Alviano, F. y Pasquinelli, G. (2007). *Common Tasks in Microscopic and Ultrastructural Image Analysis Using ImageJ. Patología ultraestructural*, 31(6): 401–407.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. y Cirvilleri, G. (2015). *Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against Botrytis cinerea causing post-harvest bunch rot of table grape. Food Microbiology*, 47: 85-92.
- Paz, ICP, Santin, R. de CM, Guimarães, AM, Rosa, OPP da, Quecine, MC, Silva, M. de CP e, Matsumura, ATS (2018). *Biocontrol of Botrytis cinerea and Calonectria gracilis by eucalypts growth promoters Bacillus spp. Microbial Pathogenesis*, 121: 106-109.
- Pedraza, L. A., López, C. A. y Uribe-Vélez, D. (2020). *Mecanismos de acción de Bacillus spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. Acta biol. Colomb*, 25(1).
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P., & Macías-Rodríguez, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus M4-96 isolated from maize (Zea mays) rhizoplane increases growth and auxin content in Arabidopsis thaliana via emission of volatiles. Protoplasma*, 254(6): 2201–2213.

- Prendes, P. L. (2016). *Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.
- Pretscher J., Fischkal T., Branscheidt S., Jager L., Kahl S., Schlander M., Thines E. y Claus H. (2018). *Yeasts from Different Habitats and Their Potential as Biocontrol Agents*. *Fermentation*, 4(31): 2-17.
- Queijeiro-Bolaños, M. E., Cano-Santana, Z. y García-Guzmán, G. (2013). *Incidence, severity, and aggregation patterns of two sympatric dwarf mistletoe species (Arceuthobium spp.) in Central México*. *Eur. J. Forest Res.*, 133: 297–306.
- Ramos E., Bonilla B. y Aguilar M. (2018). *Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal*. *CITECSA*, 10(15): 23-31.
- Reinozo-Pozo, Y., Vaillant-Flores, D., Casadesús-Romero, L., García-Pérez, E. y Álvarez-Rivera, V. P. (2007). *Selección de cepas de Bacillus y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos*. *Fitosanidad*, 11(1): 35-40.
- Reynier, A. (1995). *Manual de Viticultura*. Mundi prensa, 3(939): 124-125.
- Rincón-Guerrero, N., Olarte-Quintero, M. A. y Pérez-Naranjo, J. C. (2012). *Determinación del Área Foliar en Fotografías Tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara Semiprofesional*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 65(1): 6399-6405.
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. N., Berlanga-Reyes, D. I., Ruíz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J.J., Salas-Marina, M. A., Villalobos-Pérez, E. y Guerrero-Prieto, V. M. (2016). *Identification and antagonistic activity in vitro of Bacillus spp. and Trichoderma spp. isolates against common phytopathogenic fungi*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1): 84-99.

- Rogiers, S. Y., Greer, D. H., Hutton, R. J. y Landsberg, J. (2009). *Does night-time transpiration contribute to anisohydric behaviour in a Vitis vinifera cultivar?*. *Journal of Experimental Botany*, 60(13): 3751–3763.
- Romanazzi, G. y Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea (Gray mold)*. Marche Polytechnic University, Department of Agricultural, Food, and Environmental Sciences, Ancona, Italy, 4: 131- 144.
- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E. y Droby, S. (2016). *Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops*. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 69–76.
- Rubio-Ramos, J. M. (2011). *Botánica, Organografía y Ciclo anual de la Vid*. Universidad de Almería. Repositorio digital. Consultado el 27 de octubre de 2019.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Villalobos, M. C., Calle, A., Serradilla, M. J., Córdoba, M. G., y Hernández, A. (2016). *Yeasts isolated from figs (Ficus carica L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases*. *Food Microbiology*, 57: 45–53.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2018) Uva mexicana. Planeación Agrícola nacional 2017-2030. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y CMV (Consejo Mexicano Vitivinícola). (2018). Comité nacional del sistema producto vid: Plan Rector. Febrero.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2017) Uva mexicana. Planeación Agrícola nacional 2017-2030. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf> (Consultado: 14 de julio de 2019).

