

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Evaluación Sinérgica de *Bacillus subtilis* y Quitosano Para el Control de
Botrytis cinerea en Arándano.

Por:

SAMANTHA SORIA DELGADO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

Noviembre, 2022.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Evaluación Sinérgica De *Bacillus subtilis* Y Quitosano Para El Control De
Botrytis cinerea En Arándano.

Por:

SAMANTHA SORIA DELGADO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

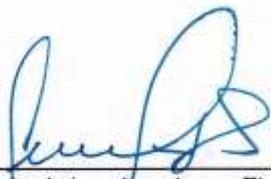
Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor Principal Interno


M.C. Omar Jiménez Pérez
Asesor Principal Externo


M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos
Coasesor


Dr. Francisco Castillo Reyes
Coasesor Externo


Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador Interino de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2022.

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

— Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante

Samantha Soria Delgado

Samantha Soria Delgado

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTOS

Estoy segura de que las personas que nos rodean influyen en quienes somos y nos convertimos, quiero agradecer especialmente a:

Dios que me ha permitido llegar hasta el día de hoy demostrando su grande amor sobre mí, familia y amigos.

Mi padre Juan Soria ha sido inspiración, toda la vida lo he visto realizar su trabajo apasionadamente, siendo el principal motivo por el cual me encuentro aquí el día de hoy además de ser un excelente profesionalista ha sido el mejor papá posible apoyándome incondicionalmente.

Mi madre Maria Luisa que es un sol, tan trabajadora, noble, simpática, siempre con fé en dios y dándolo todo por la familia, gracias por la motivación y por darme todo a manos llenas sobre todo tu amor.

A mis hermanos Fernanda, Pamela, David, Mari Luz y Emma, gracias por recorrer el camino conmigo, por todos los momentos, las risas, las peleas, todas las anécdotas, en este mundo tan grande me alegra que cada uno de ustedes sea mi familia, me llenan de orgullo el alma y hacen mi vida bonita, los amo inconmensurablemente. Quiero extenderme un poquito más con mi hermana y roomie Fer infinitas gracias por apoyarme todos estos años y ser mi compañía más preciada, en muchos sentidos esto no sería posible sin ti.

A mi asesor Gabriel Gallegos Morales, por la paciencia que me tuvo, por su apoyo, dedicación y por compartir sus conocimientos conmigo. Estoy infinitamente agradecida.

A Omar Jiménez muchas gracias por tomarte el tiempo para revisar, ayudarme a corregir este documento, por todo el apoyo que me has dado y por escucharme siempre.

Y definitivamente a mis amigos que hicieron el camino divertido, que me apoyaron en cada situación, que me levantaron los ánimos, que me ayudaron a aprender. Estoy muy agradecida porque tuvimos tiempo para todo, reír, llorar,

estudiar, trabajar, etc. Son mi familia y tengo un millón de recuerdos preciados que atesoraré toda la vida.

A mi incondicional, mejor amiga Lizeth, hemos pasado tantas cosas juntas, hemos cambiado con los años y me llena de alegría saber que estás ahí siempre, que la distancia no importa si realmente te importa alguien, desde un principio supe que eras tu porque en un salón lleno de gente fuiste a la única persona que noté. Soulmate, que las carcajadas nunca nos falten porque todo es mejor contigo.

A mi prima, además una de mis más preciadas personas Abril, por acompañarme a todos lados y pasar el mayor tiempo posible juntas, gracias por ser y dejarme ser una de las versiones más sinceras que tengo, decir y pensar lo mismo que yo, por todos los planes y momentos especiales juntas. Te quiero muchísimo prima fav.

Y a todas las personas que compartieron pedacitos de su vida conmigo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
Contenido	
1. RESUMEN	ix
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Justificación.....	3
2.2 Objetivos	3
2.3 Hipótesis.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 El Cultivo del arándano <i>Vaccinium corymbosum</i>.....	4
3.1.1 Importancia del cultivo de arándano	4
3.1.2 Clasificación taxonómica	5
3.1.3 Enfermedades del cultivo del arándano.....	6
3.1.4 Enfermedades presentes en México	6
3.2 Moho gris <i>Botrytis cinerea</i>.....	7
3.2.1 Clasificación taxonómica	8
3.2.2 Características morfológicas	8
3.2.3 Ciclo de reproducción	9
3.2.4 Condiciones favorables para su desarrollo.....	9
3.2.5 Síntomas y signos	10
3.3 Métodos de control.....	11
3.3.1 Control químico	11
3.3.2 Control cultural	12
3.3.3 Control biológico.....	13
3.3.4 <i>Bacillus subtilis</i>	14
3.4 Biopolímeros con actividad antifúngica (quitina y quitosano).....	15
3.4.1 Quitina	15
3.4.2 Quitosano	18
3.4.3 Métodos de obtención del quitosano	19
3.4.4 Modo de acción del quitosano	20

3.4.5	Uso del quitosano en la agricultura.....	21
3.4.6	Beneficios del quitosano.....	22
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1	Ubicación del experimento	23
4.2	Material biológico	23
4.2.1	Obtención de quitosano.....	23
4.2.2	Aislamiento e identificación de <i>Botrytis cinerea</i>	24
4.2.3	Prueba de patogenicidad.....	26
4.3	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> de quitosano y <i>Bacillus subtilis</i> en contra de <i>Botrytis cinerea</i>.....	27
4.4	Preparación de los tratamientos de quitosano “Q-BS”	27
4.5	Prueba de inhibición <i>in vitro</i> de quitosano “Q-Bs” en contra <i>Botrytis cinerea</i>	27
4.6	Prueba de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> y su combinación con quitosano “Q-Bs” en contra de <i>Botrytis cinerea</i>.....	28
4.7	Análisis estadísticos	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1	Aislamiento e identificación del agente causal del moho gris de flores y frutos de arándano.....	30
5.2	Solubilidad de la quitina y del quitosano	31
5.3	Prueba de patogenicidad en arándanos inoculados con <i>Botrytis cinerea</i>	32
5.4	Prueba de inhibición <i>in vitro</i> de quitosano en contra <i>Botrytis cinerea</i>	32
5.5	Evaluación de la esporulación.....	34
5.6	Prueba de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> y su combinación con quitosano “Q-Bs” en contra de <i>Botrytis cinerea</i>.....	35
6.	CONCLUSIONES	38
7.	LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Tratamientos y dosis de quitosano	27
Tabla 2. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de Q-Bs en contra de <i>Botrytis cinerea</i>	34
Tabla 3. Inhibición de la esporulación de <i>Botrytis cinerea</i> mediante tratamientos de quitosano.....	34
Tabla 4. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> más Q-Bs en contra de <i>Botrytis cinerea</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina.	15
Figura 2. Estructura del quitosano.....	18
Figura 3. Daños causados por <i>Botrytis cinerea</i>	25
Figura 4. Prueba de patogenicidad de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de arándano.	26
Figura 5. Características morfológicas de <i>Botrytis cinerea</i>	30
Figura 6. Diferencias entre solubilidad de quitina y quitosano.	31
Figura 7. Prueba de patogenicidad de <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de arándano.	32
Figura 8. Inhibición <i>in vitro</i> de quitosano en contra de <i>Botrytis cinerea</i>	33
Figura 9. Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> en combinación con quitosano en contra de <i>Botrytis cinerea</i>	37

1. RESUMEN

Uno de los principales fitopatógenos que ataca el cultivo de arándano es *Botrytis cinerea*, este hongo fitopatógeno afecta el desarrollo de la planta en todos sus estados fenológicos, causa grandes pérdidas en el rendimiento, además ocasiona graves daños como patógeno de postcosecha. Es una enfermedad que presenta la capacidad de perder sensibilidad a los fungicidas por lo que se debe optar por otras alternativas para su control. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de quitosano obtenido de la degradación de la quitina de cáscara de camarón para el control de *B. cinerea*, además, de su sinergia *in vitro* con *Bacillus subtilis*. Se demostró, que el quitosano a cuatro concentraciones probadas (0.02, 0.04, 0.08 y 0.16 %) presentó efecto inhibitorio del crecimiento del hongo, siendo la concentración de 0.16 % la de mayor porcentaje de inhibición (51.13 %), también presentó efecto inhibitorio en la esporulación del hongo, inhibiéndola por completo a las concentraciones de 0.08 y 0.16 %. Se demostró que existe la compatibilidad entre quitosano y *B. subtilis*, ya que la bacteria presentó un mejor desarrollo en medio de cultivo PDA suplementado con quitosano a las concentraciones de 0.08, 0.02 y 0.04 %, además, de ejercer un mejor control sobre *B. cinerea* con inhibiciones de 64.03, 69.59 y 74.57 % respectivamente en comparación con el tratamiento de *B. subtilis* (48.48 %).

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, inhibición *in vitro*, quitosano, compatibilidad.

2. INTRODUCCIÓN

El arándano junto con la fresa, frambuesa y zarzamora pertenecen al grupo de las berries. Todos ellos tienen una alta rentabilidad en los mercados nacionales e internacionales si los comparamos con otros cultivos, debido a esto se presenta un incremento constante en las superficies cultivadas en el país (FIRA, 2016).

