



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DE LA PODREDUMBRE GRIS  
CAUSADA POR *Botrytis cinerea* EN FRUTO DE UVA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO AGROQUÍMICO**

**PRESENTA**

**MARÍA GUADALUPE MENDOZA CERVANTES**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA PODREDUMBRE GRIS CAUSADA POR *Botrytis cinérea* EN FRUTO DE UVA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO AGROQUÍMICO**

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE MENDOZA CERVANTES

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR

SINODALES

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR  
DIRECTOR

Ing. ALEJANDRO CAMACHO MORALES  
SECRETARIO

M. en C. MARÍA DEL SOCORRO CHÁVARO ORTIZ  
SINODAL

M. en C. AURORA MARIANA ALVARADO  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. El cultivo de la vid	1
1.1.1. El cultivo de la vid en Querétaro	1
1.2. Podredumbre gris en vid	2
1.2.1. Biología de <i>Botrytis cinerea</i>	2
1.2.2. Fuentes de inóculo e infección	4
1.2.3. Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad	4
1.2.4. Síntomas y signos	5
1.3. Métodos de control para la podredumbre gris en viñedo	6
1.3.1. Control cultural de <i>B. cinerea</i>	6
1.3.2. Control químico de <i>B. cinerea</i>	7
1.3.3. Control biológico de <i>B. cinerea</i>	9
1.3.3.1 Modos de acción de los agentes de biocontrol	10
1.3.4. Manejo integrado de enfermedades	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. General	13
2.2. Específicos	13
3. METODOLOGÍA	14
3.1. Materiales	14
3.1.1. Material biológico	14
3.1.2. Reactivos	15
3.2. Métodos	15
3.2.1. Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	15
3.2.1.1. Preparación de inóculos	15
3.2.1.2. Ensayo de confrontación dual	16

3.2.1.3. Diseño del experimento	16
3.2.1.4 Análisis estadístico	17
3.2.2. Ensayos de biocontrol <i>in vivo</i> en uva de vino	17
3.2.2.1. Preparación de inóculos	17
3.2.2.2. Preparación de los frutos	17
3.2.2.3. Coinoculación de cepas de biocontrol y <i>B. cinerea</i> en uva de vino	18
3.2.2.4. Diseño del experimento	18
3.2.2.5. Análisis estadístico	18
3.2.3. Ensayos de biocontrol <i>in vivo</i> en uva de mesa	19
3.2.3.1. Preparación de inóculos	19
3.2.3.2. Determinación de °Brix y acidez titulable en los frutos	19
3.2.3.3. Coinoculación de cepas de biocontrol y <i>B. cinerea</i> en uva de mesa	19
3.2.3.4. Diseño del experimento	20
3.2.4. Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas.	20
3.2.4.1. Preparación de los agentes de biocontrol y soluciones de fungicidas.	21
3.2.4.2. Ensayos de halo de inhibición	21
3.2.4.3. Diseño del experimento	22
3.2.4.4. Análisis estadísticos	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	23
4.2 Características químicas de las bayas	25
4.3 Ensayos de biocontrol <i>in vivo</i> en uva de vino	25
4.4 Ensayos de biocontrol <i>in vivo</i> en uva de mesa	27
4.4.1 Coinoculación <i>B. cinerea</i> -AB en uva ‘Sugraone’	27
4.4.2 Coinoculación <i>B. cinerea</i> -AB en uva ‘Sweet celebration’	29
4.5 Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas	29

5. DISCUSION	31
5.1 Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i>	31
5.2 Ensayos de biocontrol <i>in vivo</i> en uva de vino y de mesa	33
5.3 Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas	36
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA	39

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i> .	2
2. Características generales de fungicidas químicos comúnmente empleados para el control de <i>B. cinerea</i> .	8
3. Agentes de biocontrol y cepas de <i>B. cinerea</i> usadas en los ensayos. Revisa la página de esta figura	14
4. Número de repeticiones (n) para los ensayos en uva de mesa.	20
5. Fungicidas y concentraciones empleadas en el ensayo de resistencia a fungicidas.	21
6. Inhibición del crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> en confrontación con los agentes de biocontrol.	23
7. Características químicas de las bayas.	25
8. Porcentaje de incidencia (PI) de <i>B. cinerea</i> en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con <i>M. pulcherrima</i> NB9.	25
9. Porcentaje de incidencia de <i>B. cinerea</i> en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12.	26
10. Porcentaje de incidencia de <i>B. cinerea</i> en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con <i>N. diffluens</i> FLL17.	26
11. Capacidad de biocontrol a <i>B. cinerea in vivo</i> en uva cv. 'Sugraone'.	28
12. Capacidad de biocontrol a <i>B. cinerea in vivo</i> en uva cv. 'Sweet celebration'.	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Micrografías <i>B. cinerea</i> .	3
2. Síntomas de podredumbre gris en uva de mesa cv. 'Thompson Seedless'.	5
3. Métodos de control de <i>B. cinerea</i> en viñedo y factores que afectan su efectividad en campo.	7
4. Crecimiento de las cepas de <i>B. cinera in vitro</i> bajo los distintos tratamientos.	24
5. Incidencia de <i>B. cinerea</i> en uva cv. 'Merlot' bajo los distintos tratamientos.	27
6. Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en uva 'Sugraone' bajo los distintos tratamientos.	28
7. Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en uva 'Sweet celebration' bajo los distintos tratamientos.	29
8. Halos de inhibición a <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12 causados por los fungicidas.	30
9. Halos de inhibición de <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12 bajo distintos tratamientos.	30

## RESUMEN

En Querétaro la industria vinícola ha tomado relevancia en los últimos años, no sólo por la importancia debida a la producción de vino, sino también por el desarrollo del enoturismo. Durante su cultivo, la vid está expuesta a enfermedades que pueden afectar la producción y la calidad del fruto, tal es el caso de la podredumbre gris causada por el hongo *Botrytis cinerea* el cual afecta hojas, tallos y frutos, siendo en este último órgano donde genera mayores daños. Se ha reportado que *B. cinerea* ha desarrollado resistencia a los fungicidas comúnmente empleados para la prevención y tratamiento de esta enfermedad, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas, como el control biológico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antagónica de tres cepas: *Bacillus methylotrophicus* FR4B12, *Metschnikowia pulcherrima* NB9 y *Naganishia diffluens* FLL17 contra *B. cinerea* en ensayos de cultivo dual *in vitro* y en ensayos de control de infección de frutos de uva de vino y de mesa. Adicionalmente fue evaluada la susceptibilidad de las cepas de biocontrol a los fungicidas (Benomilo, Oxicloruro de cobre y azufre elemental) comúnmente empleados para el control de *B. cinerea* en viñedo. Los resultados mostraron que *B. methylotrophicus* FR4B12 inhibió entre 29.6 y 62.4 % el crecimiento de las cepas de *B. cinerea* *in vitro*, en tanto que en los ensayos en fruto cv. 'Merlot', fue mínima la disminución de la incidencia (10.2 %), mientras que en uva de mesa 'Sugraone' y 'Sweet celebration' inhibió el crecimiento entre 88.1 y 100 %. Por su parte *N. diffluens* FLL17 inhibió al patógeno *in vitro* entre 29.8 y 39.9%, e *in vivo* por el contrario, favoreció el desarrollo del hongo en las tres variedades de uva. Finalmente, *M. pulcherrima* NB9 inhibió *in vitro* entre 16.2 y 31.6 %, en tanto que en uva 'Merlot' disminuyó la incidencia hasta en 56.9 % y en uva de mesa 'Sugraone' y 'Sweet celebration' inhibió el crecimiento entre 55.6 y 100%. *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 no mostraron susceptibilidad *in vitro* a las concentraciones de los fungicidas Benomilo (5.6 g L<sup>-1</sup>) y Oxicloruro de Cobre (32 g L<sup>-1</sup>) empleadas en campo para el control de *B. cinerea*. Se concluye que *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 muestran potencial para ser utilizadas como agentes de biocontrol de *B. cinerea* en uva.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. El cultivo de la vid**

En los últimos 30 años el cultivo de la vid ha cobrado mayor importancia incrementándose la superficie de cultivo y su valor económico (Daane y col., 2018). De acuerdo a la FAO, en el 2019 se dedicaron 6.93 millones de hectáreas en el mundo al cultivo de la vid, de las cuales se obtuvieron 77.14 millones de toneladas de fruto (FAO, 2019). El crecimiento en superficie y producción de este cultivo está relacionado a factores como el aumento del comercio internacional, la mejora de los ingresos mundiales, el procesamiento y la utilización de subproductos, la innovación tecnológica (en la producción, el almacenamiento y el transporte) y una mayor conciencia de los beneficios a la salud de los alimentos ricos en antioxidantes como las uvas (Venkitasamy y col., 2019). El fruto es comercializado para consumo en fresco y para la elaboración de productos procesados como vino, mermelada, jugo, gelatina, uvas secas, vinagre, extracto y aceite de semilla, lo que lo convierte en el frutal con el mayor valor de producción en el mundo (FAO-OVID, 2016).

En México, en 2020, el cultivo de la uva para consumo en fresco e industrial tuvo una producción de 470,359 toneladas proveniente de 36,620 hectáreas cosechadas (SIAP, 2020), siendo los principales estados productores de uva de mesa Sonora, Zacatecas, y Aguascalientes; y de uva de vino Zacatecas, Baja California y Sonora (SIAP, 2019).

#### **1.1.1. El cultivo de la vid en Querétaro**

En el estado de Querétaro se produce uva para vinificación en dos regiones, la primera es en el Valle de San Juan del Río, y la segunda se encuentra en los municipios de Tequisquiapan y Ezequiel Montes (de la Cruz-de Aquino y col., 2012).

En 2020, el estado tuvo una producción de 2,848 toneladas de uva industrial destinadas a vinificación, lo que lo posiciona como uno de los seis principales estados vinícolas del país (SIAP, 2019; SIAP, 2020). Además de la producción de vino, la vitivinicultura queretana también se enfoca en el enoturismo, concepto que se refiere a recorrer una región vitivinícola y conocer la

oferta, desde la recolección de la uva hasta el embotellamiento y degustación (Parrodi, 2017). En Querétaro, en 2018, el enoturismo tuvo un incremento del 10 % con respecto al año anterior siendo una de las principales estrategias turísticas del estado (Estrella, 2018).

## 1.2. Podredumbre gris en la vid

El cultivo de la vid en regiones de clima templado húmedo se ve afectado por la podredumbre gris causada por el hongo *Botrytis cinerea*, la cual es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo durante los meses de primavera y verano, ya que afecta la producción y calidad del fruto y de los vinos (Latorre y col., 2015).

### 1.2.1. Biología de *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* es un hongo patógeno ubicuo, necrotrófico, heteroploide y heterotálico, que tiene capacidad de infectar más de 200 especies de plantas cultivadas en el mundo (Beever y Weeds, 2007; Williamson y col., 2007). En el Cuadro 1 se describe su clasificación taxonómica.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo *B. cinerea* (Williamson y col., 2007).

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Genero	<i>Botryotinia</i>

En medio de cultivo microbiológico agar papa dextrosa, desarrolla colonias de color blanco o gris (Figura 1A), el micelio se presenta filamentososo, ramificado, septado, hialino y con paredes celulares prominentes (Latorre y col., 2015). La mayoría de los aislados producen abundantes conidios multinucleados (tres a seis núcleos) (macroconidios) que son unicelulares, hialinos o ligeramente coloreados, lisos, ovoides o elipsoides, y miden  $10-12 \times 8-10 \mu\text{m}$ ; estos se producen en esterigmas cortos en las puntas hinchadas de conidióforos aéreos, libres y ramificados (Figura 1B, C) (Latorre y col., 2015).

*B. cinerea* produce esclerocios en condiciones desfavorables *in vitro* y en planta, los cuales son de color negro, melanizados, alargados o esféricos y miden de 3 a 5 mm de longitud (Latorre y col., 2015), después de un proceso sexual originan apotecios (Figura 1D) que son la estructura de supervivencia de mayor importancia en campo (Holz y col., 2007). Las clamidiosporas, células hialinas de forma y tamaño variable originadas a partir de micelio, también sirven como estructuras de supervivencia permitiendo que el hongo se sobreponga a periodos cortos desfavorables en la superficie de la planta (Holz y col., 2007).