- Sanzani, S. M., Schena, L., De Cicco, V., e 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.
- Saravanakumar, D., Spadaro, D., Garibaldi, A. y Gullino, ML (2008). *Detección de actividad enzimática y secuencia parcial de un gen de quitinasa en la cepa MACH1 de Metschnikowia pulcherrima utilizada como agente de biocontrol poscosecha. European Journal of Plant Pathology*, 123(2): 183–193.
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA) y Consejo Mexicano de Vitivinicultura (CMV). (2018). *Producción de vid en México*. Disponible en: https://uvayvino.org.mx/docs/produccion_vid_mx.pdf
- Scuderi G., Bonaccorsi A., Panebianco S., Vitale A., Polizzi G. y Cirvilleri G. (2009). *Some strains of Burkholderia gladioli are potential candidates for postharvest biocontrol of fungal rots in citrus and apple fruits. Journal of Plant Pathology*, 91(1): 207-213.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2019). *Pudrición negra de la vid (Guignardia bidwellii – Phyllosticta ampellicida)*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria- Dirección General de Sanidad Vegetal- Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F.
- Sepúlveda, R. P. (2017). *Enfermedades de Uva mesa. Manual del cultivo de uva mesa. Santiago de Chile. Boletín INIA*, 18(8): 106- 120.
- Shafi, J. Tian, H. y Ji M. (2017). *Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3): 446-459.
- Sharma, R. R., Singh, D. y Singh, R. (2009). *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control*, 50: 205–221.

- SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta) y SIAP (Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera). (2019). Módulo Agrícola del SIACON. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> (Consultado: 14 de julio de 2019).
- Song, J., Smart, R., Wang, H., Dambergs, 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.
- Spadaro, D., y Gullino, M. L. (2004). *State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology*, 91(2): 185–194.
- Staats, M. (2004). *Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus Botrytis and the Evolution of Host Specificity. Molecular Biology and Evolution*, 22(2): 333–346.
- SYNGENTA. (2011). *Disease Identification Guide for Grapes*.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., Heydrich-Pérez, M. (2011). *Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3): 131-138.
- Tian, Y., Li, W., Jiang, Z., Jing, M., y Shao, Y. (2017). *The preservation effect of Metschnikowia pulcherrima yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism. Food Science and Biotechnology*, 27(1): 95–105.
- Toscano-Tavares, L., Toscano-Tavares, L., Tavares-Leite, R., Dos-Santos, J. N. Clementino-Alves, R. C. y Silva, A. S. (2015). *Effects of Grape Juice Consumption in the Mood State in Recreational Runners. Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 19(2): 25-32.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., y Aziz, A. (2008). *Characterization of new bacterial biocontrol agents Acinetobacter, Bacillus, Pantoea and Pseudomonas*

spp. mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea. Environmental and Experimental Botany, 64(1): 21–32.

Valiuškaitė, A., Survilienė, E. y Baniulis, D. (2010). *Genetic diversity and pathogenicity traits of Botrytis spp. isolated from horticultural hosts. Žemdirbystė=Agriculture*, 97(4): 85–90.

Velásquez Valle, R., Galindo Reyes M. A., González Gaona E. y Reveles Torres L. R. (2013). *Presencia y manejo de los virus de hoja abanico y enrollamiento de la hoja en viñedos de Aguascalientes. Campo Experimental Zacatecas-INIFAP. Zacatecas. Folleto técnico*, 48(1): 1-30.

Vargas-Díaz, A. A., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, I. L., Pérez-Brito, D., Cristóbal-Alejo, J. y Ruiz-Sánchez, E. (2014). *Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra Alternaria chrysanthemi y espectro de actividad antifúngica de Acaly. Revista Mexicana de Fitopatología*, 32: 1-11.

Walker, A. S. (2016). *Diversity within and between species of Botrytis. BioGer. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. Fillinger, S. y Elad, Y. (Eds.) Cap. 6: 91-125.*

Zhang, Q. L., Liu, Y., Ai, G. M., Miao, L. L., Zheng, H. Y. y Liu, Z. P. (2012). *The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, Bacillus methylotrophicus strain L7. Bioresource Technology*, 108: 35–44.