La producción de arándano en México supera las 37,000 mil toneladas, provenientes de los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, principalmente, siendo Jalisco el mayor productor con más de 13 mil toneladas. México ocupa el 6° lugar como productor de arándano y se estima que en las exportaciones el 95.4 % del total se comercializa en mercado estadounidense, lo que favorece el rápido crecimiento en la producción debido a la cercanía con estos países, también se exporta a otros países como; Japón, China, Singapur, Países Bajos, Canadá, Bélgica, Italia, Emiratos Árabes Unidos, Arabia Saudita, y Reino Unido (SIAP, 2021).

El cultivo de arándano al igual que muchos otros cultivos es una especie susceptible a varias enfermedades, que alteran su desarrollo y acortan su vida productiva, disminuyen la calidad y cantidad de fruta, se vuelve imprescindible conocer las patologías de este cultivo, y así tomar medidas que puedan prevenir el establecimiento de las enfermedades y evitar que vuelvan improductivo el cultivo (Undurraga *et al.*, 2013). Entre las principales enfermedades que afectan a este cultivo tenemos las causadas por bacterias como Agallas de la raíz o corona (*Rhizobium radiobacter* o *Agrobacterium tumefaciens*) y fitoplasmas. Enfermedades causadas por hongos del suelo que afectan las raíces como; *Phytophthora cinnamomi* o *Rhizoctonia* spp. fungos foliares como; Moho gris (*Botrytis cinerea*), o Roya (*Thekopsora minima*), o Pudrición de frutos (*Alternaria alternata* y *Alternaria cantlous*), o enfermedades de la madera como el plateado causado por *Chondrostereum purpureum* (Cisternas, 2009; Rodríguez, 2020).

De las enfermedades mencionadas anteriormente *Botrytis cinerea* se encuentra entre las especies más importantes, ya que causa pérdidas considerables en el rendimiento, afecta a una gran variedad de cultivos, en los diferentes estados fenológicos, ocasiona la muerte de ramas y hojas jóvenes por lo que se debe prestar atención desde floración hasta fructificación. Si bien su aparición es frecuente en flores y frutos, también puede desarrollarse en tallos, hojas y semillas. Además, se trata de un hongo saprófito el cual es muy importante como patógeno de postcosecha ya que ocasiona graves daños económicos al afectar la calidad del fruto, debido a que se alimenta de desechos orgánicos (Rodríguez, 2020; Tacca, 2022).

Para su control es recomendable establecer un método integrado, no solo basarse en control químico ya que *Botrytis* destaca por perder sensibilidad a fungicidas, a causa de su alta variabilidad genética, además, de poseer ciclos múltiples de producción de esporas en abundancia y desarrollo de enfermedades. Se han registrado a nivel mundial cepas de este hongo resistentes a casi todos los fungicidas con modos de acción de sitio único, además, del que el uso inadecuado de estas sustancias repercute en la salud de las personas y al medio ambiente (Rodríguez, 2020; Gordillo 2021; Undurraga y Vargas, 2013).

Se ha demostrado que el quitosano es efectivo para el control de diversos fitopatógenos, tiene diferentes mecanismos de acción pudiendo actuar en el organismo fitopatógeno o ayudar a las plantas mismas a desarrollar sensibilidad (inducción de mecanismos de defensas) y responder de manera más rápida ante estos microorganismos patógenos, además, es utilizado como recubrimiento de frutos en postcosecha (Rabea *et al.*, 2003; Synowiecki *et al.*, 2003).

2.1 Justificación

Botrytis cinerea es un fitopatógeno de gran importancia en el cultivo de arándano, su control principalmente se basa en el uso de fungicidas de síntesis química, los cuales son perjudiciales para la salud de las personas y medio ambiente. Sin embargo, existen otras alternativas para su control, como lo es, el quitosano, el cual es un biopolímero inocuo con propiedades fungicidas en contra de una gran variedad de fitopatógenos, además, estimula el desarrollo de microorganismos benéficos, lo cual podría aprovecharse para mejorar el desarrollo o la actividad antimicrobiana de algunas bacterias antagonistas como *Bacillus subtilis*.

2.2 Objetivos

- 1- Extraer la quitina de cáscara de camarón mediante degradación bacteriana, y su posterior conversión a quitosano.
- 2- Aislar e identificar al fitopatógeno causante del moho gris de flores y frutos del arándano.
- 3- Evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* del quitosano (Q-Bs) en contra de *Botrytis cinerea* agente causal de la enfermedad conocida como moho gris del cultivo de arándano.
- 4- Comprobar la actividad sinérgica *in vitro* de *Bacillus subtilis* en combinación con quitosano (Q-Bs) en contra de *Botrytis cinerea*.

2.3 Hipótesis

Se espera que el quitosano obtenido de quitina extraída mediante degradación bacteriana de cáscara de camarón, presente efecto antagónico en contra de *Botrytis cinerea*, además, de que en combinación con *Bacillus subtilis* potencialice el desarrollo de la bacteria y su efecto antagónico.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 El Cultivo del arándano *Vaccinium corymbosum*

3.1.1 Importancia del cultivo de arándano

En el año de 1996, se introdujo el cultivo del arándano a México. Desde entonces su producción y consumo se ha incrementado y, en la última década se ha tenido un crecimiento exponencial, estimándose cercano en un 800% debido a la demanda del producto tanto en Europa, Asia y Norte América (SADER, 2018). Esta expansión en el incremento de la producción en México se le atribuye a que Estados Unidos es el principal consumidor a nivel mundial y su mercado más próximo (Rosas, 2016).

México ha mantenido un aumento constante en la producción de arándano, teniendo su máximo en 2020, principalmente debido al también constante incremento en la superficie cosechada. La producción de arándano en México llega a superar las 37,000 mil toneladas, éstas son provenientes de los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, principalmente; donde Jalisco el mayor productor con más de 13 mil toneladas. En este sentido, México ocupa el 6° lugar a nivel mundial como productor de arándano y se estima que en cuanto a las exportaciones el 95.4 por ciento del total comercializado se vende al mercado estadounidense, lo que ha favorecido el rápido crecimiento en la producción debido a la cercanía de estos países. En 2021 se enviaron 63,090 toneladas con un valor monetario equivalente a los 517 millones de dólares, también se exportó a países como Japón, China, Singapur, Países Bajos, Canadá, Bélgica, Italia, Emiratos Árabes Unidos, Arabia Saudita, y Reino Unido con volúmenes mínimos, significando que no hay un mercado alternativo de gran importancia para el producto mexicano (SIAP, 2021; USDA 2021; SADER, 2021).

Además de ser un cultivo que se cosecha durante gran parte del año, se obtienen los mayores volúmenes de producción durante los meses de abril, junio y diciembre, siendo este último el pico máximo de producción, en 2020 abarcó el 22.3% de la producción total. Y durante los meses de agosto y octubre desciende a los mínimos (SIAP, 2021).

En México el 61.5% de la producción de arándano se realiza en macrotúnel, mientras que 32.6% es a cielo abierto y solo 5.9% en malla sombra. Por otro lado, en cuanto al tipo de producción, el 97.1% se trata de tipo convencional, dejando solamente un 2.9% para la orgánica, por lo que pudiera haber oportunidad de desarrollo para los agricultores bajo este último sistema de producción (USDA, 2021).

3.1.2 Clasificación taxonómica

Según Kloet, (1980) el arándano fue clasificado por Linneo en 1753 de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Subfamilia: Vaccinioideae

Género: *Vaccinium*

Especie: *V. corymbosum*

3.1.3 Enfermedades del cultivo del arándano

El arándano es una especie vigorosa, presenta un rápido crecimiento y altos rendimientos, sin embargo, es una especie susceptible a varias enfermedades que se encargan de alterar su desarrollo, acortar su vida productiva y disminuir la calidad y cantidad de fruta. Entre los factores que favorecen el desarrollo de las enfermedades se encuentran; la alta densidad de plantas que se encuentran en los huertos y los altos niveles de nutrientes que son utilizados para obtener el máximo rendimiento, estas prácticas facilitan el establecimiento y la propagación de enfermedades. Por lo que se hace necesario el conocer las patologías de este cultivo, con el fin de prevenir el establecimiento de las enfermedades y evitar que vuelvan improductivo el huerto. Para poder poner en práctica cualquier estrategia de control debemos realizar primero un diagnóstico de la enfermedad y así tomar medidas adecuadas para el control de dicha enfermedad (Undurraga *et al.*, 2013).

3.1.4 Enfermedades presentes en México

En cuanto a enfermedades causadas por bacterias tenemos aquellas asociadas a la Agalla de la raíz o corona (*Rhizobium radiobacter* o *Agrobacterium tumefaciens*) y Fitoplasmas (Cisternas, 2009; Rodríguez, 2020).

Respecto a hongos del suelo que afectan a las raíces, como: *Phytophthora cinnamomi* o *Rhizoctonia* spp., enfermedades de la madera como el plateado ocasionado por *Chondrostereum purpureum*, hongos foliares como la roya causada por *Thekopsora minima* y pudrición de frutos ocasionados por *Alternaria alternata* y *A. cantlous*, o el moho gris causado por *Botrytis cinerea*, siendo esta última causante de importantes pérdidas económicas en las regiones de producción de México, afectando cantidad y calidad de producción, además, de que cada año se ha vuelto más difícil su control debido a que *B. cinerea* posee gran capacidad para generar resistencia hacia los fungicidas químicos, y a que

el uso de fungicidas para su control es cada vez más restringido en los frutos para exportación (Calvo, 2013; Rodríguez, 2020; Retamales y Hancock, 2018).