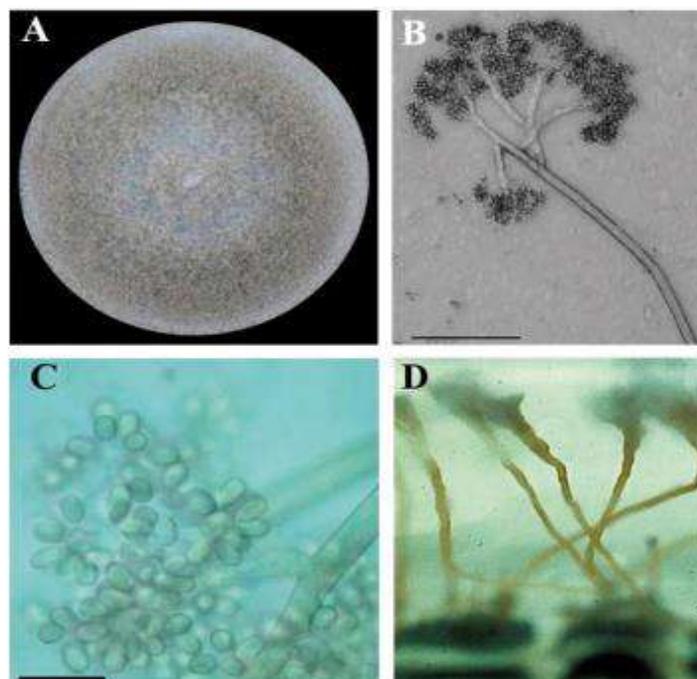


Figura 1. Micrografías *Botrytis cinerea*. A. Morfología de la colonia en agar papa dextrosa. B. Conidióforo, barra =  $100 \mu\text{m}$ . C. Conidios, barra =  $10 \mu\text{m}$ . D. Apotecios (Latorre y col., 2015).

### 1.2.2. Fuentes de inóculo e infección

Las fuentes de inóculo primario de *B. cinerea* pueden ser restos de poda, racimos y peciolo de hojas senescentes, cultivos vecinos y algunas plantas silvestres ya que el micelio, esporas y esclerocios del hongo son capaces de sobrevivir en estos medios (Mundy y col., 2012),

La infección por el hongo ocurre en dos etapas; la primera de ellas, en condiciones de humedad y temperaturas templadas, la cual consiste en la deposición, hidratación, fijación a la superficie del huésped y consecuente germinación de los conidios, formándose un tubo germinal único ramificado con un apresorio en el extremo distal; este apresorio dará lugar a la segunda etapa de la infección, permitiendo la penetración activa a la superficie del huésped mediante hifas penetrantes y la liberación de enzimas (Latorre y col., 2015), sin embargo, la penetración también puede ser pasiva través de estructuras propias de la planta como estomas y lenticelas (Elmer y Michailides, 2007), o bien a través de heridas (Holz y col., 2007).

*B. cinerea* tiene la capacidad también de generar infecciones latentes al penetrar en órganos como estigmas, estilos o estambres durante la floración (McClellan y Hewitt, 1973), que terminan manifestándose en la baya en el periodo de precosecha o poscosecha (Elmer y Michailides, 2007; Zoffoli y col. 2009).

### 1.2.3. Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad

La predisposición de la planta a ser infectada por el hongo está influenciada por factores genéticos (características fisiológicas y anatómicas), físicos (insectos, pájaros, caracoles, lluvia, granizo, etc.), agronómicos (manejo del área foliar, raleo y aclareo de racimos, poda de invierno y fertilización) y ambientales (condiciones climáticas) ya que de éstos depende la susceptibilidad al desarrollo del patógeno pudiendo potenciar la intensidad del daño (Latorre y col., 2015). Las condiciones climáticas que favorecen la incidencia y severidad de la infección por *B. cinerea* en viñedo son un potencial de evapotranspiración entre 0.05 y 0.25 g h<sup>-1</sup> de agua, humedad relativa (HR) > 90% y temperaturas entre 20 y 25 °C

(Latorre y col., 2015). El conocimiento y estudio de todos estos factores es importante para poder establecer estrategias de control apropiadas y efectivas.

Se ha visto que la susceptibilidad a la infección en la baya es altamente variable en función del cultivar; siendo menos susceptibles aquellas variedades cuyas bayas tengan epidermis más gruesa, mayor contenido de ceras y menor cantidad de lenticelas, así como una menor compactación del racimo (Calvo-Garrido, 2013).

#### 1.2.4. Síntomas y signos

En la planta la enfermedad se manifiesta en hojas, yemas, brotes y frutos, siendo estos últimos el órgano más afectado (Holz y col., 2003). Al ser infectada por el hongo, la baya comienza a presentar una coloración marrón rojiza (Figura 2A) inicialmente en el extremo del pedicelo y que avanza hacia el final del estilo, cuando se inicia la madurez y hay condiciones de humedad, pueden presentarse pequeñas manchas necróticas redondas de color marrón rojizo de aproximadamente 0,5 mm de diámetro (Latorre y col., 2015). A medida que la infección continua, la epidermis del fruto se desprende, produciéndose el rompimiento de la baya y la descomposición suave y acuosa de la pulpa, lo que favorece la diseminación del hongo a bayas vecinas (Figura 2B); por último, las bayas infectadas se deshidratan y se marchitan (Latorre y col., 2015)

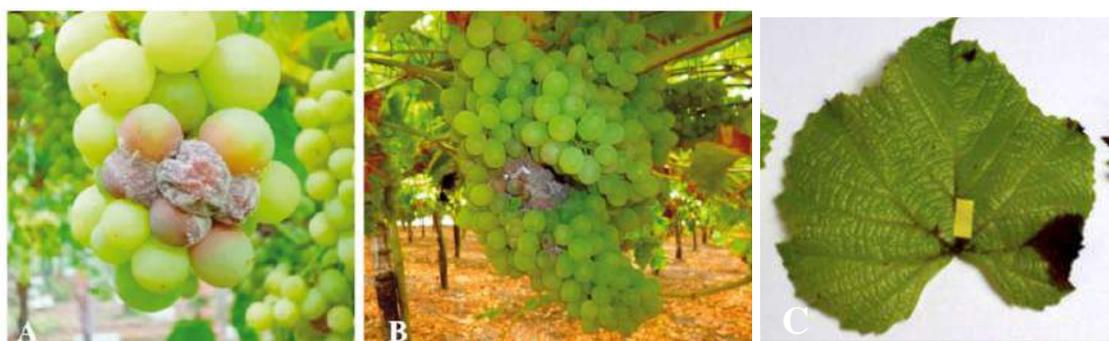


Figura 2. Síntomas de podredumbre gris en uva de mesa cv. 'Thompson Seedless'. A. Coloración marrón rojizo y deshidratación en baya ante la presencia de podredumbre gris. B. Grupo de bayas infectadas (Latorre y col., 2015), C. Daño por *B. cinera* en hoja de vid (Naegele, 2018).

En hojas, el hongo comienza a manifestarse desde el inicio de la temporada de foliación, observándose manchas necróticas marrones alrededor de las nervaduras, y lesiones marrones en forma de "U o V" en los márgenes de la lámina foliar (Figura 2C). Si hay condiciones de humedad, el hongo comienza a esporular presentándose en la parte inferior de las hojas enfermas una coloración grisácea. La infección en las ramas puede ocurrir incluso si éstas se encuentran parcialmente lignificadas, presentándose el desarrollo de lesiones necróticas blanquecinas con esclerocios grandes, irregulares y negros (Latorre y col., 2015).

### 1.3. Métodos de control para la podredumbre gris en viñedo.

Estrategias de control químico, cultural, genético (cultivares tolerantes) y biológico son utilizadas para el control de la podredumbre gris en uva (Elmer y Michailides, 2007; Jacometti y col., 2010). En la Figura 3 se resumen gráficamente algunas de estas estrategias y su efecto respecto a los factores que favorecen la enfermedad.

La Figura 3 muestra como los factores externos, que estimulan las defensas de la planta o producen daño en la baya, se interrelacionan con factores propios de la vid (resistencia y vigor), determinando la susceptibilidad de la planta a la infección. Es mediante técnicas culturales (con acciones orientadas a reducir la humedad del dosel y disminuir fuentes de inóculo) y el empleo de fungicidas o biofungicidas como puede controlarse la enfermedad en viñedo.

#### 1.3.1 Control cultural de *B. cinerea*

Los métodos culturales para controlar la podredumbre gris incluyen la reducción de la densidad de plantación, poda efectiva y eficiente control de malezas para crear un dosel abierto y bien ventilado; eliminación de material vegetal muerto para disminuir la concentración del inóculo en el viñedo; uso de acolchado en suelo para enterrar la hojarasca ayudando a la descomposición microbiana del inóculo (Williamson y col., 2007); y fertirrigación con niveles reducidos de nitrógeno y elevados de potasio y calcio (Elad, 2015).

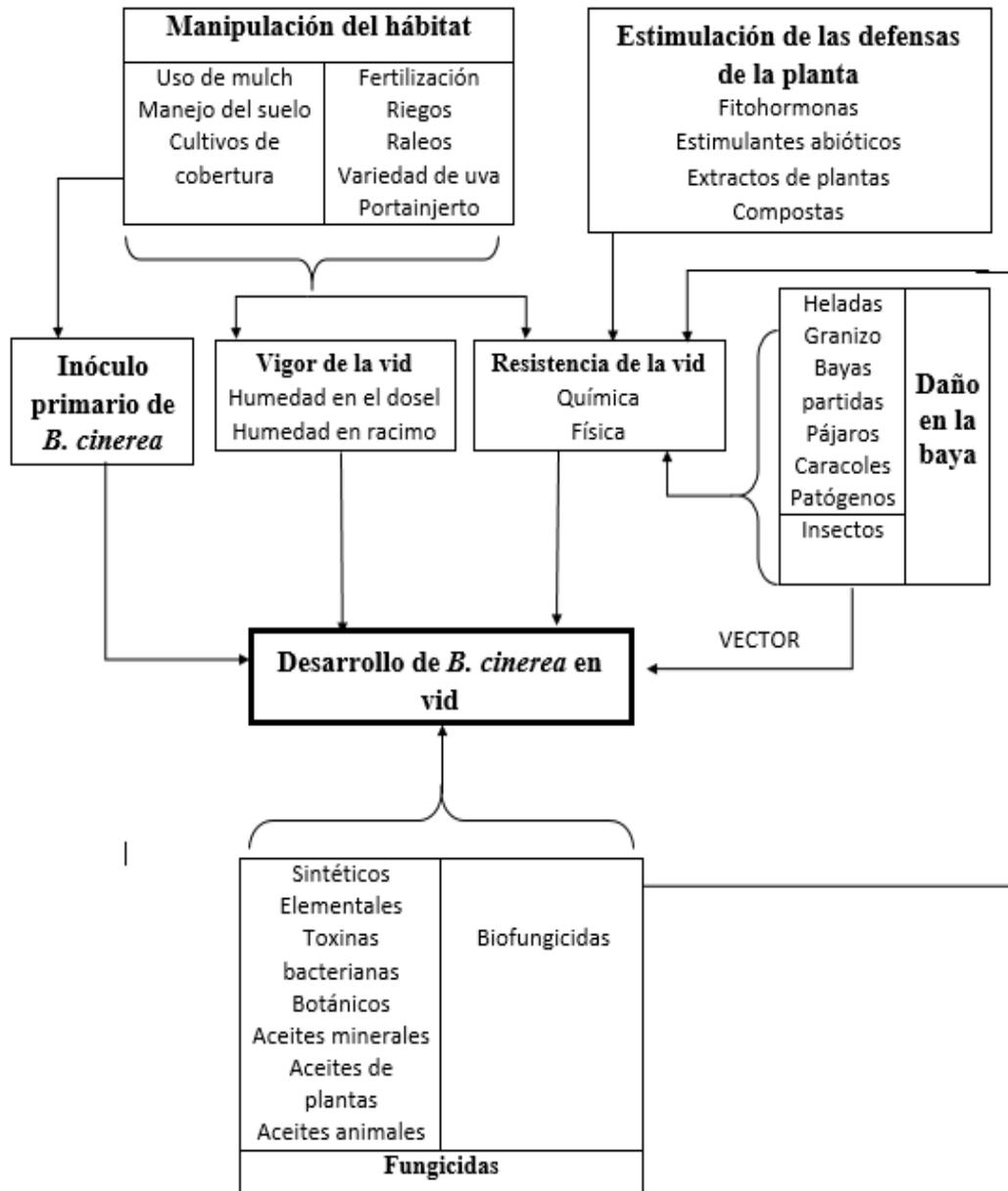


Figura 3. Métodos de control de *B. cinerea* en viñedo y factores que afectan su efectividad en campo (Jacometti y col., 2010).

### 1.3.2. Control químico de *B. cinerea*.

En la actualidad, el principal método de protección del cultivo ante la podredumbre gris es el control químico, que consiste en la aplicación de fungicidas sintéticos (Fillinger y Walker, 2015). Estos pueden tener actividad en un solo punto de una ruta metabólica, interfiriendo sobre una función celular esencial específica del patógeno, o bien pueden mostrar actividad en múltiples puntos, dirigiéndose a más de una función celular (Fillinger y Walker, 2015). En el mercado se

encuentran al menos cinco grupos de fungicidas que actúan contra *Botrytis spp.* en distintas funciones celulares: 1) citoesqueleto (microtúbulos); 2) respiración mitocondrial y síntesis de ATP; 3) biosíntesis de ergosterol; 4) biosíntesis de proteínas o aminoácidos y 5) transducción de señalamiento celular (Fillinger y Walker, 2015).

Hoy en día, en el mercado existen distintos compuestos químicos que son utilizados en campo para el control de *B. cinerea* en uva de mesa y de vino, de acuerdo con lo establecido por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), los cuales se listan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características generales de fungicidas químicos comúnmente empleados para el control de *B. cinerea*.