ANEXO

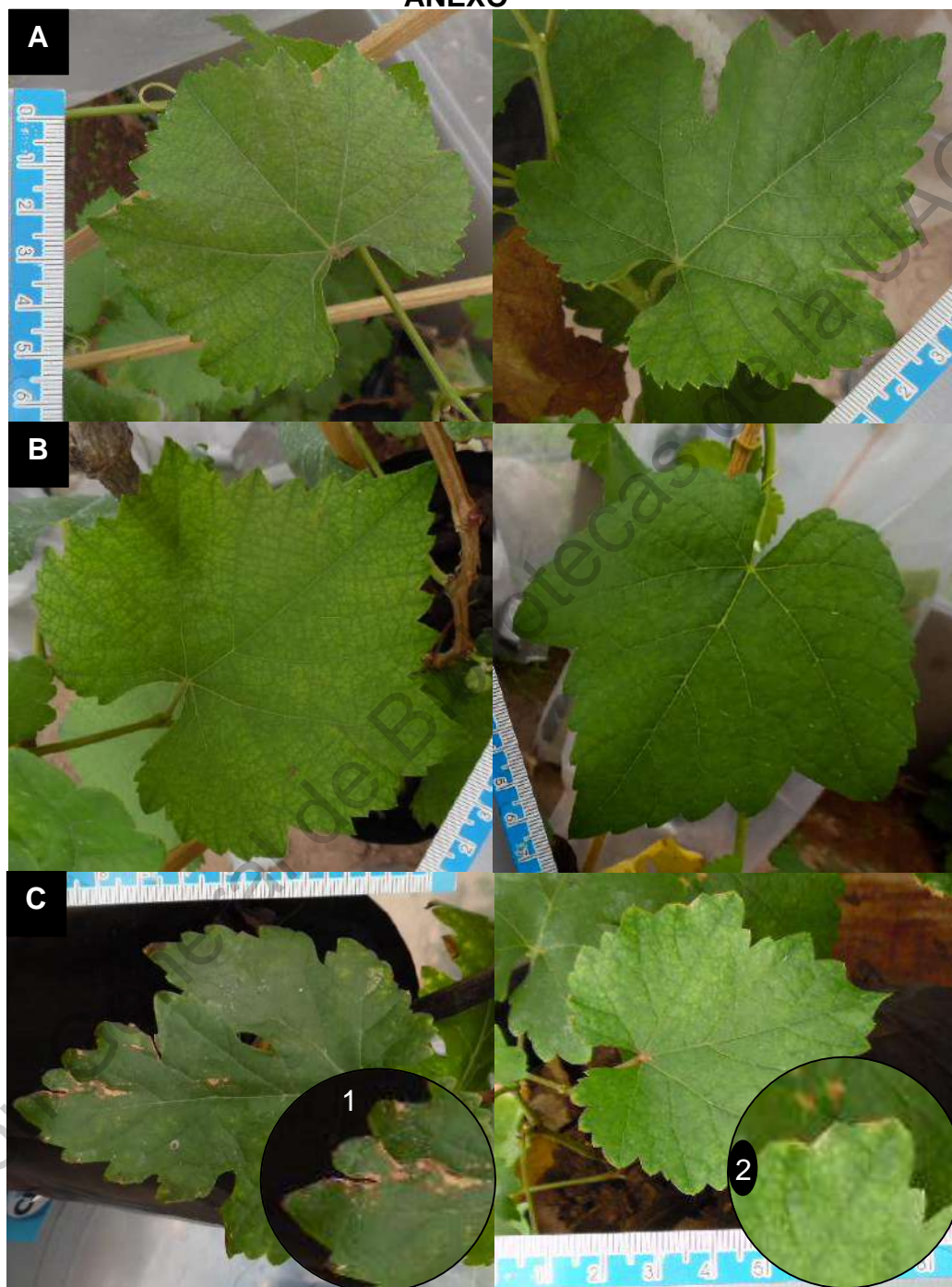


Imagen 1. Imágenes capturadas para obtención de área total y con daño en la variedad "Syrah"; A) Tratamiento Control de FR4B12, B) Tratamiento Control de NB9 y C) Tratamiento Control Negativo; 1) Bordes de la lamina foliar con daño, 2) inicio de daño en el limbo de la hoja.