3.2 Moho gris *Botrytis cinerea*

El hongo *B. cinerea* es considerado como un fitopatógeno necrotrófico, debido a ocasionar la muerte de su hospedero tomando todos los nutrientes que necesita para desarrollarse. Es considerado como uno de los fitopatógenos más importantes debido a que afecta más de 200 especies como frutales, hortícolas y ornamentales en todo el mundo (Rodríguez, 2020; Calvo, 2013; Nakajima, 2014, Hua *et al.*, 2018).

Su desarrollo óptimo se da principalmente en regiones templadas y subtropicales con temperaturas que oscilan entre los 15 y 25°C, sin embargo, este patógeno soporta temperaturas bajas de hasta 0°C, por lo que, en última instancia, el factor con mayor importancia para un óptimo desarrollo de esta enfermedad es la humedad relativa, con valores altos favorece la enfermedad (Rodríguez, 2020; France, 2013; Turechek *et al.*, 2006).

Además, se trata de un hongo saprófito el cual es muy importante como patógeno de postcosecha, ya que se alimenta de desechos orgánicos, lo que significa que también puede afectar a cosechas que ya han sido recolectadas y disminuye la vida de anaquel y calidad de los frutos con considerables daños económicos (Rodríguez, 2020; Vázquez, 2019; Koike y Bolda, 2016).

Afecta también diferentes estados fenológicos de las plantas, puede ocasionar la muerte de ramas y hojas jóvenes, afecta las flores y frutos, también puede desarrollarse en semillas que se convierten en futuras fuentes de inóculo del fitopatógeno (France, 2013; CANNA, 2022; Ramírez *et al.*, 2019), el cual comienza a desarrollarse una vez que se presenten las condiciones adecuadas, esto suele ser cuando la semilla comienza a germinar. Cuando se presenta este hongo en la semilla afecta la viabilidad de esta, ocasionando su muerte poco después de germinar o ni siquiera llega a hacerlo (CANNA, 2022).

B. cinerea es el patógeno de mayor importancia en el cultivo del arándano debido a la pérdida económica que es causada por deterioro en postcosecha puede llegar hasta a un 65% del total de fruto, por lo que se debe recurrir a su control en pre y postcosecha (Medina, 2014; Gepp *et al.*, 2012; Figueroa *et al.*, 2010).

3.2.1 Clasificación taxonómica

Según el ITIS (2022) la clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* es la siguiente:

Súper reino: Eucaryote

Reino: Fungi

Division: Amastigomycoa

Subdivision: Deuteromycota

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyphomycetide

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *cinerea*

3.2.2 Características morfológicas

El género *Botrytis* se encuentra clasificado dentro de los hongos superiores los cuales presentan micelio septado y quitina en la pared celular. Pertenece al orden Moniliales esto indica que las esporas asexuales se encuentran libres en el ambiente y se forman sobre las hifas, es un hongo imperfecto u hongo asexual ya que está ubicado en la subdivisión Deuteromycotina (AGRIOS, 2004).

B. cinerea es un hongo filamentoso, suele comenzar con colonias de color blanco que tornan a un color castaño claro, están formadas por un micelio hialino, septado y ramificado. Posee conidióforos ramificados de forma erecta, de color gris (AGRIOS, 1996). Bajo el microscopio, se observa que las células conidiogénicas se encuentran en el ápice de los conidióforos dando origen a gran cantidad de conidias hialinas, unicelulares, ovoides a elipsoidales (10-12 x 8-10 µm de largo x ancho). Además, en ocasiones posee la capacidad de producir esclerocios constituidos por filamentos de micelio entrelazado, de superficie irregular, consistencia dura y color negro, estos son considerados como estructuras de resistencia ya que sobreviven en condiciones climáticas adversas (AGRIOS, 1996 y Latorre, 2015; INIA, 2017), como temperaturas entre -2 °C y +33 °C (INIA, 2017).

3.2.3 Ciclo de reproducción

Cuando se presentan las condiciones óptimas para su desarrollo, el esclerocio desarrolla en un micelio que posteriormente desarrolla conidióforos y conidias que son las estructuras reproductivas asexuales. Estas esporas dan origen a la infección primaria, por lo general se diseminan por el viento hacia sus hospederos, una vez que entran en contacto con el hospedero proceden a colonizar cualquier tejido de la planta, exceptuando las raíces (INIA, 2017).

3.2.4 Condiciones favorables para su desarrollo

El desarrollo de *B. cinerea* se favorece por factores como temperatura, para un desarrollo favorable de conidias la temperatura debe oscilar entre los 10 a 15 °C con un como óptimo de 20 °C (Latorre, 2015). Mientras el rango óptimo de temperatura para la producción de esclerocios es de 11 a 30 °C y para la esporulación es de 12 a 22 °C (Villalobos, 2006).

La humedad relativa alta es otro de los factores, si es mayor a un 95% bajo condiciones de lluvia, llovizna, rocío o neblina densa (Apablaza, 2000) y la presencia de agua libre sobre los tejidos vegetales ya que la germinación de conidias es mínima en ausencia de agua libre (Latorre, 2015).

El hongo puede vivir a expensas de tejidos sanos o como saprofito en los restos de tejidos en descomposición, con lo cual se hacen mayores las posibilidades de reproducción (INIA, 2017).

Las lluvias de primavera y verano, las sobredosis de nitrógeno, una nutrición desequilibrada, daño por heladas y heridas ayudan a favorecer al hongo, el cual en condiciones óptimas tiene un periodo de incubación de 15 horas (INIA, 2017).

3.2.5 Síntomas y signos

Las infecciones causadas por *Botrytis* por lo general no son visibles, estas se aprecian hasta las dos o tres semanas después de la infección. El patógeno puede atacar hojas, pecíolos de las hojas, flores, frutos, yemas, brotes y plántulas, causando necrosis. El síntoma principal puede observarse en el tejido donde se desarrolla en frutos maduros y corresponde a una podredumbre blanda debido a la muerte de las células del hospedero, acompañada de micelio y conidios que se presentan con un color grisáceo que le dan el nombre de moho gris a la enfermedad. Los frutos que ya fueron cosechados son muy susceptibles a una infección por *B. cinerea*, y de ser posible esta se disemina con facilidad (France, 2013).

En los tallos y ramas de las plantas puede producir lesiones de coloración café en forma de anillos, que ocasionan la muerte del tallo o de la rama. Estos síntomas se pueden observar con mayor frecuencia en brotes nuevos, sobre todo si hay excesos de nitrógeno o crecimientos tardío. En los tejidos muertos en ocasiones se pueden encontrar esclerocios (Villalobos, 2006).

3.3 Métodos de control

Al momento de iniciar una estrategia de control se debe establecer un programa de manejo de la enfermedad, que incluya los diferentes tipos de control como son el control químico, cultural y biológico, esto con la finalidad de ayudar al agricultor a que mantenga niveles óptimos de rentabilidad, evitar daños al medio ambiente y a la salud, así mismo, disminuir las pérdidas ocasionadas por enfermedades (Koike, 2016).

3.3.1 Control químico

Para combatir a *Botrytis* es necesario hacer un uso adecuado de productos, dejando a los fungicidas de síntesis química para momentos críticos de la infección e integrar otras medidas que disminuyan la cantidad del inóculo, se deben programar las aplicaciones (preventivas) para maximizar la protección de las flores nuevas y recién abiertas. *Botrytis* destaca por perder sensibilidad a fungicidas, a causa de su alta variabilidad genética, debido a que posee ciclos múltiples de producción de esporas (abundancia) y desarrollo de la enfermedad. Se han registrado a nivel mundial cepas de este hongo resistentes a casi todos los fungicidas con modos de acción de sitio único. Ingredientes activos como: boscalid, piraclostrobin, pentiopirad, fluxapiroxad y metil tiofanato no son efectivos en el control de este hongo. Con algunos otros como: Ciprodinil + Fludioxonil, Pirimetanil e Iprodiona se han obtenido resultados satisfactorios en el control de este patógeno, sin embargo, hay que tener cuidado con el uso de estos productos de síntesis química, ya que existen algunas restricciones en los mercados (Fernández-Ortuño *et al.*, 2017; Rodríguez, 2020; Shao *et al.*, 2021).

En el control químico podemos recurrir a diversos tipos de fungicidas, aquellos que actúan como inhibidores de la síntesis de lípidos, los que cuentan con acción multisitio, inhibidores de proteínas y aminoácidos, y algunos otros mecanismos como inhibidores de síntesis de metionina o el control osmótico. El uso de estos productos en el momento oportuno como lo son los estados iniciales de la

infección o mejor aún de manera preventiva son más efectivos que una aplicación en presencia de alta cantidad de inóculo del patógeno en campo. Hay que tener en cuenta que el uso de productos sistémicos genera en la planta la necesidad de ser metabolizados; por consiguiente, implican un gasto energético y aumentan el estrés en la planta (SYNGENTA, 2018).

Para prolongar su vida de anaquel los frutos requieren de aplicaciones de fungicidas de síntesis química en precosecha y postcosecha ya que, *B. cinerea* causa daños como pérdida de firmeza, color y sabor, lo que contribuye en el incremento de los costos de producción (Esmel *et al.*, 2004). Estos métodos aparentemente efectivos son a los que se recurre principalmente debido a su fácil adquisición (Castaño, 2002), sin embargo, presentan riesgos que dan como resultado graves consecuencias ecológicas, originando cepas más resistentes, contaminación al medio ambiente por su uso y aplicación inadecuada, un incremento de los costos de producción, además de limitantes en mercados de exportación, problemas de salud en los seres humanos debido a que presentan una serie de riesgos toxicológicos sobre la salud humana y el medio ambiente (Wisniewsky *et al.*, 2007; López, 2007; Ghorbani *et al.*, 2008).