<b>Grupo químico</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Propiedades/ Modo de Acción</b>	<b>Riesgo de desarrollo de resistencia</b>
Anilino pirimidinas	Cyprodinil	Sistémico. Inhibe la germinación de las esporas, la penetración de tubos germinativos y el crecimiento del micelio	Alto
Benzimidazoles	Benomilo	Sistémico. Afecta la reproducción celular	Alto
	Carbendazim	Amplio espectro, sistémico. Afecta la reproducción celular.	Alto
Fenilpirroles	Fludioxonil	Sistémico. Inhibe la germinación de esporas la elongación del tubo germinal y el crecimiento del micelio.	Alto
Ftalamidas	Captan	Amplio espectro, sistémico. Inhibe la geminación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo del micelio.	Alto

(Jacometti y col., 2010; Vázquez-Lara, 2018; COFEPRIS, 2019).

Sin embargo, debido a la creciente necesidad para reducir el impacto ambiental y limitar los residuos de agroquímicos en los alimentos, se ha restringido cada vez más la aplicación de fungicidas sintéticos (Fenner y col., 2013; Verger y Boobis, 2013). Además, características propias de *B. cinerea* como su ciclo de vida, su forma de reproducción y su gran variabilidad genética lo hacen muy susceptible a desarrollar resistencia a fungicidas de síntesis (Zhao y col., 2010). El principal mecanismo de resistencia es el desarrollo de mutaciones en los genes que codifican para los sitios objetivos de las proteínas, impidiendo el enlace con los fungicidas, generando así la resistencia a numerosos compuestos químicos (Panbianco y col., 2015).

La susceptibilidad de *B. cinerea* a distintos fungicidas fue probada por Vázquez-Lara (2018) utilizando aislados provenientes de uva de vino y de mesa contra los fungicidas más empleados en viñedo en nuestro país, encontrándose que: “los aislados de *B. cinerea* presentaron una susceptibilidad del 63.4 % y 12.3 % ante Benomilo, 12.2 % y 7.9 % a Captan, 58.5 % y 58.4 % a Cyprodinil + Fludioxonil, 24.3 % y 29.2 % a Oxiclورو de Cobre, 58.5 % y 11.2 % a Pyraclostrobin + Boscalid y 85.3 % y 87.6 % a Iprodiona, para los aislados provenientes de uva de vinificación y uva de mesa, respectivamente”.

### 1.3.3. Control biológico de *B. cinerea*

El control biológico de las enfermedades de las plantas se define como la supresión de las poblaciones de fitopatógenos por parte de organismos vivos (Heimpel y Mills, 2017). Microorganismos como hongos, levaduras y bacterias pueden actuar como antagonistas de agentes causales de enfermedades en plantas, lo que los haría aptos para ser utilizados como agentes de control biológico, los cuales tendrían un menor impacto ambiental y a la salud humana en comparación con fungicidas de síntesis (Jacometti y col., 2010).

Producir un agente de control biológico que sea eficaz en el campo y pueda ser comercializado implica un proceso largo y complicado. Inicialmente se identifican y seleccionan aislados de microorganismos que muestren potencial para el control *in vitro* del fitopatógeno de interés y se estudia su ecología, fisiología y modo de acción (Köhl y col., 2019; Serrano y Galindo, 2007); estos

aislados son susceptibles de ser encontrados dentro de la ecología microbiana *in situ* donde también se desarrolla el agente causal de la enfermedad (Serrano y Galindo, 2007). Posteriormente, se llevan a cabo estudios *in vivo* y se desarrolla un sistema de producción y formulación para realizar estudios en invernadero y en campo, primero a nivel piloto y luego a escala semi-comercial y comercial (Galindo y col., 2015). Por último, si el producto es viable en términos técnicos y económicos, se registra ante las autoridades competentes para garantizar su efectividad biológica e inocuidad y éste podrá ser producido a nivel industrial y comercializarse (Galindo y col., 2015).

Se tienen referencias de varias especies microbianas antagonistas a *B. cinerea* en la uva, a partir de las cuales se han formulado biofungicidas comerciales; dentro de estas especies se encuentran hongos u oomicetos como: *Ampelomyces quisqualis*; *Gliocladium catenulatum*; *Pythium oligandrum*; *Trichoderma atroviride*; *T. harzianum*; *T. polysporum*; *T. viride*; *T. virens* y *Ulocladium oudemansii*; también especies de levaduras como: *Candida oleophila*; *C. saitoana*; *Cryptococcus albidus*; *Metschnikowia fructicola*; *Saccharomyces chevalieri* y *Aureobasidium pullulans*; y especies bacterianas como: *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas fluorescens*; *P. syringae* y *Streptomyces griseoviridis* (Elad y Stewart, 2007; Jacometti y col., 2010; Nicot y col., 2015).

#### 1.3.3.1 Modos de acción de los agentes de biocontrol

Existen diversos modos de acción, mediante los cuales los agentes de control biológico microbiano pueden proteger a los cultivos del daño ocasionado por fitopatógenos.

Uno de los modos de acción es la inducción o aumento de la resistencia a infecciones en los tejidos vegetales sin que haya interacción directa del antagonista con el patógeno, ya que mediante patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), el agente de biocontrol genera en la planta una respuesta sistémica inducida (ISR) (Conrath y col., 2015). Otra interacción indirecta con los patógenos es la competencia por los nutrientes y espacio; ya que la germinación y el crecimiento de patógenos dependen de la absorción de nutrientes. Los agentes de biocontrol, también pueden ejercer una inhibición

mediante actividades enzimáticas y otros modos de acción como la producción de sideróforos que les permiten competir por la captación de nutrientes limitantes (Spadaro y Droby, 2016).

Los agentes de biocontrol también pueden interactuar directamente con el patógeno mediante hiperparasitismo, modo por el cual invaden y degradan el micelio, las esporas y las estructuras en reposo de los patógenos fúngicos y las células de los patógenos bacterianos (Ghorbanpour y col., 2018). La producción de metabolitos secundarios con capacidad antibiótica es otro modo de acción directo, estos pertenecen a grupos heterogéneos de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son perjudiciales para el crecimiento o las actividades metabólicas de otros microorganismos (Raaijmakers y Mazzola, 2012).

En los antagonistas de *B. cinerea*, los modos de acción que se han identificado incluyen: a) La reducción de la concentración de nutrientes disponibles para el patógeno, b) La modificación de las propiedades de la superficie de la planta, c) La inhibición por compuestos microbianos, d) El hiperparasitismo, e) La interferencia con los procesos de patogenicidad, f) La reducción en la producción de inóculo y g) La resistencia sistémica inducida (Nicot y col., 2015).

#### 1.3.4. Manejo integrado de enfermedades

Para mantenerse por debajo del umbral de tolerancia de podredumbre gris a la cosecha de la uva (menos de 0.5 % y 2 % de bayas infectadas para uvas de mesa y de vino, respectivamente), la única estrategia realmente efectiva es el manejo integrado de la enfermedad (Latorre y col., 2015).

El manejo integrado de enfermedades es un sistema de regulación de las poblaciones de patógenos que emplea diversas estrategias y métodos de forma compatible, a fin de mantener las poblaciones de los agentes nocivos por debajo del nivel económico de daños (Ciancio y Mukerji, 2007), una de las estrategias es la implementación de agentes de control biológico apropiados a la temperatura y humedad en el cultivo (Williamson y col., 2007). Recientemente el control biológico y la búsqueda de cultivares resistentes han tomado cada vez más

relevancia en sistemas de producción convencionales y orgánicos (Montealegre y Pérez, 2014; Rubio y col., 2014).

La podredumbre gris, causada por *B. cinerea*, ha sido bastante estudiada en el cultivo de la vid con respecto a la biología de la enfermedad y métodos de control químico; existen también reportes sobre cepas microbianas con potencial de biocontrol en distintos países (Parafatti y col., 2015; Chen y col., 2019). Es importante seguir este frente de investigación con organismos propios de las regiones de producción de nuestro país que puedan ofrecer alternativas de control a los productores nacionales.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Evaluar la capacidad antagónica de bacterias y levaduras aisladas de ecosistemas agrícolas, para el control de la podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* en uva.

### 2.2. Específicos

- Determinar la capacidad de inhibición *in vitro* de las levaduras *Naganishia diffluens* y *Metschnikowia pulcherrima* y la bacteria *Bacillus methylotrophicus* contra cepas de *B. cinerea* provenientes de viñedos establecidos en el estado de Querétaro.
- Evaluar mediante ensayos *in vivo* la actividad inhibitoria de las cepas microbianas para reducir la incidencia y severidad de la podredumbre causada por *B. cinerea* en uva de vinificación y uva de mesa.
- Determinar *in vitro* la resistencia de las cepas microbianas de biocontrol a pesticidas empleados en campo para el control de *B. cinerea*.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material biológico

Los agentes de control biológico y cepas de *B. cinerea* que se utilizaron en el presente estudio se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Agentes de biocontrol y cepas de *B. cinerea* usadas en los ensayos.

	<b>Cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen y año de aislamiento</b>
Agente de biocontrol (AB)	FR4B12	Bacteria: <i>Bacillus methylotrophicus</i>	Manzana de Huerto experimental, Amealco, Qro., 2017.
	FLL17	Levadura: <i>Naganishia diffluens</i>	Manzana de Huerto experimental, Amealco, Qro., 2017.
	NB9	Levadura: <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Uva de viñedo "El barreno", San Juan del Río, Qro., 2012.
Hongos fitopatógenos	132	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva de viñedo "Bodega De Cote", Ezequiel Montes, Qro., 2015.
	137	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva de viñedo "Bodega De Cote", Ezequiel Montes, Qro., 2015.
	152	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva de centro comercial, Santiago de Queretaro, Qro., 2015.
	155	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva de viñedo "El Rosario", El Marques, Qro., 2016.

Los microorganismos fueron identificados mediante la secuenciación de marcadores moleculares, la subunidad 16S ribosomal fue utilizada para la bacteria (mediante los oligonucleótidos: 27F/1492R) y el ITS para las levaduras y

hongos (mediante los oligonucleotidos: ITS1F/ ITS4R). La levadura NB9 y el hongo 137 fueron secuenciados por Dra. Lourdes Soto Morales en el año 2017, las cepas FR4B12 y FLL17 fueron secuenciadas por la M. en C. Crystabel López Gonzales en 2018, y las cepas 152, 155 y 132 fueron enviadas a secuenciación por la M. en C. Yara Suhan Juárez Campusano, en el año 2019 y 2020.

Frutos de uva:

- Uva de mesa verde sin semilla cv 'Sugraone'
- Uva de mesa roja sin semilla cv 'Sweet celebration'
- Uva tinta para vinificación cv 'Merlot'

### 3.1.2. Reactivos y medios de cultivo

Medio NYDA (Composición: caldo nutritivo 8 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, glucosa 10 g L<sup>-1</sup> y agar 20 g L<sup>-1</sup>) (Sandoval-Chavez y col., 2011).

Medio NYDB (Composición: caldo nutritivo 8 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, glucosa 10 g L<sup>-1</sup>) (Sandoval-Chavez y col., 2011).

Solución salina (0.85% NaCl).

Etanol al 90 %

Etanol al 70 %

Hipoclorito al 5 %

Fungicidas:

1. Benomyl 50® (Benomilo)
2. Cupravit® (Oxicloruro de cobre)
3. Azufre 720® (Azufre elemental)

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Ensayos de antagonismo *in vitro*

#### 3.2.1.1. Preparación de inóculos

*M. pulcherrima* NB9, *N. diffluens* FLL17 y *B. methylotrophicus* FR4B12 se inocularon en tubos con medio NYDB y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente con agitación constante (150 rpm). Transcurrido el tiempo se tomó 1 mL del cultivo en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min.

La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada estéril y se ajustó la concentración de cada cepa a  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  mediante cuenta en cámara de Neubauer.

Los inóculos de *B. cinerea* consistieron en discos de agar de 5 mm de diámetro colonizados por el hongo, los cuales se obtuvieron del margen de una colonia joven crecida en medio NYDA.

### 3.2.1.2. Ensayo de confrontación dual

Se siguió el método de confrontación en placa descrito por Ge y col. (2016) para detectar antagonismo *in vitro* de las cepas microbianas a los aislados 132, 137, 152 y 155 de *B. cinerea*. Al centro de una placa (caja de Petri de 90 mm) con medio NYDA se inoculó un disco (5 mm de diámetro) de micelio del hongo; y en dos extremos opuestos de la caja, a 1 cm del borde, se inoculó una asada de 3 cm de longitud del agente de biocontrol, las cepas *M. pulcherrima* NB9 y *N. diffluens* FLL17 se inocularon simultáneamente con el hongo, en tanto que *B. methylotrophicus* FR4B12 se inoculó 48 h después debido al rápido desarrollo en placa de esta cepa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 9 días, y se determinó el crecimiento del hongo midiendo el radio de la colonia con un vernier digital. Como control se inoculó únicamente el hongo en la placa.