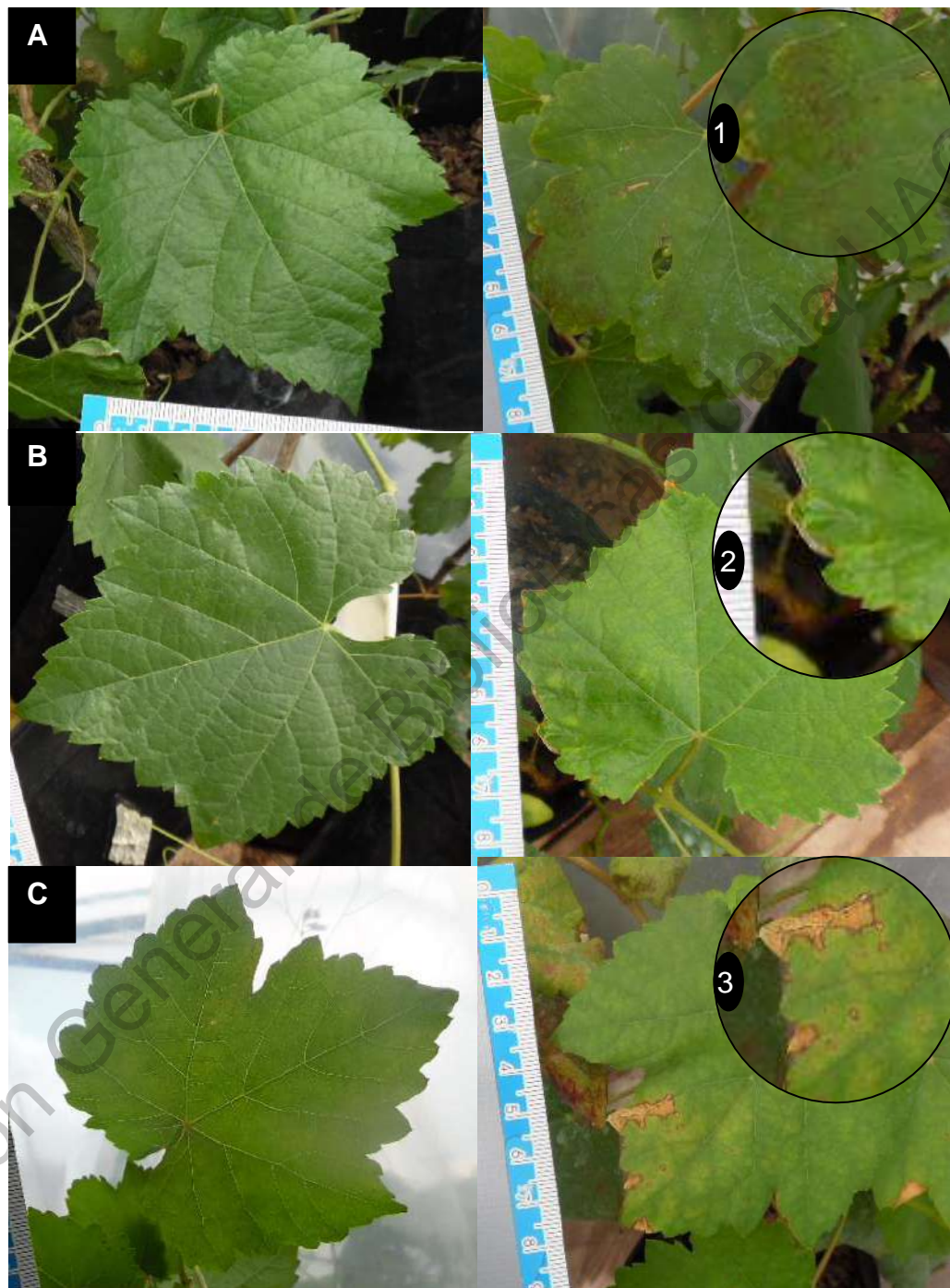


Imagen 2. Imágenes capturadas para obtención de área total y con daño en la variedad "Syrah", izquierda hojas sanas, derecha hojas con daño; A) Tratamiento Control Positivo, 1) puntos café oscuro distribuidos en la lámina; B) *B. cinerea* x FR4B12, 2) borde del limbo con puntos necróticos y C) *B. cinerea* x NB9, 3) manchas necróticas alargadas.