El realizar una rotación de aplicaciones de fungicidas con distintos modos de acción y disminuir la repetición de los mismos productos se evita el aumentar la presión selectiva y la fomentación del desarrollo de resistencia (Li *et al.*, 2019).

3.3.2 Control cultural

Existen medidas culturales que ayudan a disminuir la intensidad de la enfermedad, por ejemplo: evitar que el fitopatógeno entre en contacto con la planta, nivelar el terreno y garantizar buen drenaje con el fin de mantener condiciones adecuadas de humedad, disminuir posibles fuentes de inóculo del suelo mediante fumigación química (Piclor, Metam sodio, etc.), desinfección anaeróbica de suelo, solarización o biosolarización y pasteurización con vapor de agua (Williamson, 2007), uso de variedades resistentes o tolerantes y plantas provenientes de viveros libres de *B. cinerea*, un buen manejo de la aireación y

de la luminosidad del invernadero o de la misma planta mediante desojos (Rodríguez, 2020), mantener una nutrición balanceada controlando los niveles de nitrógeno, ya que los niveles elevados de este elemento favorecen la proliferación de esta enfermedad (Williamson, 2007), eliminar posibles hospederos alternos que sirvan como fuentes de inóculos principalmente las malezas, eliminar los restos de cultivo y plantas o frutos afectadas por la enfermedad (Rodríguez, 2020), el uso cubiertas plásticas con absorción de luz ultravioleta reducen la esporulación y la tasa de colonización (Reuveni y Raviv, 1992).

Independientemente del uso de fungicidas de síntesis químicas existen otros compuestos con propiedades fungicidas que son utilizados sin problemas en la agricultura orgánica como lo son; el peróxido de hidrógeno, extractos vegetales, microorganismos benéficos (Rodríguez, 2020), y algunos biopolímeros como el quitosano (Ramírez, 2010).

3.3.3 Control biológico

En la actualidad se han reportado diferentes hongos antagonicos de fitopatógenos, entre los géneros más empleados se citan a; *Gliocladium* y *Trichoderma* este último con mayor frecuencia para controlar fitopatógenos del suelo. Entre las características que destacan del género *Trichoderma* es su rápido desarrollo, razón por la que compite por el espacio de la rizosfera con los fitopatógenos. Además, tiene la capacidad de producir sustancias antibióticas que inhiben el crecimiento del patógeno (Poveda *et al.*, 2019). Puede hacer simbiosis con las raíces de las plantas y así protegerla del ataque de patógenos (Arbitto, 2017), además, de que ayuda a la planta bajo condiciones de estrés (Poveda *et al.*, 2019).

Otros hongos que se han registrado son: *Coniothyrium* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Verticillium* spp., y algunas bacterias (Yousseff, 2019).

Rodríguez (2020), recomienda hacer aplicaciones semanales de extractos naturales y cuidar el período de residuo. Así mismo, mantener aplicaciones de

microorganismos benéficos (*T. harzianum*, *Metarhizium anisopliae*, *Streptomyces* spp., *Bacillus subtilis*, *Clonostachys rosea*) para el control de *B. cinerea*. El género *Bacillus* es considerado como uno de los más importantes en el control biológico y debido a sus mecanismos de acción que han demostrado ser eficientes para controlar a *B. cinerea* en diversos tipos de cultivos (Bocanegra, 2021; Lisboa, 2003).

3.3.4 *Bacillus subtilis*

En género *Bacillus* es considerado como una bacteria aerobia y en ocasiones anaerobio facultativo, de forma bacilar con flagelos y tamaño variable (0.5 a 10 µm), Gram positiva, con un desarrollo óptimo a pH neutro, un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011), tiene capacidad para producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés (Calvo y Zúñiga, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Se ha registrado que una gran cantidad de especies del género *Bacillus* presentan actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), entre las más comunes se mencionan a las especies *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Estas especies poseen la capacidad de evitar el establecimiento y el desarrollo de microorganismos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos de acción como; la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas (quitinasas), toxinas e inducir la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Compant *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011), competencia por espacio y nutrientes (Compant *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2010). Además, otro beneficio es que promueven el crecimiento vegetal debido a la producción de algunas hormonas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

3.4 Biopolímeros con actividad antifúngica (quitina y quitosano)

3.4.1 Quitina

El quitosano es considerado como un biopolímero que posee diversas cualidades, siendo una de ellas su actividad antimicrobiana (Ganan *et al.*, 2009; Pillai, 2009; Kong *et al.*, 2010). Para su obtención primeramente se debe de extraer la quitina, la cual es un compuesto orgánico constituido por unidades de poli [β -(1-4)-2 acetamida-2-desoxiD-glucopiranosas] (Fig. 1), siendo este el biopolímero más abundante en la naturaleza solo por detrás de la celulosa (Espinosa-Cavazos *et al.*, 2020), el cual se obtiene principalmente del exosqueleto de artrópodos, tales como langosta, cangrejo y camarón. Recientemente el uso de la quitina y sus derivados, se ha vuelto atractivo debido a que no son tóxicos, alérgicos, además, de ser una fuente naturalmente renovable, biodegradable y con actividad antimicrobiana (Pillai, 2009).

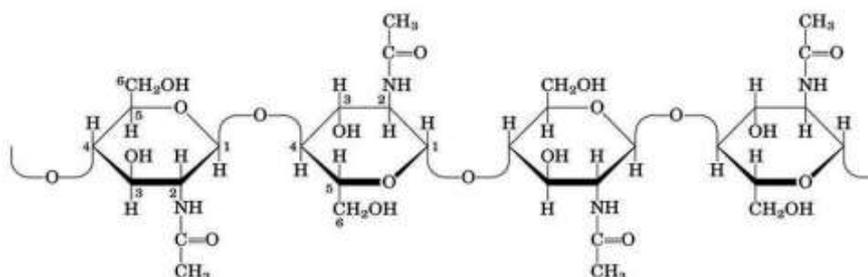


Figura 1. Estructura química de la quitina (Marmol *et al.*, 2011).

La quitina posee una estructura lineal que la hace incapaz de ser soluble en agua debido a la alta cantidad de puentes de hidrógeno entre las cadenas de α -quitina que se forman, esta característica es una de sus principales limitantes para sus aplicaciones, otra característica de gran importancia es su alto peso molecular siendo mayor a $1000 \times 10^3 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Espinosa *et al.*, 2020).

Para la extracción de la quitina existen diversos métodos siendo los principales el método químico y las fermentaciones con bacterias.

Extracción química:

El método químico consiste en separar la quitina de otros compuestos (minerales, proteínas, pigmentos, etc.) mediante los pasos de: desproteínización, desmineralización y decoloración, mediante tratamientos con álcalis y ácidos fuertes, y a distintas temperaturas. El proceso de obtención de quitina inicia con el secado y molienda de los exoesqueletos, después se someten a un proceso de hidrólisis ácida (ácido clorhídrico) para convertir a los carbonatos en cloruros y solubilizar los minerales, principalmente el calcio (Marmol *et al.*, 2011). Posteriormente, se filtra para separar el líquido del sólido (partículas de exoesqueletos), el cual se somete a una hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio (NaOH) (Synowiecki *et al.*, 2003; Marmol *et al.*, 2011) o hidróxido de potasio (KOH) (Synowiecki *et al.*, 2003) con la finalidad de romper la estructura y volver a las proteínas solubles, arrastrando las grasas y pigmentos que componen el caparazón (Marmol *et al.*, 2011), la eficacia de la desproteínización se ve influenciada por la temperatura, la concentración del álcali y la proporción del desecho en solución (Synowiecki *et al.*, 2003). Es así como después de estas dos etapas se obtiene la quitina en polvo (Marmol *et al.*, 2011).

Sin embargo, este método posee algunas desventajas como lo son; contaminación ambiental, alta consumo de energía y que el polímero obtenido presenta inconsistencias en sus propiedades finales (Beaney *et al.*, 2005).

La despigmentación de la quitina solo se lleva a cabo cuando se requiere un producto completamente puro, pues el pigmento no influye en el comportamiento y propiedades del polímero en solución. En dichos casos que se requiera realizar este proceso se utilizan soluciones de hipoclorito de sodio, acetona absoluta, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos (Synowiecki *et al.*, 2003; Percot *et al.*, 2003).

Fermentación bacteriana:

La quitina también se puede extraer mediante procesos biológicos como la fermentación bacteriana (Gamal *et al.*, 2016), donde se utilizan microorganismos principalmente bacterias (*Bacillus* spp., *Bacillus firmus*, *B. subtilis*) para la producción de enzimas (Yang *et al.*, 2000). Las enzimas proteolíticas pertenecientes a *Pseudomonas maltophilia*, *B. subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaeus* y *Aspergillus oryzae* han sido utilizadas para desproteinización de desechos de camarón. Aunque este método no es capaz de remover por completo las proteínas, sin embargo, el restante se remueve cuando se produce el quitosano (Bustos *et al.*, 1994).