La inhibición se calculó como “porcentaje de inhibición de crecimiento radial”:

$$PICR = 100 - \left( \frac{R_{exp} \times 100}{R_c} \right)$$

Dónde:  $R_c$  = Radio del micelio fúngico alcanzado sin agente de biocontrol y  $R_{exp}$  = Radio del micelio fúngico alcanzado en confrontación con el agente de biocontrol.

### 3.2.1.3 Diseño del experimento.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos (FR4B12, FLL17 y NB9) y tres repeticiones, siendo la unidad experimental una placa. La variable evaluada fue el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR).

#### 3.2.1.4 Análisis estadísticos

El PICR se transformó a grados angulares mediante la fórmula  $\arcsin \sqrt{(\text{PICR}/100)}$  para normalizar los datos

Para cada cepa de *B. cinerea* se analizaron los datos para identificar diferencias significativas entre los tratamientos. Se determinó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, se hicieron Análisis de Varianza de Fisher y Prueba de Medias de Tukey mediante el programa R i386 3.6.2.

#### 3.2.2. Ensayos de biocontrol *in vivo* en uva de vino

##### 3.2.2.1. Preparación de inóculos.

Siguiendo la metodología descrita por Saravanakumar y col. (2008) con modificaciones, se prepararon suspensiones de esporas de los aislados 137, 152 y 155 de *B. cinerea*. Los hongos se inocularon en cajas de Petri con medio NYDA y se incubaron hasta esporulación por 14 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se cosecharon las esporas de las cajas petri y se suspendieron en agua destilada estéril, la solución se filtró mediante gasas estériles para eliminar el micelio y se ajustó la concentración a  $5 \times 10^3$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ .

Para la preparación de inóculos de los agentes de biocontrol se siguió la metodología descrita por Sandoval-Chávez y col. (2011) con modificaciones. Las cepas se inocularon en medio NYDB y se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente con agitación constante (200 rpm). Del cultivo se tomó 1 mL en un tubo para microcentrífuga y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, la pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada estéril y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

##### 3.2.2.2. Preparación de los frutos.

Frutos de uvas cv. 'Merlot' para vinificación, fueron separadas del racimo sin retirar el pedúnculo, lavadas y desinfectadas (5 min en etanol 90 %, 1 min en hipoclorito de sodio 5 %, 1 min en etanol 70 % y 2 lavados con agua estéril). Una vez desinfectadas se dejaron secar en campana de flujo y en cada baya se realizó una herida (orificio de 3 x 3 x 3 mm) con la ayuda de un perforador estéril. Las

bayas previamente perforadas se colocaron en una cámara húmeda (recipiente de plástico, lavado y esterilizado con hipoclorito de sodio 5 %, etanol 70% y 20 min de luz UV, con dos capas de papel filtro húmedo estéril en la base).

Adicionalmente, se determinó a una muestra de bayas, los sólidos solubles totales (°Bx) mediante refractómetro digital y la acidez total titulable (g ácido tartárico L<sup>-1</sup>) mediante el método OIV-MA-AS313-01 descrito por la OIV (2018).

### 3.2.2.3. Coinoculación de cepas de biocontrol y *B. cinerea* en uva de vino.

Para la coinoculación se siguió el método descrito por Sandoval-Chávez y col. (2011) con modificaciones. Las bayas en la cámara húmeda se inocularon con 10 µL de la solución del agente de biocontrol (100 000 células) y se dejaron secar en campana de flujo laminar por 20 min, posteriormente se inocularon 10 µL de la solución de la cepa de *B. cinerea* (50 esporas). Se consideró un control positivo para cada cepa del hongo, inoculando la baya únicamente con el patógeno, y un control negativo incubando bayas perforadas sin inóculo. La incubación se hizo a temperatura ambiente durante seis días y una vez finalizado el periodo de incubación se determinó el número de uvas infectadas por *B. cinerea* en cada tratamiento para calcular el “porcentaje de incidencia” (PI).

El PI se calculó como:

$$PI = \left( \frac{N_{exp}}{N} \right) \times 100$$

dónde: N<sub>exp</sub>= Número de uvas infectadas y N= Número de uvas total por tratamiento.

### 3.2.2.4. Diseño del experimento

Para cada cepa de *B. cinerea* se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos (coinoculación y control positivo), tres repeticiones, y como unidad experimental 10 uvas. La variable evaluada fue el porcentaje de incidencia (PI).

### 3.2.5 Análisis estadísticos

El PI se transformó a grados angulares mediante la fórmula  $\arcsin \sqrt{(PI/100)}$  para normalizar los datos.

Para cada cepa de *B. cinerea* coinoculada con el agente de biocontrol se comparó mediante T de Student con respecto al control positivo para determinar diferencias significativas, previo análisis de Shapiro-Wilk y Levene test para determinar normalidad y homocedasticidad de los datos mediante el programa R i386 3.6.2.

### 3.2.3. Ensayos de biocontrol *in vivo* en uva de mesa

Se llevaron a cabo tres ensayos:

1. Coinoculación AB- cepa 132 en uva 'Sugraone'
2. Coinoculación AB- cepa 137 en uva 'Sugraone'
3. Coinoculación AB- cepa 137 en uva 'Sweet celebration'

#### 3.2.3.1. Preparación de inóculos.

Se prepararon inóculos de los aislados 132 y 137 de *B. cinerea* y de los agentes de biocontrol *B. methylotrophicus* FR4B12, *N. diffluens* FLL17 y *M. pulcherrima* NB9, de acuerdo con los métodos descritos por Saravanakumar y col. (2008) y Sandoval-Chávez y col. (2011) respectivamente, como se describe en 3.2.2.1 Los inóculos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^4$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  para los hongos y a  $1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  para los agentes de biocontrol.

#### 3.2.3.2. Determinación de °Brix y acidez titulable en los frutos

Se siguió el mismo procedimiento descrito en 3.2.2.2 para uvas cv 'Sugraone' y 'Sweet celebration'. De igual forma a una muestra de bayas se determinaron los sólidos solubles totales (°Bx) mediante refractómetro digital y la acidez total titulable (g ácido tartárico  $\text{L}^{-1}$ ) mediante el método OIV-MA-AS313-01 descrito por la OIV (2018).

#### 3.2.3.3. Coinoculación de cepas de biocontrol y *B. cinerea* en uva de mesa.

Se siguió el método descrito por Sandoval-Chávez y col. (2011) con modificaciones. Las bayas en la cámara húmeda se inocularon con 20  $\mu\text{L}$  de la solución del agente de biocontrol (200 000 células) y se dejaron secar en campana de flujo por 20 min, posteriormente se inocularon 20  $\mu\text{L}$  de la solución de cepa de *B. cinerea* (200 esporas). Se hizo un control positivo para cada cepa del hongo,

inoculando la baya únicamente con el patógeno, y un control negativo incubando bayas perforadas sin inóculo. La incubación se hizo a temperatura ambiente durante seis a ocho días y, una vez finalizado el periodo de incubación, se midió el diámetro de la lesión ocasionada por el crecimiento de *B. cinerea* en cada uva y se calculó el “porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con la siguiente formula:

$$PICR = 100 - \left( \frac{D_{exp} \times 100}{D_c} \right)$$

Donde:  $D_c$ = Diámetro de crecimiento de *B. cinera* en uvas del control positivo y  $D_{exp}$ = Diámetro de crecimiento de *B. cinera* en la uva cuando fue coinoculada con el agente de biocontrol.

#### 3.2.3.4. Diseño del experimento

Para los tres ensayos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos (FR4B12, NB9 y FLL17), el número de repeticiones de cada experimento se detalla en el Cuadro 4, siendo la unidad experimental una baya, la variable evaluada fue el diámetro de lesión y el porcentaje de disminución del crecimiento radial (PICR).

Cuadro 4. Numero de repeticiones (n) para los ensayos en uva de mesa.

Ensayo	Número de repeticiones.
Coinoculación AB-aislado 132 en uva 'Sugraone'.	14
Coinoculación AB-aislado 137 en uva 'Sugraone'.	10
Coinoculación AB-aislado 137 en uva 'Sweet celebration'	16

#### 3.2.4. Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas.

Se evaluó la capacidad de *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 para crecer en presencia de los fungicidas empleados para el control de *Botrytis* en viñedos, ya que estas cepas fueron las que mostraron la mejor capacidad para inhibir a *B. cinerea* en fruto de uva. Se siguió la metodología de halo de inhibición descrita por Dunn y col. (2005) y Čadež y col. (2010) con modificaciones.

### 3.2.4.1. Preparación de los agentes de biocontrol y soluciones de fungicidas.

*M. pulcherrima* NB9 y *B. methylotrophicus* FR4B12 se cultivaron en medio NYDB durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se resuspendieron en agua destilada estéril y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Se prepararon soluciones de fungicidas diluyendo el producto en agua destilada estéril. Las soluciones preparadas corresponden a 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 4 y 8 veces la concentración de aplicación recomendada por el fabricante de cada fungicida para el cultivo de la vid. Los fungicidas y concentraciones probados se indican en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Fungicidas y concentraciones empleadas en el ensayo de resistencia a fungicidas.

Fungicida		Concentraciones
Nombre común	Ingrediente activo	
Cupravit®	Oxicloruro de cobre	0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 g $\text{L}^{-1}$
Azufre 720®	Azufre elemental	0.00, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2, 14.4, 28.8 g $\text{L}^{-1}$
Benomyl 50®	Benomilo	0.00, 0.0875, 0.175, 0.350, 0.700, 1.400, 2.800, 5.600 g $\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.4.2. Ensayos de halo de inhibición

En medio NYDA se inocularon por extensión con varilla de vidrio 100  $\mu\text{L}$  de la solución del agente de biocontrol  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  preparada previamente. Posteriormente se colocaron sobre el medio cinco discos de papel filtro de 6 mm de forma equidistante y sobre éstos 3  $\mu\text{L}$  de la solución correspondiente de fungicida. Las cajas fueron incubadas a 24°C durante 16 h para *B. methylotrophicus* FR4B12 y 60 h para *M. pulcherrima* NB9. El control consistió en discos con 3  $\mu\text{L}$  agua destilada.

Se calculó el halo de inhibición midiendo el diámetro del halo total (incluido el disco del filtro central) y calculando su área, posteriormente se restó el área del disco de filtro para obtener el área anular (es decir, el área del anillo definida por el borde exterior del disco hasta el límite exterior del halo). Finalmente, se calculó el  $\log_2$  del área anular para hacer las comparaciones.

#### 3.2.4.3 Diseño del experimento

El diseño experimental fue completamente al azar con 24 tratamientos. La variable de respuesta fue el  $\log_2$  el área anular del halo de inhibición, la unidad experimental fue un disco de papel filtro con cinco repeticiones.

Para cada agente de biocontrol se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 24 tratamientos y cinco repeticiones, siendo la unidad experimental un disco de papel filtro. La variable evaluada fue el  $\log_2$  el área anular del halo de inhibición.

#### 3.2.4.4. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico del experimento se determinó la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente; para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos que tuvieron efecto en el crecimiento de los agentes de biocontrol, se hizo un análisis de varianza de Fisher y prueba de medias de Tukey mediante el programa R i386 3.6.2.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ensayos de antagonismo *in vitro*.

Las tres cepas evaluadas como agentes de control biológico mostraron diferente capacidad para inhibir el crecimiento micelial de las cuatro cepas de *B. cinerea* (132, 137, 152 y 155) (Figura 4). Ante la cepa 132, *B. methylotrophicus* FR4B12 mostró la mayor capacidad de biocontrol al inhibir un 42.3 % el crecimiento del patógeno, las levaduras *N. diffluens* FLL17 y *M. pulcherrima* NB9 inhibieron estadísticamente igual el crecimiento en 33.3 y 31.6 % respectivamente. Ante la cepa 137, los tres agentes de biocontrol inhibieron estadísticamente igual el crecimiento micelial, entre 26.6 y 29.8 %, siendo estos los valores más bajos de inhibición entre las cepas de *B. cinerea*. Ante la cepa 152, nuevamente *B. methylotrophicus* FR4B12 mostró la mayor capacidad de biocontrol, al inhibir en 51.5 % el crecimiento del hongo, mientras que *N. diffluens* FLL17 y *M. pulcherrima* NB9 inhibieron estadísticamente igual 39.9 y 30.1 % respectivamente. El comportamiento fue similar ante la cepa 155, con una inhibición de 62.4 % *B. methylotrophicus* FR4B12 fue el mejor agente de biocontrol, en tanto que *N. diffluens* FLL17 y *M. pulcherrima* NB9 inhibieron estadísticamente igual el crecimiento 30.8 y 16.2 % respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Inhibición del crecimiento radial *in vitro* de *B. cinerea* en confrontación con los agentes de biocontrol.