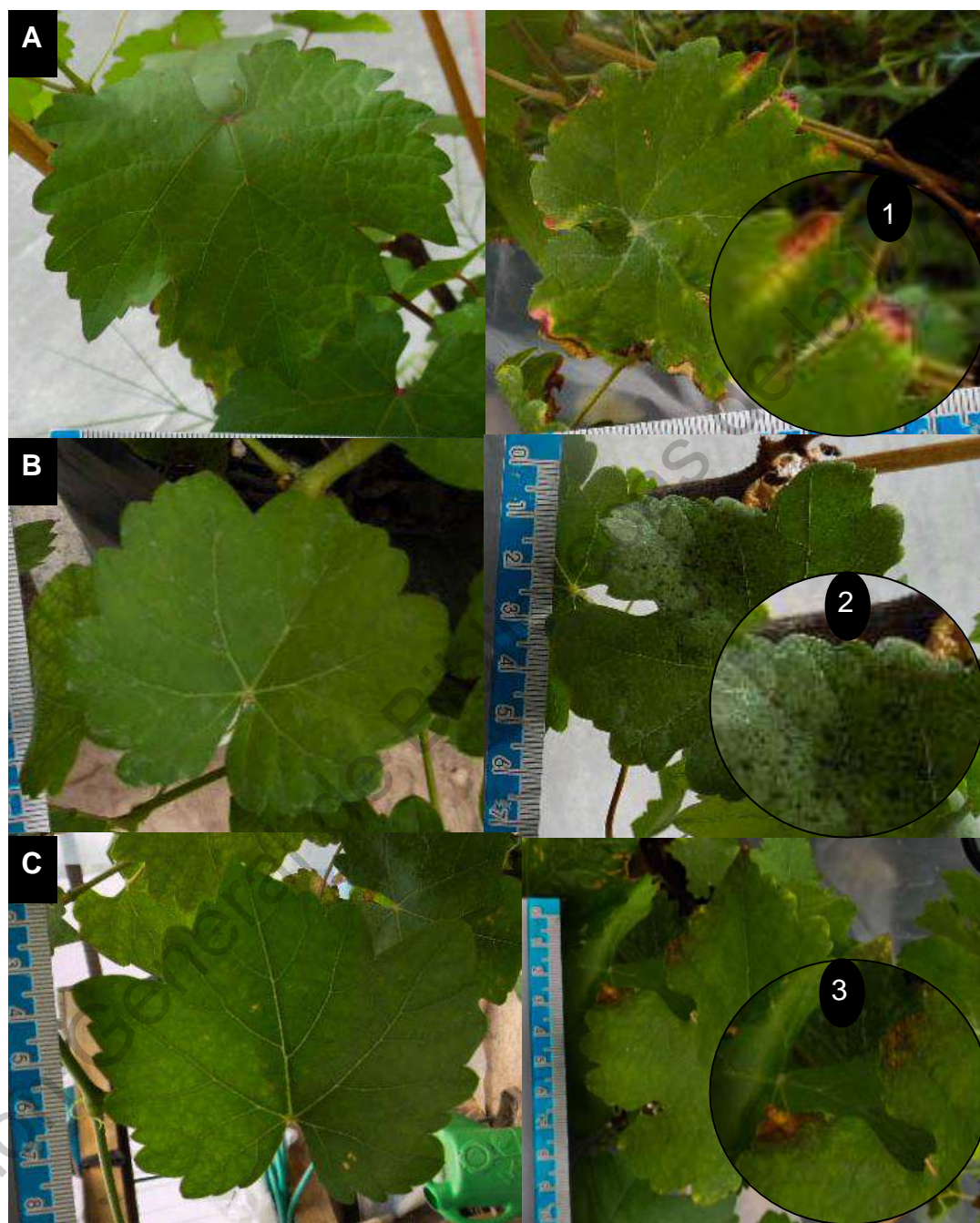


Imagen 3. Imágenes capturadas en el ensayo en invernadero de la variedad “Cabernet sauvignon”; A) Tratamiento Control de FR4B12; 1) limbos de la hoja con daño, B) Tratamiento Control de NB9, 2) puntos oscuros distribuidos en la lámina foliar y C) Tratamiento Control Negativo; 3) inicio de daño en el limbo de la hoja.