Fermentación Ácido Láctica:

La fermentación ácido láctica es un proceso celular anaeróbico que requiere de un periodo de varios días (aproximadamente una semana) (Pasotti *et al.*, 2020), donde se utilizan bacterias ácido lácticas, una fuente de carbono (glucosa) para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. El ácido láctico producido por las bacterias disminuye el pH de manera rápida y reacciona con el carbonato de calcio presente en los exoesqueletos produciendo lactato de calcio y precipitándose, esto puede ser removido mediante lavados. Al mismo tiempo se lleva a cabo la desproteinización. De manera similar que en el método anterior este método ayuda a reducir los riesgos de contaminación ambiental, además, se recuperan otros compuestos de valor (Urribarri, 2004; Parra 2009: Pasotti *et al.*, 2020).

Las principales bacterias productoras de ácido láctico se encuentran dentro de las familias Streptococcaceae (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y Lactobacillaceae (*Lactobacillus*) (Ramírez *et al.*, 2011; Estela *et al.*, 2007; Vásquez *et al.*, 2009).

3.4.2 Quitosano

El quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina, además, este biopolímero posee mejores propiedades de solubilidad y reactividad. Para su obtención se deben sustituir los grupos acetamido de la quitina por grupos amino, principalmente con tratamientos de álcalis fuertes (Lárez, 2006). El quitosano está constituido por cadenas lineales de unidades de glucosamina (β -(1-4)-D-glucosamina) y en menor medida de N-acetil D-glucosamina (β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina), destacando la presencia de grupos funcionales como el hidroxilo y el amino. Asimismo, posee una alta densidad de cargas positivas, por lo que es considerado un polication con habilidad para unirse a moléculas con carga negativa (Zhang *et al.*, 2011).

El peso molecular del quitosano presenta una influencia en su actividad biológica, posee carga positiva ya que sus grupos aminos son desprotonados (Shahidi *et al.*, 1999; Rabea *et al.*, 2003).

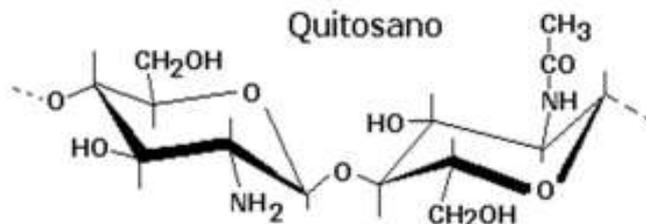


Figura 2. Estructura del quitosano (Marmol *et al.*, 2011).

Debido al grupo amino que lo compone el quitosano también atrapa metales pesados de insecticidas y policarborunados. El quitosano se utiliza comercialmente en diferentes industrias como: farmacéutica, cosmetóloga, médica, biotecnológica, alimentaria y agrícola. En los últimos diez años se ha incrementado el número de estudios enfocados a estudiar las aplicaciones del quitosano en la agricultura (Bautista, 2005).

3.4.3 Métodos de obtención del quitosano

Como se ya se mencionó anteriormente la obtención del quitosano se produce por la desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos (Arbia *et al.*, 2013; Colina, 2014). El método químico puede llevarse a cabo de dos diferentes formas, homogénea y heterogénea (Hernández, 2009; Estrada *et al.*, 2012).

En la desacetilación homogénea la quitina es suspendida en el álcalis y refrigerada con hielo para que se disuelva en la solución, luego se somete a desacetilación con bajas temperaturas o temperatura ambiente durante periodos prolongados de tiempo de esta manera se asegura que la reacción sea uniforme y se obtiene una distribución de grupos acetyl arbitraria (Nemtsev *et al.*, 2002).

En la desacetilación heterogénea las moléculas de quitina son dispersadas en una solución alcalina caliente, por lo general se utiliza NaOH, utilizando altas temperaturas (100- 140 °C) para reducir la longitud de la cadena, se recomienda repetir el tratamiento alcalino por periodos cortos de tiempo y aislar el producto en cada etapa. Para evitar la despolimerización es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante y así disminuir la pérdida de peso molecular del polímero (García *et al.*, 2008).

El método químico presenta grandes desventajas como el consumo de considerables cantidades de energía, el desperdicio de altas concentraciones de soluciones alcalinas y el hecho de que los pesos moleculares fluctúan con heterogénea disposición de grupos acetylados en la molécula, dependiendo de la desacetilación usada (Pacheco, 2010).

También se puede obtener el quitosano mediante método enzimático, para lo cual la quitina se somete a un proceso de desacetilación con una enzima utilizando las condiciones apropiadas para conservar la enzima sin desnaturalizarla. Las enzimas empleadas son: la quitina desacetilasas producida por algunos microorganismos (Zygomycetes, Deuteromycetes, Lindemuthianum) o las enzimas comerciales (papaína, alcalasa, neutrasa y tripsina) (Argüelles, 1993), mediante este método se obtiene un material uniforme

en sus propiedades físicas y químicas. La limitación de este método es que debe llevarse a cabo un pre tratamiento ya que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de quitosano insoluble (García *et al.*, 2008).

Existen otros métodos como lo es la irradiación de microondas, la cual consiste en someter la quitina a una desproteínización, mediante el uso de microondas con una solución digestora al 1% (p/v) de aceite vegetal saponificado, 1% de dodecil sulfato de sodio (p/v) y 0.25% de carbonato de sodio (p/v) (Sagheer, 2009). Este método ha demostrado ser más eficaz y rápido, manteniendo su grado de polimerización manifiesto a través de su masa molecular (MM) (Liu, 2004). Otro método es el uso de ultrasonido el cual elimina proteínas (Gunnar, 2008). Las ondas ultrasónicas se utilizan para eliminar y refinar los grupos acetilo de la quitina y a su vez aumentar el grado de desacetilación (mayor al 95%) ya que pueden mejorar la transferencia de masa por causas de cavitación causando temperaturas y presiones extremas en el líquido donde ocurre la reacción y pueden acelerar esta reacción. Este método es efectivo para aumentar la calidad y la producción de quitosano (Nurshuhada, 2008).

3.4.4 Modo de acción del quitosano

El quitosano presenta distintos modos de acción en contra de bacterias y hongos, uno de ellos es que éste se une a la pared celular de los microorganismos mediante la atracción de su carga positiva con la carga negativa del microorganismo, ocasionando una desestabilización la pared celular, lo que favorece la entrada y salida de compuestos celulares esenciales (Liu *et al.*, 2004; Ganán *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Bautista-Baños *et al.*, 2016).

Con esta interacción electrostática, que depende de la composición de la membrana plasmática, puede haber afinidad elevada en membranas sensibles que contienen ácidos grasos poliinsaturados (Dutta *et al.*, 2009; Palma-Guerrero *et al.*, 2010).

De igual manera, en bacterias Gram positivas el polímero se une a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos que están ubicados en la pared celular, alterando la interacción entre ésta y la membrana celular, impulsando la salida de compuestos esenciales celulares y el desbalance osmótico de la célula (Raafat *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2010; Verlee *et al.*, 2017).

En bacterias el quitosano puede actuar en la pared celular y membranas de bacterias gran positivas y negativas, mediante graves desequilibrios celulares de omeostasia iónica de K^+ y Ca^{2+} causando la salida de pequeñas moléculas como; fosfatos nucleótidos y sustrato de reacciones enzimáticas que afectan la respiración (Raafat *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2013).

En los hongos, el quitosano también puede penetrar al interior del núcleo celular e interfiere en la síntesis de mRNA y proteínas (Henics & Wheatley, 1999; Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2016); además, actúa como agente quelante de metales y nutrientes esenciales, causando inanición en los hongos y, por lo tanto, produciendo inhibición en el crecimiento (Ren *et al.*, 2012).

3.4.5 Uso del quitosano en la agricultura

Se ha demostrado que el quitosano posee diferentes beneficios que van desde su efecto fungicida, la inducción de la resistencia sistémica de las plantas para que responder de manera más rápida ante fitopatógenos, puede funcionar como recubrimiento de frutos en postcosecha (Rabea *et al.*, 2003; Synowiecki *et al.*, 2003), actúa como regulador de crecimiento de las plantas. Debido a esto presenta un gran potencial de aplicación en la agricultura, por lo cual, es importante su estudio como un método alternativo al uso de agroquímicos (Ramírez, 2010).

Desde hace tiempo se ha demostrado que la actividad inhibitoria del quitosano en contra de diversos hongos como: *Botrytis cinerea*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Trichophyton equinum*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, entre otros (Plascencia *et al.*, 2003).

3.4.6 Beneficios del quitosano

Las propiedades específicas del quitosano lo hacen útil a nivel industrial: en la agricultura, por ejemplo, se puede hacer uso de su acción antimicrobiana, a diferencia de la quitina el quitosano es soluble en medio acuosos y debido a esto se le confiere mayor actividad biocida (Papineau *et al.*, 1991).

Posee actividad fungicida inhibiendo a una gran cantidad de especies de hongos, aunque tiene una menor eficacia con aquellas especies que lo poseen en sus paredes celulares, para una efectividad positiva se debe encontrar la dosis adecuada para cada situación (Roller y Covill, 1999).

La aplicación de quitosano ha demostrado que estimula el crecimiento de las plantas, desde la germinación de semillas, hasta el crecimiento de raíces, hojas y rebrotes (Bhaskara *et al.*, 1999).