Antagonista	PICR de <i>B. cinerea</i> (%) ± SD			
	<i>B. cinerea</i> 132	<i>B. cinerea</i> 137	<i>B. cinerea</i> 152	<i>B. cinerea</i> 155
<i>B. methylotrophicus</i> FR4B12	42.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	29.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	51.5 ± 4.1 <sup>a</sup>	62.4 ± 11.4 <sup>a</sup>
<i>N. diffluens</i> FLL17	33.3 ± 7.3 <sup>ab</sup>	29.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	39.9 ± 3.3 <sup>b</sup>	30.8 ± 2.7 <sup>ab</sup>
<i>M. pulcherrima</i> NB9	31.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	26.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	30.1 ± 5.1 <sup>b</sup>	16.2 ± 18.2 <sup>b</sup>
DSH (0.95) (Grados angulares)	6.7	2.9	6.1	25.7
CV (%)	9.27	3.54	16.11	44.78

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey, 0.05) n=3.

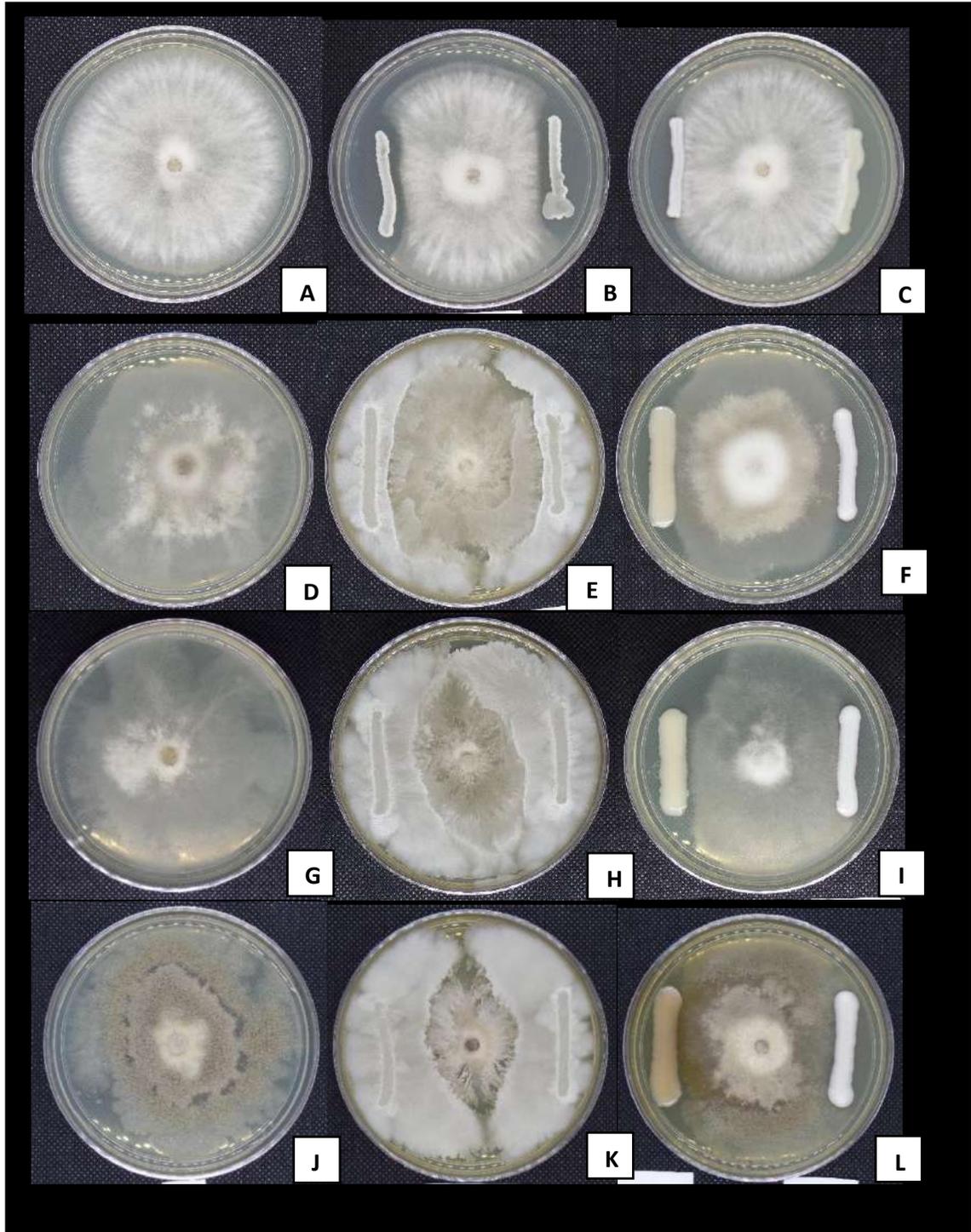


Figura 4. Crecimiento de las cepas de *B. cinera* *in vitro* bajo los distintos tratamientos. A: Control 132, B: Cocultivo 132-FR4B12, C: Cocultivo 132-FLL17 (derecha) y 132- NB9 (izquierda), D: Control 137, E: Cocultivo 137-FR4B12, F: Cocultivo 137-FLL17 (derecha) y 137- NB9 (izquierda), G: Control 152, H: Cocultivo 152-FR4B12, I: Cocultivo 152-FLL17 (derecha) y 152- NB9 (izquierda), J: Control 155, K: Cocultivo 155-FR4B12, L: Cocultivo 155-FLL17 (derecha) y 155- NB9 (izquierda).

#### 4.2 Características químicas de las bayas

En el Cuadro 7 se indica la acidez total y los sólidos solubles totales cuantificados en el lote de las bayas usadas en cada ensayo. La uva 'Sugraone' fue la que presentó menor acidez y menor concentración de SST en tanto que la uva 'Merlot' presentó la mayor acidez y la mayor concentración de SST.

Cuadro 7. Características químicas de las bayas.

Ensayo	Sólidos solubles totales (°Bx)	Acidez total (g ácido tartárico L <sup>-1</sup> )
Uva 'Merlot'	25.4	3.80
Uva 'Sweet celebration'	23.7	3.35
Uva 'Sugraone'	19.3	2.85

#### 4.3 Ensayos de biocontrol *in vivo* en uva de vino

Como se puede ver en el Cuadro 8, en uva de vino la cepa *B. cinerea* 137 tuvo un porcentaje de incidencia de 60 % en el tratamiento control; al coinocular con la cepa *M. pulcherrima* NB9 la incidencia se redujo a 6.7 % (Figura 5 J). Ante la cepa *B. cinerea* 155 que mostró incidencia del 70 % en el control, *M. pulcherrima* NB9 fue capaz de reducir la incidencia a 13.3 % (Figura 5 L), en ambos casos el control de la levadura fue estadísticamente significativo con respecto a la incidencia en el control positivo. Sin embargo, ante la cepa *B. cinerea* 152 que mostró incidencia del 50 %, la levadura redujo la incidencia a 40 % (Figura 5 K), lo cual no es significativamente diferente al control.

Cuadro 8. Porcentaje de incidencia (PI) de *B. cinerea* en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con *M. pulcherrima* NB9.

Tratamiento	PI de <i>B. cinerea</i> (%) ± SD		
	<i>B. cinerea</i> 137	<i>B. cinerea</i> 152	<i>B. cinerea</i> 155
Control	60.0 ± 26.5 <sup>a</sup>	50.0 ± 17.3 <sup>a</sup>	70.20 ± 20.0 <sup>a</sup>
<i>M. pulcherrima</i> NB9	6.7 ± 5.8 <sup>b</sup>	40.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	13.3 ± 11.5 <sup>b</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (t-Student, 0.05) n=3.

Por otro lado, la cepa *B. methylotrophicus* FR4B12 no mostró capacidad de reducir la incidencia significativamente ante ninguna de las cepas del fitopatógeno (Cuadro 9), ya que al coinocular la bacteria con la cepas de *B. cinerea* 137, 155 y 152 se observó incidencia de 56.6, 60 y 73.3 % respectivamente (Figura 5 D, E y F); incluso la incidencia fue mayor con la coinoculación de la bacteria que el control positivo de la cepa *B. cinerea* 152.

Cuadro 9. Porcentaje de incidencia de *B. cinerea* en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con *B. methylotrophicus* FR4B12.

Tratamiento	PI de <i>B. cinerea</i> (%) ± SD		
	<i>B. cinerea</i> 137	<i>B. cinerea</i> 152	<i>B. cinerea</i> 155
Control	60.0 ± 26.5 <sup>a</sup>	50.0 ± 17.3 <sup>a</sup>	70.20 ± 20.0 <sup>a</sup>
<i>B. methylotrophicus</i> FR4B12.	56.7 ± 5.8 <sup>a</sup>	73.3 ± 23.1 <sup>a</sup>	60.0 ± 17.3 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (t-Student, 0.05) n=3.

La levadura *N. diffluens* FLL17 no tuvo efecto en la disminución de la incidencia del patógeno en uva cv 'Merlot' (Cuadro 10), por el contrario, favoreció el desarrollo de *B. cinerea* en el fruto, al coinocular *N. diffluens* FLL17 con *B. cinerea* 137 la incidencia de la enfermedad alcanzó el 100 %, y al coinocular con *B. cinerea* 155 y 152 la incidencia aumento al 90% (Figura 5 G, H, I).

Cuadro 10. Porcentaje de incidencia de *B. cinerea* en uva cv. 'Merlot' en coinoculación con *N. diffluens* FLL17.

Tratamiento	PI de <i>B. cinerea</i> (%) ± SD		
	<i>B. cinerea</i> 137	<i>B. cinerea</i> 152	<i>B. cinerea</i> 155
Control	60.0 ± 26.5 <sup>a</sup>	50.0 ± 17.3 <sup>a</sup>	70.20 ± 20.0 <sup>a</sup>
<i>N. diffluens</i> FLL17	100.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	90.0 ± 17.3 <sup>a</sup>	90.0 ± 17.3 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos (t-Student, 0.05) n=3.

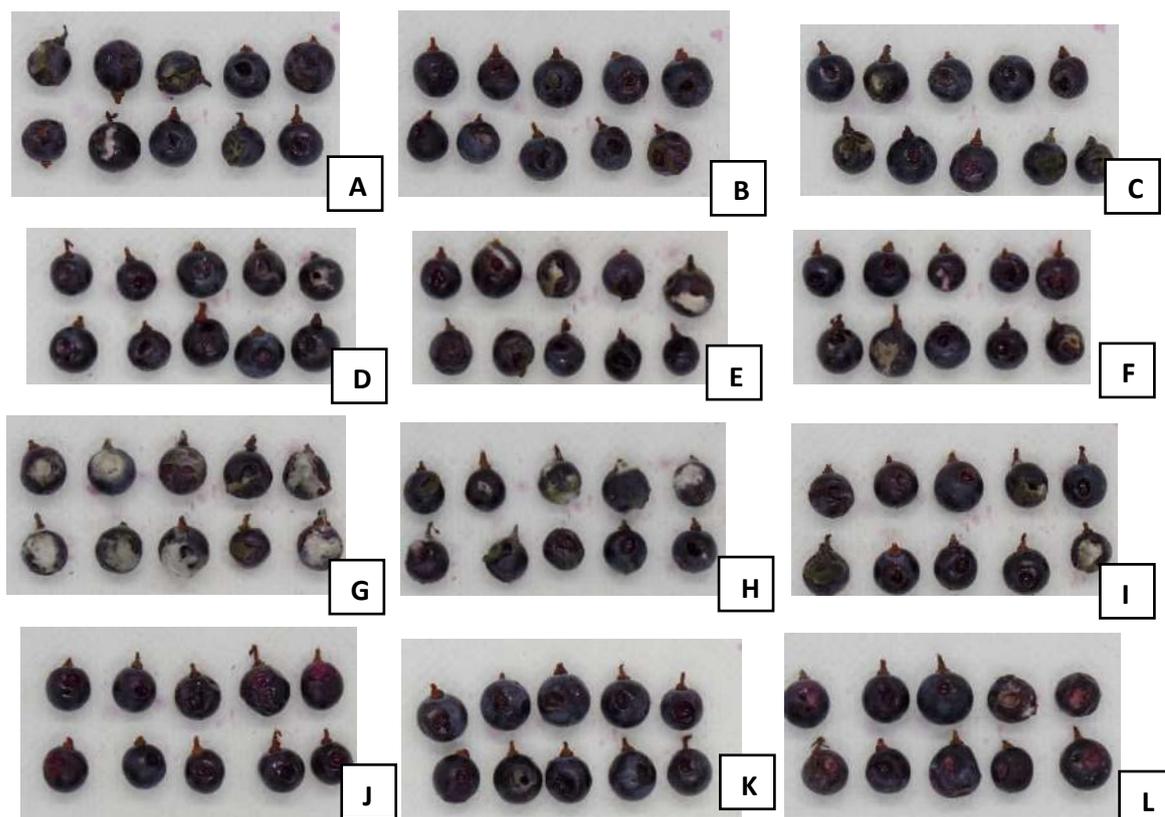


Figura 5. Incidencia de *B. cinerea* en uva cv. 'Merlot' bajo los distintos tratamientos. A: Control 137, B: Control 152, C: Control 155, D: Coinoculación 137-FR4B12, E: Coinoculación 152-FR4B12, F: Coinoculación 155-FR4B12, G: Coinoculación 137-FLL17, H: Coinoculación 152-FLL17, I: Coinoculación 155-FLL17, J: Coinoculación 137-NB9, K: Coinoculación 152-NB9, L: Coinoculación 155-NB9.