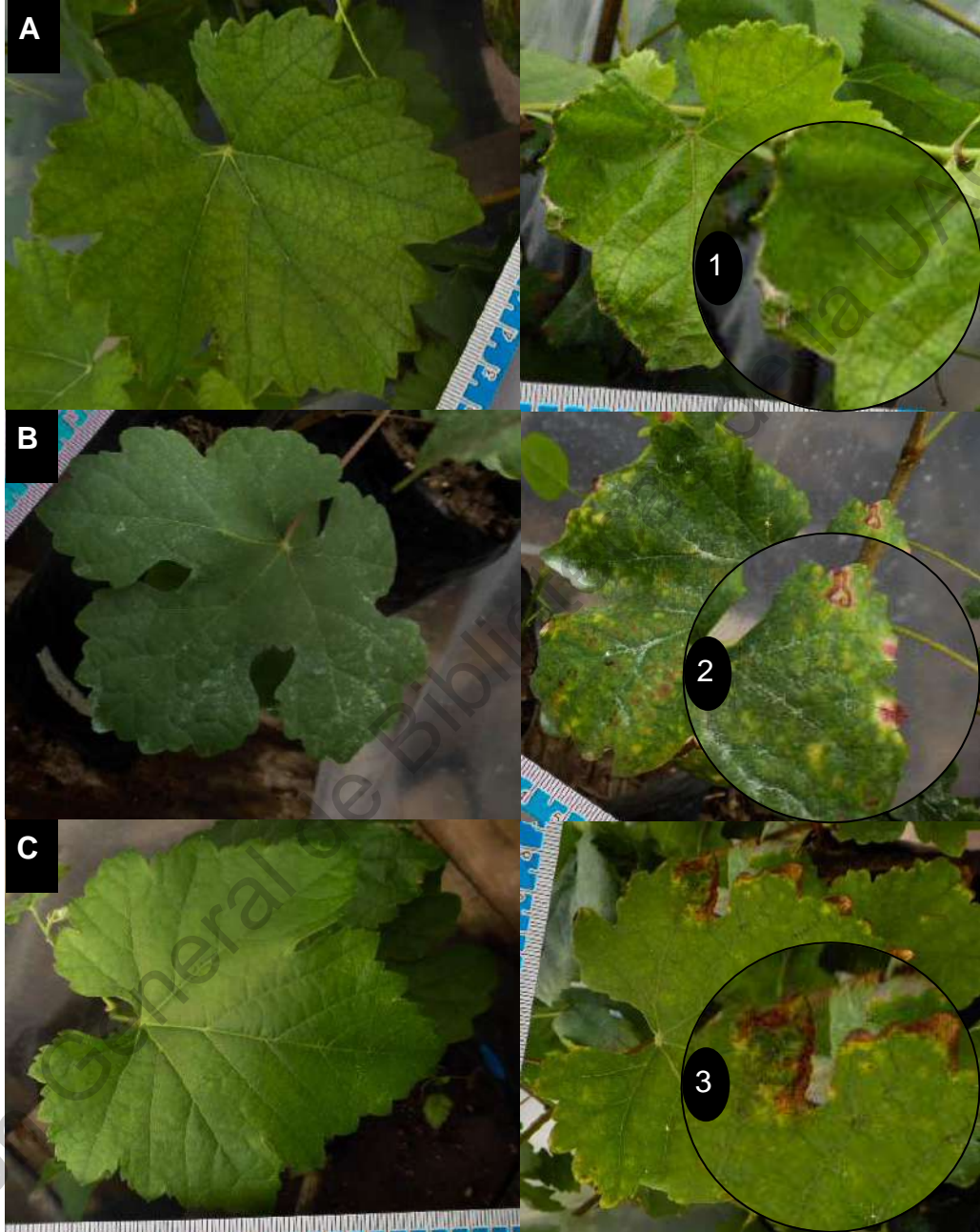


Imagen 4. Imágenes capturadas en el ensayo en invernadero de la variedad “Cabernet sauvignon”; izquierda hojas sanas, derecha hojas con daño; A) Tratamiento Control Positivo, 1) borde del limbo dañado, se ve afectada el haz de la hoja B) *B. cinerea* x FR4B12, 2) borde del limbo con puntos necróticos y clorosis en la lámina y C) *B. cinerea* x NB9, 3) afectaciones en el limbo de la hoja.