Activa los mecanismos de defensa y resistencia de las plantas, mediante la estimulación de la producción de quitinasas y glucanasas, lignificación en hojas dañadas y producción de peróxido de hidrogeno (Pearce y Ride, 1982).

Tiene alta compatibilidad con microorganismos benéficos ya que favorece su crecimiento y desarrollo, los ayuda a establecer relaciones simbióticas con las plantas (micorrizas y *Rhizobium*). También ayudan a incrementar la población microbiana, así como su actividad en el suelo, esto mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades (Zulay, 2011).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), con sede en Saltillo, Coahuila, ubicada en las coordenadas geográficas 25° 21' 13" latitud N y 101° 1' 56" longitud oeste, a una altura de 1,742 msnm.

4.2 Material biológico

Las cepas de *Bacillus subtilis* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología de la UAAAN, las cuales fueron reactivadas en medio de cultivo Agar nutritivo (AN).

4.2.1 Obtención de quitosano

El quitosano se obtuvo mediante el método utilizado por Gamal *et al.*, (2016) con ligeras modificaciones, para ello se recolectó cáscaras de camarón sin la cabeza, se secaron al sol por tres días y se molieron hasta obtener polvo fino, el cual se pasó por un tamiz de 100 mallas/cm. El polvo de cáscara de camarón fue sometida a degradación mediante fermentación aeróbica con *B. subtilis*, para ello se preparó medio de cultivo compuesto por 5 g de cáscara de camarón, 0.5 g de sulfato de magnesio y 1 g de sulfato de potasio por cada litro de agua destilada, posteriormente, se colocaron 350 ml de este medio en matraces bafleados de capacidad de un litro, los cuales se esterilizaron a 15 psi por 18 minutos en

autoclave. Una vez enfriado se inocularon con *B. subtilis* y se incubó durante 15 días en agitación constante a 150 rpm a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Pasado este tiempo se filtró el caldo de cultivo en papel filtro y recuperar los sólidos de la degradación con quitina. La quitina se transformó a quitosano mediante la metodología empleada por Sedaghat *et al.*, (2015) con ligeras modificaciones, para esto la quitina obtenida se sometió a una desacetilación con NaOH al 50% en relación 1- 10, durante 10 horas a 100°C en agitación constante en una placa de termoagitación, en seguida se filtró para separar el líquido del sólido, el cual se lavó con agua destilada hasta obtener un pH cercano a 7. El polvo obtenido se dejó secar a temperatura ambiente por 48 h, posteriormente, este se disolvió a una concentración del 2% en agua destilada a un pH de 5.5 acidificada con ácido acético, al disolverse este polvo en solución se le considerada como quitosano el cual será denominado como “Q-BS” para fines de esta investigación. En la figura 6 se puede apreciar como el quitosano es soluble en agua mientras que la quitina se precipita sin mezclarse.

4.2.2 Aislamiento e identificación de *Botrytis cinerea*

Se recolectaron muestras de flores y frutos de arándanos con signos de moho gris (Fig. 3 A- D) provenientes de parcelas comerciales de Santa Clara del Cobre del estado de Michoacán.

Dichas muestras fueron trasladadas en hieleras al Laboratorio de Microbiología para el aislamiento e identificación del fitopatógeno causante de la enfermedad. Se transfirieron directamente porciones de micelio del fitopatógeno a cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), las cuales se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 días, posteriormente se purifico mediante la técnica de cultivo monospórico utilizando la técnica descrita por Gómez (2014) con modificaciones, de una caja petri con el hongo esporulado se pasó una asa bacteriológica para tomar las conidios del hongo, las cuales se transfirieron por estría a medio de cultivo Agar Agua (AA), al observarse el desarrollo originado por una espora este

se transfirió a una caja petri con medio de cultivo PDA, la cual se incubó por 7 días para su posterior utilización.

La identificación morfológica del hongo se realizó mediante observaciones microscópicas de preparaciones con azul de lactofenol de muestras de micelio y estructuras reproductivas del hongo vistas en un microscopio compuesto (Motic BA210E) y ser comparadas con las descritas por las claves taxonómicas de Barnett & Hunter, (1972).



Figura 3. Daños causados por *Botrytis*. A) Necrosis en brotes, flores y frutos por *B. cinerea*. B) Micelio y conidios acompañados de lesiones de color café en flor C) Podredumbre blanda acompañada de micelio y conidios en fruto. D) Fruto afectado por el patógeno.

4.2.3 Prueba de patogenicidad

El fitopatógeno aislado de flores y frutos de arándanos se sometió a prueba de patogenicidad (Fig. 4 A- C) siguiendo la metodología empleada por Terrones-Salgado *et al.*, (2019) con modificaciones, para esto se preparó una solución de 1.2×10^7 de esporas del fitopatógeno (Fig. 4 A), en la cual se sumergieron por tres minutos frutos de arándanos, los cuales habían sido desinfectados con anterioridad en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % por dos min y lavados con agua destilada estéril en tres ocasiones para retirar el exceso de NaClO. Posteriormente, se colocaron sobre papel estéril para retirar el exceso de humedad (Fig. 4 B) y ser transferidos en grupos de nueve arándanos a bandejas de plástico estériles (Fig. 4 C) e incubados a 28 ± 2 °C por ocho días. Se realizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos (frutos inoculados y frutos testigos sin inocular) y tres repeticiones por tratamiento. La evaluación se realizó de manera visual al observar la incidencia (crecimiento de micelio) del hongo sobre los frutos. Una vez realizada la evaluación se prosiguió al reaislamiento del fitopatógeno para completar los postulados de Koch.

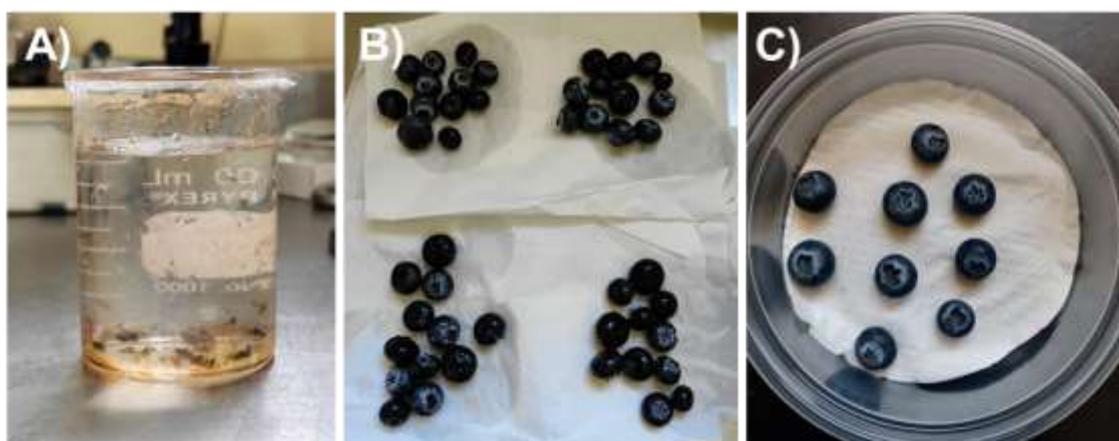


Figura 4. Prueba de patogenicidad de *Botrytis cinerea* en frutos de arándanos. A) Solución de esporas de *Botrytis* a una concentración de 1.2×10^7 . B) arándanos inoculados con *Botrytis* sobre papel estéril para retirar el exceso de humedad. C) Tratamiento de nueve arándanos inoculados con *Botrytis*.

4.3 Pruebas de inhibición *in vitro* de quitosano y *Bacillus subtilis* en contra de *Botrytis cinerea*

4.4 Preparación de los tratamientos de quitosano “Q-BS”

Se empleó la técnica de medio de cultivo suplementado con quitosano, para ello, se prepararon placas petri con medio de cultivo PDA el cual se suplementó con Q-BS a cuatro concentraciones para evaluar su actividad fungicida (Tabla 1), el medio de cultivo se ajustó a un pH de 6.5 y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 15 psi, una vez enfriado los medios de cultivo fueron vaciados en cajas Petri de 90 mm en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar para su posterior utilización.

Tabla 1. Tratamientos y dosis de quitosano

Tratamientos	Dosis de quitosano (%)
T4- Q-Bs	0.16
T3- Q-Bs	0.08
T2- Q-Bs	0.04
T1- Q-Bs	0.02
Testigo	0

4.5 Prueba de inhibición *in vitro* de quitosano “Q-Bs” en contra *Botrytis cinerea*

En el centro de las cajas Petri de cada tratamiento se sembró un explante de 5 mm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial de *B. cinerea* de cuatro días de incubación. Se realizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y un testigo sin quitosano (Tabla 1), con tres repeticiones por tratamiento, para un total de 15 unidades experimentales.

Los tratamientos se mantuvieron a una temperatura de 28 ± 2 °C y un fotoperiodo de 12:12 luz/oscuridad. Cada 24 h con ayuda de un Vernier digital marca Truper se midió en milímetros (mm) el diámetro de crecimiento del micelio del hongo de cada tratamiento, dado como finalizado el experimento al momento de que el tratamiento testigo llenó la caja Petri lo cual sucedió a las 144 horas. El crecimiento micelial se transformó a porcentaje de inhibición (%Inh), mediante la siguiente fórmula: $\%Inh = C - T/C \times 100$, donde C es el diámetro del testigo y T es el tratamiento (Castillo *et al.*, 2015).