#### 4.4 Ensayos de biocontrol *in vivo* en uva de mesa

##### 4.4.1 Coinoculación *B. cinerea*-AB en uva 'Sugraone'.

*B. methylotrophicus* FR4B12 impidió el desarrollo de lesión en coinoculación con ambas cepas de agente patógeno en uva cv. 'Sugraone' (Figura 6 B y F), siendo así la cepa microbiana que mostró mayor capacidad de biocontrol con un 100 % de inhibición de crecimiento del hongo (Cuadro 11). *M. pulcherrima* NB9 al enfrentarse a *B. cinerea* 132 de igual forma inhibió 100 % el crecimiento (Figura 6 D) y ante *B. cinerea* 137 inhibió el crecimiento del hongo 55.6 % (Figura 6 H). Por otro lado, *N. diffluens* FLL17 mostró valores mínimos de inhibición del crecimiento con 9 % de PICR ante *B. cinerea* 137 (Figura 6 G), y ante *B. cinerea* 132 el diámetro de lesión del hongo fue mayor con respecto a control incrementando la severidad 20.3 % (Figura 6 C).

Cuadro 11. Capacidad de biocontrol a *B. cinerea* *in vivo* en uva cv. 'Sugraone'.

Tratamiento	PICR (%)± SD	LD (mm) ± SD
Control <i>B. cinerea</i> 132	-	20.2 ± 2.1
<i>B. cinerea</i> 132 - <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>B. cinerea</i> 132 - <i>M. pulcherrima</i> NB9	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<i>B. cinerea</i> 132 - <i>N. diffluens</i> FLL17	9.0 ± 23.6	18.4 ± 4.7
Control <i>B. cinerea</i> 137	-	21.8 ± 2.1
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12	100.0 ± 0.0	3.0 ± 7.0
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>M. pulcherrima</i> NB9	55.6 ± 37.9	8.2 ± 7.5
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>N. diffluens</i> FLL17	-20.3 ± 7.8	22.15 ± 2.1



Figura 6. Crecimiento de *B. cinerea* en uva 'Sugraone' bajo los distintos tratamientos. A: Control 132, B: Coinoculación 132-FR4B12, C: Coinoculación 132-FLL17, D: Coinoculación 132-NB9, E: Control 137, F: Coinoculación 137-FR4B12, G: Coinoculación 137-FLL17, H: Coinoculación 137-NB9.

#### 4.4.2 Coinoculación *B. cinerea*-AB en uva 'Sweet celebration'

La Figura 7 muestra las uvas 'Sweet celebration' bajo los distintos tratamientos. *M. pulcherrima* NB9 y *B. methylotrophicus* FR4B12 mostraron capacidad para inhibir el crecimiento del hongo en 100.0 y 88.1 %, respectivamente, de manera contraria, *N. diffluens* FLL17 favoreció el crecimiento del hongo 14.4 % con relación al control (Cuadro 8).

Cuadro 12. Capacidad de biocontrol a *B. cinerea* *in vivo* en uva cv. 'Sweet celebration'.

Tratamiento	PICR (%)± SD	LD (mm) ± SD
Control <i>B. cinerea</i> 137	-	20.8 ± 2.6
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>B. methylotrophicus</i> FR4B12	88.1 ± 21.8	3.9 ± 6.7
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>M. pulcherrima</i> NB9	100.0 ± 0.0	1.23 ± 3.8
<i>B. cinerea</i> 137 - <i>N. diffluens</i> FLL17	-14.4 ± 8.2	23.5 ± 2.3

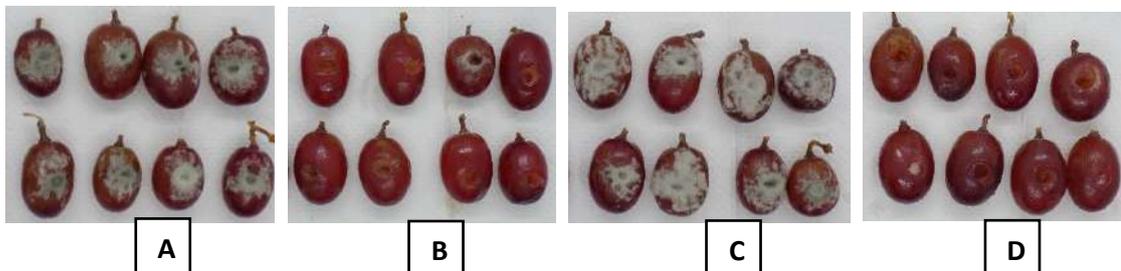


Figura 7. Crecimiento de *B. cinerea* en uva 'Sweet celebration' bajo los distintos tratamientos. A: Control 137, B: Coinoculación 137-FR4B12, C: Coinoculación 137-FLL17, D: Coinoculación 137-NB9.

#### 4.5 Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas.

Debido a la destacada actividad antagonista que mostraron las cepas *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 se determinó su tolerancia *in vitro* a los fungicidas Benomilo®, Cupravit® y Azufre 720® a distintas concentraciones. El crecimiento de *M. pulcherrima* NB9 no se inhibió por ninguno de los fungicidas a las concentraciones probadas, en cambio el crecimiento de *B. methylotrophicus* FR4B12 si se vio afectado por los fungicidas Cupravit® y Azufre

720® a las concentraciones indicadas en la Figura 8, mostrando halos de inhibición del crecimiento (Figura 9). La dosis de aplicación recomendada para Azufre 720® es 3.6 g L<sup>-1</sup> y el crecimiento de *B. methylotrophicus* FR4B12 se vio limitado a partir de dicha concentración, en cambio en el caso de Cupravit® la concentración mínima que tuvo un efecto en el crecimiento de la bacteria corresponde a cuatro veces la dosis de aplicación recomendada.

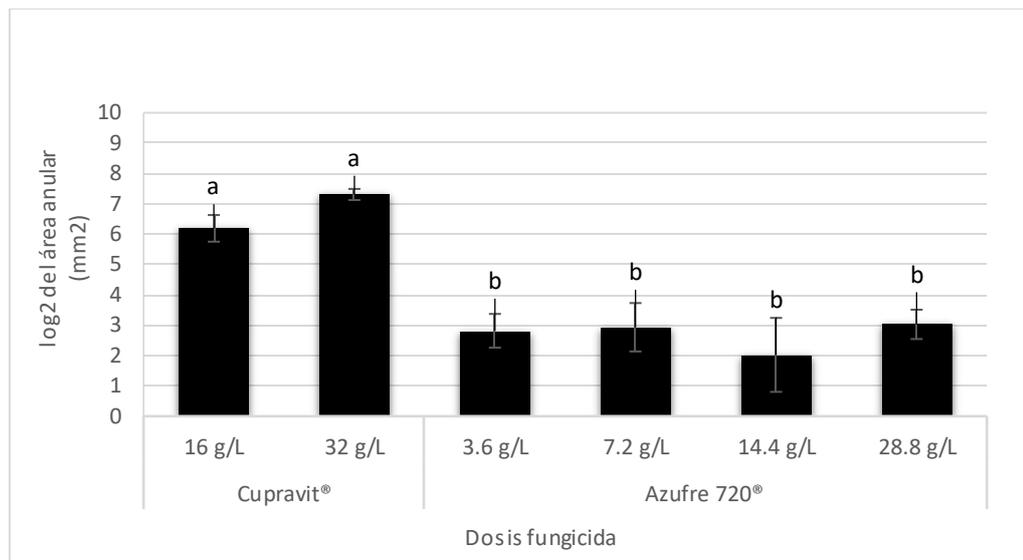


Figura 8. Halos de inhibición a *B. methylotrophicus* FR4B12 causados por los fungicidas.

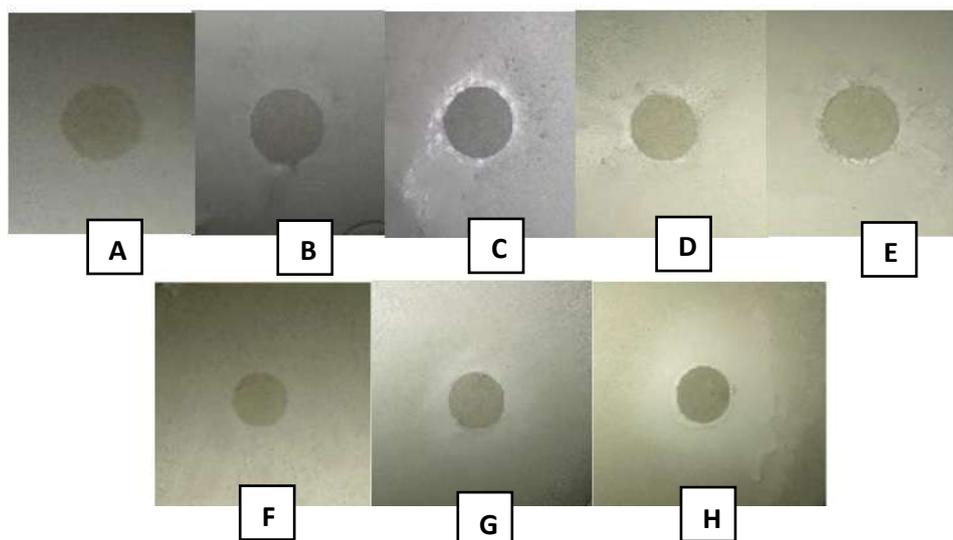


Figura 9. Halos de inhibición de *B. methylotrophicus* FR4B12 bajo distintos tratamientos de Azufre 720® A: 0 g L<sup>-1</sup>, B: 3.6 g L<sup>-1</sup>, C: 7.2 g L<sup>-1</sup>, D: 14.4 g L<sup>-1</sup>, E: 28.8 g L<sup>-1</sup> y Cupravit® F: 0 g L<sup>-1</sup>, G: 16 g L<sup>-1</sup> y H: 32 g L<sup>-1</sup>.

## 5. DISCUSION

### 5.1 Ensayos de antagonismo *in vitro*

Las bacterias juegan un papel importante en el biocontrol de fitopatógenos como *B. cinerea*, por lo que diversas especies han sido objeto de estudio como potenciales antagonistas mediante pruebas de laboratorio y de campo. Estos microorganismos pueden emplear distintos modos de acción que afectan el desarrollo de fitopatógenos entre los que se incluyen, la síntesis de metabolitos antifúngicos (como antibióticos, enzimas que degradan la pared celular y compuestos orgánicos volátiles (COV)); competencia por nutrientes y/o espacio; e inducción de resistencia del huésped (Haidar y col., 2016, Chen y col., 2019).

*Bacillus* spp. es de los géneros bacterianos más comúnmente reportados con capacidad antagonista a hongos fitopatógenos (Azfal y col., 2019). Cepas de *B. subtilis*, *B. marinus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* han mostrado capacidad para inhibir *B. cinerea* mediante diversos modos como producción de compuestos volátiles, lipopéptidos, enzimas hidrolíticas (celulasas y proteasas) y por competencia por espacio mediante la formación de biopelículas. (Chen y col., 2007; Gu y col. 2017; Chen y col., 2019). En contraste, la especie de *B. methylotrophicus* ha sido poco reportada, sin embargo, su capacidad para formar esporas, su crecimiento en un amplio rango de temperaturas y pH, y su capacidad de producir enzimas hidrolíticas sugieren que podrían presentar potencial para actuar como agente de biocontrol (Ríos-Velasco y col., 2015; Madhaiyan y col., 2009).

En los ensayos del presente estudio, *B. methylotrophicus* FR4B12 fue la cepa que mostró la mayor capacidad antagónica (Figura 4), Ríos-Velasco y col. (2015) han reportado también cepas de *B. methylotrophicus* aisladas de ecosistemas agrícolas con capacidad de inhibir *B. cinerea in vitro*. Se ha reportado que esta especie produce enzimas hidrolíticas como catalasa, oxidasa, pectinasa y proteasa, capaces de degradar los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos de hongos fitopatógenos (Madhaiyan y col., 2010), lo que ocasiona daños en las hifas de los hongos (Chen y col., 2019) impidiendo la penetración en la pared celular del huésped.

Las levaduras son versátiles como agentes de biocontrol debido a características como estabilidad durante el almacenamiento y alta capacidad de colonización (Chanchaichaovivat y col., 2007). *N. diffluens* FLL7, aislada de fruto de manzano, mostró una capacidad de inhibición estadísticamente igual a la alcanzada por *B. methylotrophicus* FR4B12 ante tres de los cuatro aislados del patógeno. Si bien se han encontrado cepas del género *Naganishia* spp. en uvas (Lorenzi y Zapparoli, 2018), no han sido reportadas como antagonista a *B. cinerea*, sin embargo, hay reportes de cepas pertenecientes al género *Naganishia* spp. que muestran actividad antagonista ante fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Alternaria solani* y *Phytophthora capsici* (Tapia-Vazquez y col., 2019); por otro lado, levaduras del género *Cryptococcus* spp., en el que anteriormente se clasificaba *N. diffluens*, han mostrado capacidad antagónica contra *Penicillium expansum* y *B. cinerea* en frutos como fresa, tomate, manzana y cítricos (Guerrero-Prieto y col., 2012; Freimoser y col., 2019).