Evaluación de la esporulación

Esta se evaluó a las 168 h de realizada la prueba de inhibición, para lo cual se cortaron dos cuadrantes de agar con micelio de *B. cinerea* de 1 cm² de la parte media del crecimiento de cada tratamiento, posteriormente, de manera individual los cuadrantes de agar con micelio del hongo de cada tratamiento se colocaron en tubos de Falcón de 50 ml a los cuales se les agregó 20 ml de agua destilada estéril, para enseguida ser triturado con una varilla de vidrio estéril, posteriormente los tubos se agitaron en un Vortex por un minuto antes de realizar el conteo de esporas. El conteo de las esporas se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer bajo observación al microscópio compuesto (40X). Los datos se analizaron tomando en cuenta el factor de la cámara Neubauer (50,000) y se ajustaron en número de conidios mL⁻¹ (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

4.6 Prueba de inhibición *in vitro* de *Bacillus subtilis* y su combinación con quitosano “Q-Bs” en contra de *Botrytis cinerea*

De igual manera que en la prueba anterior se prepararon cajas Petri con medio de cultivo PDA suplementado con Q-B a las mismas concentraciones, una vez solidificado el medio de cultivo se inoculó a *B. subtilis* en cada punto cardinal de las cajas Petri, para un total de cinco tratamientos (T1= *B. subtilis*, T2= Q-BS 0.02% + *B. subtilis*, T3= Q-BS 0.04 % + *B. subtilis*, T4= Q-BS 0.08% + *B. subtilis*, T5= Q-BS 0.16% + *B. subtilis*) y un testigo sin quitosano ni bacteria, con tres

repeticiones por tratamiento, para un total de 18 unidades experimentales. De igual manera que en el caso anterior, los tratamientos se mantuvieron a una temperatura de 28 ± 2 °C y un fotoperiodo de 12:12 luz/oscuridad. Cada 24 h se midió en mm el crecimiento radial del micelio del fitopatógeno de cada tratamiento, hasta que el tratamiento testigo llenó la caja Petri lo cual sucedió a las 144 horas. El crecimiento micelial se transformó a porcentaje de inhibición (%In), con la fórmula $\%In = C - T/C \times 100$ (Castillo *et al.*, 2015).

4.7 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa estadístico InfoStat versión 2019.1.2.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento e identificación del agente causal del moho gris de flores y frutos de arándano

De flores y frutos de arándano se logró el aislamiento de un hongo, cuyas características morfológicas fueron; micelio de color blanquecino al inicio (Fig. 5 A) y que da una coloración grisácea con el paso de los días (Fig. 5 B), hifas septadas hialinas y cafés (Fig. 5 C), conidióforos largos, septados y ramificados (Fig. 5 D), que terminan en forma de ampolla (Fig. 5 Ea), donde se originan conidias unicelulares alimonadas de paredes lisas de un diámetro de 9.7- 13.2 x 7.7- 9.8 μm largo- ancho (Fig. 5 Eb) que forman racimos (Fig. 5 F-G), dichas características concuerdan con las descritas para el género *Botrytis cinerea* concordando con las descritas por diversos autores (Barnett & Hunter, 1972; Rivera *et al.*, 2013; Ferrada *et al.*, 2016; Ferrada *et al.*, 2017; Terrones-Salgado *et al.*, 2019; Montiel-Frausto y Vásquez-López, 2021).

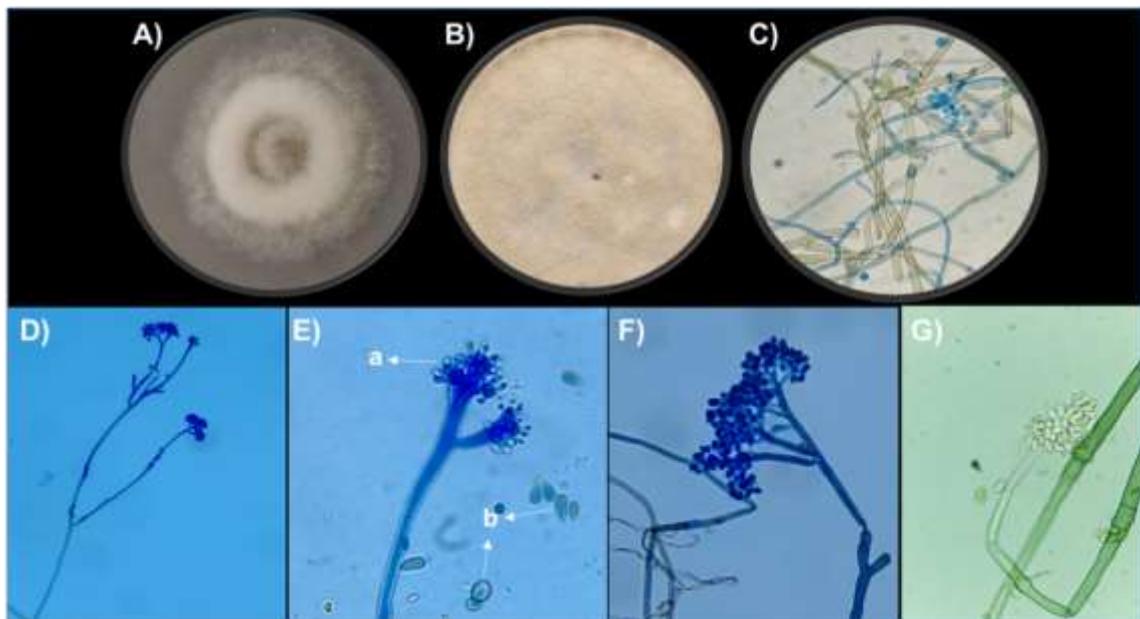


Figura 5. Características morfológicas de *Botrytis cinerea*. A) Crecimiento micelial blanquecino de cuatro días de edad. B) Crecimiento micelial de color gris de 8 días de crecimiento. C) Hifas septadas. D) Conidióforos largos y septados. E) a- Terminación del esporangioforo en forma de ampolla y b- conidias sueltas. F) Conidióforo con conidias formando racimos vistas al microscopio con filtro azul. G) Conidióforo hialinos con conidias formando racimos vistas al microscopio sin filtro.

5.2 Solubilidad de la quitina y del quitosano

Como resultado de la degradación bacteriana de cáscara de camarón con la bacteria *B. subtilis* se logró la obtención de sólidos de quitina insolubles en agua (Fig. 6 A), posteriormente, mediante su desacetilación con NaOH se logró obtener el quitosano, el cual a diferencia de la quitina si fue soluble en agua acidificada con ácido acético a un pH de 5.5, adquiriendo una consistencia viscosa (Fig. 6 B). Diversos autores señalan que para la obtención del quitosano debe de ocurrir una desacetilación de la quitina mayor al 50 %, y que su solubilidad está relacionada con su porcentaje de desacetilación, además, está dada por la protonación de sus grupos aminos libres en soluciones acidas (Cisneros *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2020; Pasotti *et al.*, 2020), lo cual concuerda con las características físicas viscosas del quitosano obtenido tal y como se muestra en la figura 6.

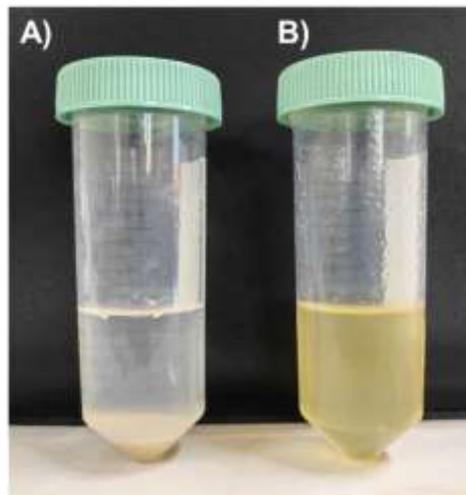


Figura 6. Diferencias entre solubilidad de quitina y quitosano. A) Quitina sin disolver en solución acidificada a pH 5.5 con ácido acético. B) Quitosano disuelto en solución acidificada a pH 5.5 con ácido acético.

5.3 Prueba de patogenicidad en arándanos inoculados con *Botrytis cinerea*

Los arándanos inoculados con *B. cinerea* a los ocho días después de la inoculación presentaron abundante crecimiento de micelio del fitopatógeno (Figura 7B), mientras que los tratamientos testigos no presentaron síntomas ni signos de la enfermedad (Fig. 7A). Por lo anterior se comprueba que *B. cinerea* es el agente causal de la enfermedad conocida como moho gris en frutos de arándano, al igual como lo describe Rivera *et al.*, (2013) al aislar a esta especie de hongo de frutos de arándano y comprobar mediante su reinfeción y aislamiento la recuperación del mismo fitopatógeno.