El género *Metschnikowia* spp. comprende especies de levaduras encontradas principalmente en la filósfera y en el néctar de flores (Freimoser y col., 2019). Dentro de este género, *M. pulcherriama* es una de las especies más estudiadas como agentes de biocontrol, pues han mostrado capacidad para inhibir una gran variedad de enfermedades causadas por hongos en plantas (Freimoser y col., 2019). *M. pulcherrima* NB9, aislada de fruto de uva fue la cepa que mostró la menor actividad antagonista (Cuadro 6); Spadaro y col. (2002) probaron la capacidad de inhibición de cepas de *M. pulcherrima* aisladas de manzana las cuales *in vitro* inhibieron entre 81 y 87 % el crecimiento radial de *B. cinerea*, antagonismo muy superior al observado por *M. pulcherrima* NB9 sobre las cepas de *B. cinerea* probadas. La competencia por nutrientes es el principal modo de acción descrito para cepas de *M. pulcherrima in vitro* y en fruto (Saravanakumar y col., 2008; Sipickzi, 2006; Parafati y col., 2015), y se ha descrito que la inhibición a *B. cinerea in vitro* produce una disminución en la germinación de las esporas y la degeneración del micelio que crece en los límites del halo de inhibición (Saravanakumar y col., 2008); sin embargo, *M. pulcherrima* NB9 no mostró ser un antagonista efectivo ante *B. cinerea in vitro*.

La efectividad de las tres cepas de biocontrol se vio influida por el aislado de *B. cinerea* al que antagonizaron, siendo *B. cinerea* 137 la que presentó la menor inhibición por parte de los tres antagonistas; sobre la cepa *B. cinera* 152, las levaduras, *M. pulcherrima* NB9 y *N. diffluens* FLL17, mostraron el mayor efecto antagónico, en tanto que *B. methylotrophicus* FR4B12 mostró mejores resultados ante 155, indicando que aún entre cepas de la misma especie la susceptibilidad es diferente frente a los agentes de biocontrol. En otros estudios al enfrentar cepas de levaduras a *B. cinerea in vitro* y en fruto de uva, también se observó que la capacidad de inhibición de las cepas antagonistas depende del aislado del patógeno al que se enfrenta (Wang y col., 2018; Parafati y col., 2015).

## 5.2 Ensayos de biocontrol *in vivo* en uva de vino y de mesa

Debido al diseño experimental planteado para los ensayos *in vivo* en uva de mesa, dado la disponibilidad de material biológico, los resultados no pudieron ser analizados bajo una prueba estadística de forma válida. Durante los experimentos se consideró como unidad experimental una uva, sin embargo, debido a las características de tamaño de las bayas las mediciones obtenidas no cumplían con las características de normalidad ni homocedasticidad. Se sugiere, para estudiar de forma cuantitativa la capacidad de biocontrol de las cepas ante *B. cinerea*, utilizar mínimo 5 uvas como unidad experimenta con 10 repeticiones en experimentos futuros. Los resultados obtenidos nos permiten analizar de forma preliminar y cualitativa la capacidad de biocontrol de las cepas microbianas a *B. cinerea* en uva de mesa.

La capacidad de inhibición de *B. methylotrophicus* FR4B12 se vio influenciada por la variedad de uva, en uva cv 'Merlot', *B. methylotrophicus* FR4B12 no mostró efecto antagónico satisfactorio (Figura 5), en tanto que en uva de mesa sí mostró antagonismo, siendo en la uva 'Sugraone' donde se obtuvieron los mejores resultados. En la caracterización química de las bayas se encontró en la variedad 'Sugraone' una acidez total de 2.85 g ácido tartárico L<sup>-1</sup>, en tanto que para la uva 'Sweet celebration' y la uva de vinificación se determinó una acidez total de 3.35 y 3.80 g ácido tartárico L<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 7); Ahlem y col. (2012) relacionan la capacidad de inhibición de cepas de *Bacillus*

*amyloliquefaciens* contra *B. cinerea* con el pH en el medio; a menor pH se observa menor capacidad de inhibición, en cambio, la actividad antagónica se favorece a pH neutros u alcalinos, valdría la pena determinar estadísticamente si la menor acidez en uva cv 'Sugraone' tiene efecto en la actividad antagónica de *B. methylotrophicus* FR4B12 ante *B. cinerea*.

Cepas de *B. methylotrophicus* con actividad antagonista a *B. cinerea* han mostrado también actividad antagonista ante otros hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Penicillium crustosum* (Rios-Velasco y col. 2015); por lo que *B. methylotrophicus* FR4B12 podría tener potencial como antagonista ante otros hongos fitopatógenos. Las especies que pertenecen al género *Bacillus spp.* pueden formar endosporas, lo que garantiza la viabilidad comercial, productos con bajos requisitos de almacenamiento, pero una larga vida útil (Chen y col., 2019).

Al coinocular *N. diffluens* FLL17 con las cepas de *B. cinerea*, en las tres variedades de uva, las cepas del hongo tuvieron un mayor crecimiento en la baya que el respectivo tratamiento control (Figura 5, 6 y 7). Dado que las levaduras pueden consumir o descomponer gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno sintetizando diversidad de sustancias que se liberan al entorno, estas pueden ser utilizadas por otros microorganismos, como fitopatógenos, en las comunidades microbianas (Mittelbach y Vanette, 2017), favoreciendo así su desarrollo.

*In vitro* *M. pulcherrima* NB9 fue la cepa con menor capacidad de inhibición, sin embargo, en fruto mostró los mejores ante *B. cinerea*; en uva cv 'Merlot' mostró la mayor inhibición ante las tres cepas probadas (Figura 5); y en las dos variedades de uva de mesa fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento del hongo (Figura 6 y 7). Esto coincide con lo reportado por Wang y col. (2018) y Parafati y col. (2015) quienes probaron cepas de *M. pulcherrima* contra *B. cinerea* *in vitro* y en uva, encontrando mayor efecto antagónico en baya. Se ha demostrado que la actividad antagónica de *M. pulcherrima* a *B. cinerea* se correlaciona directamente a los niveles de pulcherrimina que produce la levadura (Sipiczki, 2006), la pulcherrimina es un pigmento rojo insoluble que se genera a

partir de ácido pulcherrimínico y en presencia de hierro III (Gore-Lloyd y col., 2019) generando competencia por hierro en el medio, limitando el crecimiento de otros microorganismos (Sipiczki, 2006; Saravanakumar y col., 2008 ; Wang y col., 2018).

Cepas de *M. pulcherrima* con actividad antagonista contra *B. cinerea* han mostrado también actividad antagonista ante otros hongos fitopatógenos como *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Monilinia* spp., *Penicillium* spp. (Gore-Lloyd y col., 2019; Savarakumar y col., 2008); por lo que *M. pulcherrima* NB9 podría tener potencial como antagonista ante otros hongos fitopatógenos.

Del mismo modo que en el ensayo *in vitro*, podemos observar, tanto en uva 'Merlot' como en uva 'Sugraone', que la capacidad de inhibición de la cepa en fruto depende del aislado de *B. cinerea* al que se enfrente. Además, la capacidad antagónica del agente de biocontrol ante los distintos aislados también fue diferente en función del medio donde se dio la confrontación, ya fuera *in vitro* o en fruto, esto corresponde a lo reportado por Parafati y col. (2015) quienes reportan que la eficiencia de biocontrol de cepas de *M. pulcherrima* depende de la cepa de *B. cinerea* y varía entre ensayos *in vivo* e *in vitro*, lo que hace latente la insuficiencia de evaluar los agentes de biocontrol únicamente *in vitro* y la necesidad de evaluarlos ante varias cepas del agente patógeno.

Si bien *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 mostraron gran capacidad de inhibición individualmente valdría la pena evaluarlos en conjunto; bacterias y levaduras tienen requerimientos ecológicos y nutricionales diferentes entre sí, por lo que podrían aplicarse conjuntamente, además de que presentan modos de acción complementarios, las levaduras por una parte mediante la competencia por nutrientes y espacio (Schena y col., 2000) y *Bacillus* mediante la producción de antibióticos (Anjaiah, 2004). Mondino (2012) reporta la formulación de un biofungicida que conjunta la acción de *Metschnikowia pulcherrima* y *B. subtilis* para su aplicación en viñedo que logra controlar la podredumbre gris igual que un fungicida de síntesis (Iprodiona), también Zangoei y col. (2014) reportan el uso en conjunto de especies de levaduras *Candida membranicensis* y *Pichia guilliermondii* con *Bacillus subtilis* que muestra una mayor capacidad para inhibir

el crecimiento de *B cinerea in vivo* en frutos de manzano que cuando se aplicaban los microorganismos por separado.

Sin embargo, es necesario escalar los ensayos a pruebas en campo ya que en el control biológico no basta con tomar en cuenta solamente el huésped, el patógeno y el antagonista en condiciones controladas; la microbiota endófito y epífita propia de la planta, así como las condiciones ambientales juegan un rol muy importante en la capacidad de biocontrol (Spadaro y Droby, 2016; Braga y col., 2016) (Elad y Stewart, 2007).

### 5.3 Ensayos de resistencia de los agentes de biocontrol a fungicidas.

Dado que es posible lograr un mayor control de la podredumbre gris en viñedo al conjuntar métodos de control químicos y biológicos, reduciendo el riesgo de desarrollo de resistencia (Rotolo y col., 2018; Elad y Stewart, 2007) se evaluó la capacidad de *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 para desarrollarse en la presencia de fungicidas de síntesis comúnmente empleados en el cultivo de la uva.

*M. pulcherrima* NB9, cepa aislada de uva de viñedo, no mostró susceptibilidad a ninguno de los fungicidas de uso común en el cultivo de la vid probados. Vadkertiová y Sláviková (2011) mostraron que cepas de *M. pulcherrima* aisladas de árboles frutales comúnmente tratados con fungicidas químicos tenían mayor resistencia *in vitro* a los agroquímicos usados en el cultivo que cepas de la misma especie aisladas de árboles forestales (no tratados con fungicidas). Wang y col. (2018) probaron la susceptibilidad de cepas de *M. pulcherrima* a distintos fungicidas químicos, encontrando que las cepas mostraban susceptibilidad a algunos fungicidas tales como fluopyram, pyraclostrobin y boscalid y triflumisole, por lo que valdría la pena evaluar la susceptibilidad de *M. pulcherrima* NB9 a otros fungicidas químicos de síntesis.

*B. methylotrophicus* FR4B12 mostró susceptibilidad ante Cupravit® (Figura 9F, 9G y 9H), sin embargo, la dosis a partir de la cual se observa efecto inhibitorio al desarrollo de la bacteria es cuatro veces la dosis recomendada a la aplicación. Ante Azufre 720® se observa un efecto inhibitorio del crecimiento a partir de la dosis recomendada de aplicación (3.6 g L<sup>-1</sup>) (Figura 9A, 9B y 9C), lo que

restringiría el uso en conjunto de la cepa con este fungicida. Por otro lado, Benomil® no tuvo efecto en el crecimiento de la bacteria a las concentraciones probadas. La respuesta de cepas comerciales de *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* empleadas en el control de *B. cinerea* ha sido probado contra fungicidas de distintos grupos químicos comúnmente utilizados en el control de la podredumbre gris en viñedo, la mayoría de los fungicidas no mostraron un efecto, sin embargo, los derivados de cobre inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* mostrando halos de inhibición con hasta un cuarto de la dosis recomendada en la etiqueta (Rotolo y col., 2018), esto corresponde a lo observado en el ensayo, ya que Cupravit es un derivado de cobre ( $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ ).

Aunque si bien el determinar la tolerancia de las cepas a los fungicidas nos ilustra sobre el potencial de los antagonistas para ser aplicados en conjunto o alternados con estos fungicidas químicos, para establecer un plan de manejo integrado de la enfermedad considerando estos agentes de biocontrol se requerirá de ulteriores estudios de compatibilidad, formulación y optimización de las aplicaciones (Elad y Stewart, 2007; Wang y col., 2018).

## 6. CONCLUSIONES.

- La capacidad de inhibición de las cepas microbianas de biocontrol depende del medio o sustrato y de la cepa de *B. cinerea* a la cual se enfrentan.
- *B. methylotrophicus* FR4B12 y *M. pulcherrima* NB9 muestran potencial para ser usados como agentes de biocontrol de la podredumbre gris en uva de mesa.
- *M. pulcherrima* NB9 muestra potencial para ser usada como agente de biocontrol de la podredumbre gris en uva para vinificación.
- *M. pulcherrima* NB9 y *B. methylotrophicus* FR4B12 muestran potencial para ser utilizadas en un manejo integrado de la enfermedad en conjunto a fungicidas químicos de síntesis como Benomilo, Oxiclورو de cobre y Azufre elemental.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

**Ahlem** H, Mohammed E, Badoc A, Ahmed L. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. Afr. J. **2012**;11(9):2210-2217.

**Afzal** I, Shinwari ZK, Sikandar S, y Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiol. Res. **2019**;221:36-49.

**Anjaiah** V. Biological control mechanisms of fluorescent pseudomonas species involved in control of root diseases of vegetables/fruits. En: Mukerji KG, Ed. Fruits and vegetables diseases. Kluwer Academic Publishers. **2004**:453- 500

**Beever** RE, Weeds PL. Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. En: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Eds. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht NL **2007**:29-52.

**Braga** RM, Dourado MN, Araújo WL. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. Braz J. Microbiol. **2016**;47:86-98.

**Čadež** N, Zupan J, Raspor P. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. FEMS Yeast Res. **2010**;10(5):619-630.

**Calvo-Garrido** C. Control de la podredumbre por *Botrytis cinerea* mediante la aplicación de *Candida sake* CPA-1 y otras estrategias alternativas a los fungicidas químicos en uva de vinificación. Tesis de Doctorado. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Departament de Tecnologia d'Aliments. Iniversitat de Lleida. **2013**

**Chanchaichaovivat** A, Ruenwongsa P, Panijpan B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). Biol. Control **2007**;42:326-335.

**Chen**, H, Xiao X, Wang J, Wu L, Zheng Z, Yu Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnol. Lett. **2007**;30(5):919–923.

**Chen** X, Wang Y, Gao Y, Gao T, Zhang D. Inhibitory Abilities of *Bacillus* Isolates and Their Culture Filtrates against the Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Postharvest Fruit. Plant Pathol. J. **2019**;35(5): 425-436.

**Ciancio** A, Mukerji KG. Biology and applications of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management. En: General Concepts in Integrated Pest and Disease Management. **2007**10.1007/978-1-4020-6061-8(), Países Bajos: Springer, **2007**; 233-235.

**COFEPRIS**. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Registro sanitario de plaguicidas y nutrientes vegetales. [consulta en internet]. **2019** [consultado 2020 abril 01]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-plaguicidas-y-nutrientes-vegetales>

**Conrath** U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR. Priming for enhanced defense. Annu. Rev. Phytopathol. **2015**;53:97–119.

**Daane** K M, Vincent C, Isaacs R, Ioriatti C. Entomological opportunities and challenges for sustainable viticulture in a global market. Annu. Rev. Entomol. **2018**;2(63):193–214.

**de la Cruz-de Aquino** MA, Martínez-Peniche RA, Becerril-Román AE, Chávaro-Ortiz MS. Caracterización física y química de vinos tintos producidos en Querétaro. Rev. fitotec. mex. **2012**;35(5):61-67.

**Dunn** B, Levine RP, Sherlock G. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. BMC Genomics **2005**;6:53-74.

**Elad** Y. Cultural and Integrated Control of *Botrytis* spp. En: Fillinger S, Elad Y, Eds. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Suiza: Springer, **2015**;149-164.

**Elad** Y, Stewart A. Microbial Control of *Botrytis* spp. En: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht NL **2007**:223-241.

**Elmer** PAG, Michailides TJ. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. En: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht: NL Kluwer Academic Publishers, **2007**:243-272.

**Estrella** V. Enoturismo, apuesta económica de Querétaro. El economista [consulta en internet]. **2018** [consultado 2019 agosto 11]. Disponible en:

<https://www.eleconomista.com.mx/estados/Enoturismo-apuesta-economica-de-Queretaro-20180726-0143.html>

**FAO.** Food and Agricultural Organization. FAOSTAT [consulta en internet]. **2019** [consultado 2021 enero 09]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

**FAO-OIV.** Food and Agricultural Organization and International Organization of Vine and Wine. Table and Dried Grapes [monografía en internet]. **2016** [consultado 2020 abril 30]. Disponible en: [www.oiv.int/public/medias/5116/booklet-fao-oiv-grapes-focus.pdf](http://www.oiv.int/public/medias/5116/booklet-fao-oiv-grapes-focus.pdf)

**Fenner K,** Canonica S, Wackett LP. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* **2013**;341(6147):752-758.

**Fillinger S,** Walker AS. Chemical control and resistance management of Botrytis diseases. En: Fillinger S, Elad Y, Eds. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Suiza: Springer, **2015**;189-216.

**Freimoser FM,** Rueda-Mejia MP, Tilocca B, Migheli Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *WORLD J MICROB BIOT*, **2019**;35(10):154-173.

**Galindo E,** Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Balderas-Ruiz KA, Muñoz-Celaya AL, Mezo-Villalobos M, Arroyo-Colín J. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Figifree AB®, el primer biofungicida 100 % mexicano. *TIP* **2015**; 18(1):52-60.

**Ge B,** Liu B, Nwet TT, Zhao W, Shi L, Zhang K. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *PLoS ONE* **2016**;11(11): 1-13

**Ghorbanpour M,** Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, Omidvar R, Kariman K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biol Control* **2018**;117:147–157.

**Gore-Lloyd D,** Sumann I, Brachmann AO, y col. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Mol Microbiol*. **2019**;112(1):317-332.

**Gu K,** Zhang D, Guan C, Xu J, Li S, Shen G. Safe antifungal lipopeptides derived from *Bacillus marinus* B-9987 against grey mold caused by *Botrytis cinerea*. *J. Integr. Agric.* **2017**;16(9):1999–2008.

**Guerrero-Prieto** VM, Berlanga-Reyes DI, Ojeda-Barrios DL. Biocontrol con levaduras de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzana Golden Delicious. *Tecnociencia Chihuahua* **2012**;7:75-80.

**Hassani** MA, Durán P, Hacquard S. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* **2018**;65:58-75.

**Haidar** R, Fermaud M, Calvo Garrido C, Roudet J, Deschamps A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathol. Mediterr* **2016**;55(3);13–34.

**Heimpel** GE, Mills N. *Biological Control - Ecology and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press, **2017**.

**Holz** G, Gutschow M, Coertze S, Calitz FJ. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease suppression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Dis* **2003**;87:351-358.

**Holz** G, Coertze S, Williamson B. The Ecology of *Botrytis* on Plant Surfaces. En: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, Eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht NL **2007**:9-27.

**Jacometti** MA, Wratten SD, Walter M. Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Aust. J. Grape Wine Res* **2010**;16:154-172.

**Jolly** NP, Augustyn OPH, Petrorius IS. The role and use of non-*Saccharomyces* yeast in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2006**:27:15-39.

**Köhl** J, Kolnaar R and Ravensberg WJ. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front Plant Sci* 2019;10:845.

**Latorre** BA, Elfar K, Ferrada EE. Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Cien Inv Agr* **2015**;42(3):305-330.

**Lorenzini** M, Zapparoli G. Yeast-like fungi and yeasts in withered grape carposphere: Characterization of *Aureobasidium pullulans* population and species diversity. *Int. J. Food Microbiol* **2018**;289.

**Madhaiyan** M, Poonguzhali S, Kwon SW, Sa TM. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **2009**;60(10) 2490–2495.

**McClellan** WD, Hewitt WB. Early Botrytis rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology* **1973**;63:1151–1157.

**Mittelbach** M, Vanette RL. Mutualism in yeast. En: Yurkov AM, Buzzini P, Lachance MA, Eds. *Yeasts in natural ecosystems: Ecology*. Springer Cham **2017**:155-178.

**Mondino** P, Casanova L, Calero, G, Bentancur O, Alanis S. Zimevit: un biofungicida que combina la acción de una bacteria y una levadura para el control del moho gris de la vid ocasionado por *Botrytis cinerea*. *RBA*. **2012**;7:127-134.

**Montealegre** JR, Pérez LM. Control biológico de enfermedades de plantas en Chile. En: Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre JR, Colmenárez YC, Eds. *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*. Montevideo: Facultad de Agronomía, **2014**:157-168.

**Mundy** DC, Agnew RH, Wood PN. Grape tendrils as an inoculum source of *Botrytis cinerea* in vineyards – a review. *Plant Prot* **2012**;65:218-227.

**Naegele**, R. Evaluation of host resistance to Botrytis bunch rot in *Vitis spp.* and its correlation with Botrytis leaf spot. *HortScience* **2018**;53(2):204-207.

**Nicot** PC, Stewart A, Bardin M, Elad, Y. Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis-Induced Diseases. En: Fillinger S, Elad Y, Eds. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Suiza: Springer, **2015**;165-187.

**Rios-Velasco** C, Caro-Cisneros JM, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Guerrero-Prieto VM. Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.* contra hongos fitopatógenos comunes. *Rev. mex. fitopatol* **2016**;34(1):85-99.

**Rotolo** C, De Miccolis Angelini RM, Dongiovanni C, Pollastro S, Fumarola G, Di Carolo M, Perrelli D, Natale P, Faretra F. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Manag Sci*. **2018**;74(3):715-725.

**Sandoval-Chávez** RA, Martínez-Peniche RA, Hernández-Iturriaga M, Fernández-Escartín E, Arvizu-Medrano S, Soto-Muñoz L. Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. *Rev. Chapingo Ser Hortic* **2011**;17(2):161-172.

**Saravanakumar** D, Ciavarella A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biol Tec* **2008** 49(1):121–128.

**Schena** L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen E, Droby S. Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *Eur. J. Plant Pathol.* **2000**;106(7):681-691.

**SIAP**. Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. Atlas Agroalimentario 2019. 1a. edición. Ciudad de México, **2019**.

**SIAP**. Servicio de Información agroalimentaria y pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. **2020** [consultado 2021 agosto 08]. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

**Sipiczki** M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl Environ Microbiol.* **2006**;72(10):6716-6724.

**Spadaro** D, y Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Tech* **2016**;47:39–49.

**Spadaro** D, Vola R, Piano S, Gullino ML. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Tec* **2002**;24:123–134.

**Panebianco** A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Vitale A. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Prot* **2015**;77:65-73.

**Parafati** L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* **2015**;47:85–92.

**Parrodi** E. El resurgimiento del vino en Querétaro. *Rev tres tiempos* [serie en internet]. **2017** [consultado 2019 agosto 08]. Disponible en: <http://www.revistatrestiempos.com.mx/el-resurgimiento-del-vino-queretano/>

**Raaijmakers** JM, Mazzola M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **2012**;50:403–424

**Rubio J**, Montes C, Castro A, Alvarez C, Olmedo B, Muñoz M, Tapia E, Reyes F, Ortega M, Sánchez E, Miccono M, Dalla-Costa L, Martinelli L, Malnoy M, Prieto H. Genetically engineered Thompson Seedless grapevine plants designed for fungal tolerance: selection and characterization of the best performing individuals in a field trial. *Transgenic Res* **2014**;24:43–60.

**Serrano L**, Galindo E. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia [serie en internet]* **2007** [consultado 2020 abril 30]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>

**Spadaro D**, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol* **2016**;47:39–49.

**Tapia-Vazquez I**, Sanchez R, Arroyo M, Lira-Ruan V, Sanchez-Reyes A, Sánchez-Carbente M, Padilla-Chacón D, Batista-García RA, Folch-Mallol JL. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. *Microbiol. Res.* **2019**;232.

**OIV**. International Organization of Vine and Wine. Compendium of international methods of analysis. Total acidity (OIV-MA-AS313-01). [monografía en internet]. **2018** [consultado 2020 marzo 13]. Disponible en: [www.oiv.int/public/medias/3731/oiv-ma-as313-01.pdf](http://www.oiv.int/public/medias/3731/oiv-ma-as313-01.pdf)

**Vadkertiová R**, Sláviková E. Influence of Pesticides on Yeasts Colonizing Leaves. *Z. Naturforsch. C* **2011**;66:588–594.

**Vázquez-Lara I**. Susceptibilidad de cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de uva frente a fungicidas químicos de síntesis. Universidad Autónoma de Querétaro [Tesis de maestría] **2018**.

**Venkitasamy C**, Zhao L, Zhang R, Pan Z. Grapes. En: Pan Z, Zhang R, Zicari S, Eds. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural*. London: UK Elsevier, **2019**:133–163. Dordrecht: NL Kluwer Academic Publishers, **2004**:243-272.

**Vergar PJ**, Boobis AR. Global food supply. Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science*, **2013**;341(6147):717-718.

**Wang X**, Glawe DA, Kramer E, Weller D, Okubara PA. Biological Control of *Botrytis cinerea*: Interactions with Native Vineyard Yeasts from Washington State. *Phytopathology*, **2018**;108(6), 691–701.

**Williamson B**, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JA. Pathogen profile *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol* **2007**; 8(5):561–580.

**Zangoei E**, Etebarian HR, Sahebani N. Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus Subtilis* and yeast isolates. *AJFST* **2014**; 8(3):155-163.

**Zhao H**, Kim YK, Huang L, Xiao CL. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biol Tech* **2010**;56(1):12-18.

**Zoffoli JP**, Latorre BA, Rodríguez J, Aguilera JM. Biological indicators to estimate the prevalence of gray mold and hairline cracks on table grapes cv. Thompson Seedless after cold storage. *Postharv Biol Technol* **2009**;52:126-133.