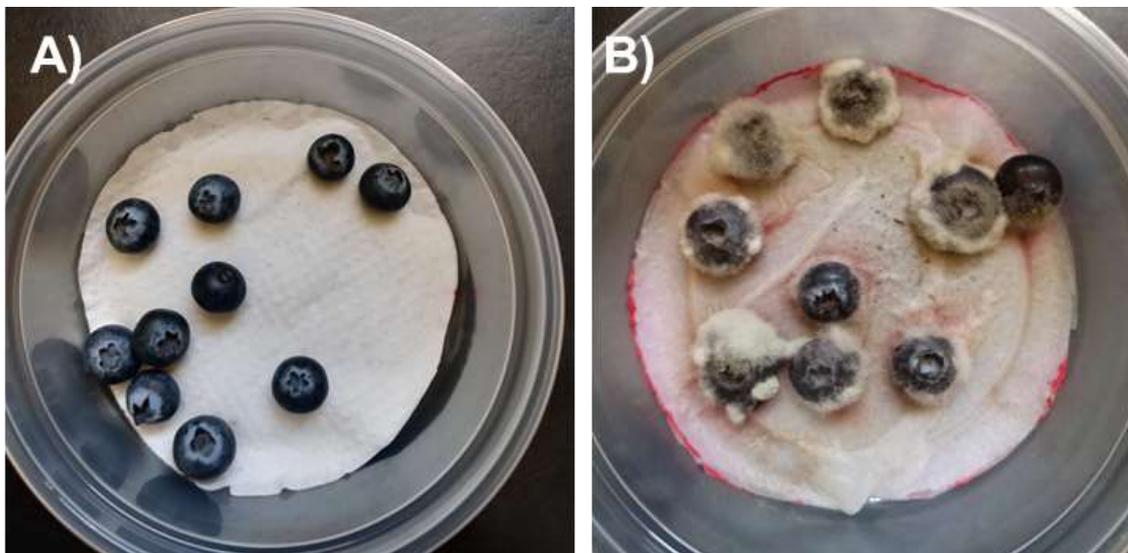


Figura 7. Prueba de patogenicidad de *Botrytis cinerea* en frutos de arándanos. A) Frutos de arándanos sin inocular (tratamiento testigo). B) Tratamiento de frutos de arándanos a los 12 días después de la inoculación con *B. cinerea*.

5.4 Prueba de inhibición *in vitro* de quitosano en contra *Botrytis cinerea*

En la prueba de inhibición *in vitro* de quitosano en contra de *B. cinerea*, se observó que Q-Bs presentó diferentes grados de inhibición a sus cuatro concentraciones, presentando diferencias significativas con el testigo, siendo la concentración más baja de quitosano (0.02%) la que obtuvo el menor porcentaje

de inhibición con apenas el 24.30%, y la concentración más alta (0.16%) la del mayor porcentaje de inhibición con un 51.13%, además, en la Tabla 2 y Figura 8 se puede observar que conforme aumentó la concentración de Q-Bs se incrementó el porcentaje de inhibición, siendo similar a lo reportado por Sandoval *et al.*, (2018), quienes reportan el mismo efecto inhibitorio para *B. cinerea*. Bautista-Baños *et al.*, (2016), aluden a que el efecto antimicrobiano del quitosano se debe a que este se une a la pared celular de los microorganismos mediante atracción electrostática de la pared celular del microorganismo, lo que ocasiona una desestabilización de la pared, favoreciendo la entrada y salida de compuestos celulares esenciales. Por su parte Kraśniewska y Gniewosz (2012), mencionan que el efecto inhibitorio del quitosano se debe a que este biopolímero rodea a la célula formando una película que impide la disponibilidad de los nutrientes. Mientras que Gutiérrez-Martínez *et al.*, (2016) mencionan que este biopolímero además puede penetrar al interior del núcleo celular e interferir en la síntesis de mRNA y proteínas.

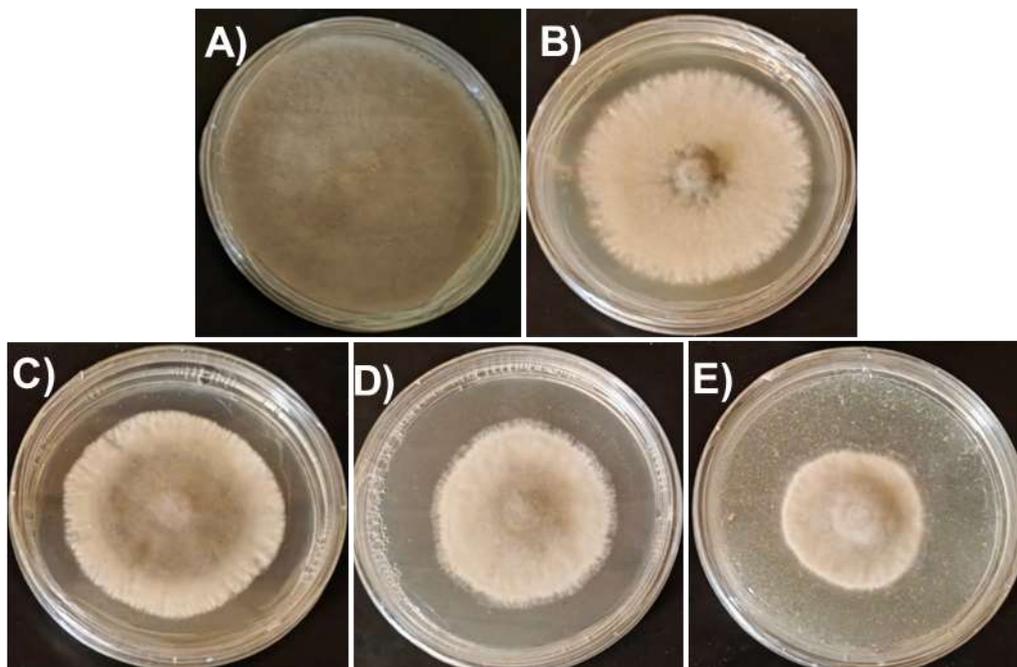


Figura 8. Inhibición *in vitro* de quitosano “Q-Bs” en contra de *B. cinerea*. A) Tratamiento testigo. B) T1= Q-Bs al 0.02%. C) T2= Q-Bs al 0.04%. C) T3= Q-Bs 0.08%. D) T3= Q-Bs 0.08%. E) T4= Q-Bs 0.16%.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* de quitosano “Q-Bs” en contra de *Botrytis cinerea*.

Tratamientos	% de inhibición Medias	CV	Límite de confianza mín.	Límite de confianza máx.
T4= Q-Bs 0.16 %	51.13 A	16.18	45.39	60.61
T3= Q-Bs 0.08 %	35.33 AB	2.07	34.87	36.17
T2= Q-Bs 0.04 %	34.90 B	10.16	31.10	38.12
T1= Q-Bs 0.02 %	24.30 B	39.88	16.08	34.99
Testigo	0.00 C	0.00	0.00	0.00

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

5.5 Evaluación de la esporulación

En la tabla número 3 se puede apreciar que los cuatro tratamientos de quitosano redujeron la esporulación del hongo en comparación con el testigo, inhibiéndola por completo (100%) a las concentraciones de 0.08 y 0.16 % (Tab. 3- T3 y T4). Estos resultados concuerdan con los reportados por Hernández-Lauzardo *et al.*, (2007), quienes reportan la reducción de la esporulación de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor sp.*, a partir de una concentración de quitosano de 1 mg mL⁻¹.

Tabla 3. Inhibición de la esporulación de *Botrytis cinerea* mediante tratamientos de quitosano.

Tratamientos	Esporulación (No esporas por ml ⁻¹)	%inhibición Medias	Límite de confianza mín.	Límite de confianza máx.
T4= Q-Bs 0.16 %	0.00	100.00A	100	100
T3= Q-Bs 0.08 %	0.00	100.00A	100	100
T2= Q-Bs 0.04 %	5 x 10 ⁴	90.91B	90.91	90.91
T1= Q-Bs 0.02 %	5 x 10 ⁴	90.91B	90.91	90.91
Testigo	5.5 x 10 ⁵	0.00C	0.00	0.00

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

5.6 Prueba de inhibición *in vitro* de *Bacillus subtilis* y su combinación con quitosano “Q-Bs” en contra de *Botrytis cinerea*

En la prueba de inhibición *in vitro* de *B. subtilis* y su combinación con Q-Bs en contra de *B. cinerea*, el mejor tratamiento fue la combinación de Q-Bs al 0.04% más *B. subtilis* (T3) con una inhibición del 74.57 %, presentado diferencia estadística significativa a los demás tratamientos (Tab. 4 y Fig. 9 F). Además, se puede observar que los tratamientos donde se empleó la combinación de Q-Bs más *B. subtilis* presentaron mayor porcentaje de inhibición en contra de *B. cinerea*, esto debido probablemente a que el Q-Bs estimuló el desarrollo de la bacteria, en comparación con el tratamiento de *B. subtilis* sin quitosano (T1) (Tab. 3) que fue el que obtuvo el menor porcentaje de inhibición (48.48 %) de los tratamientos.

En la figura 9 se puede observar lo mencionado anteriormente, donde se aprecia que en los tratamientos con Q-Bs hubo un mayor desarrollo de *Bacillus*, siendo esto más notorio a las concentraciones de 0.04, 0.02 y 0.08 % de Q-Bs respectivamente (Fig. 9 F, E y D).

La compatibilidad del quitosano con microorganismos benéficos es algo que ya se ha comprobado con anterioridad por algunos autores, sin embargo, está más documentada hacia la parte de los hongos benéficos, tal es el caso de *Trichoderma* (Rautela *et al.*, 2019) y *Pochonia chlamydosporia* (Escudero *et al.*, 2017).

En el caso de la combinación de quitosano con bacterias existen algunos reportes que mencionan su compatibilidad, tal es el caso de la compatibilidad de quitosano con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Bacillus pumilos*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. subtilis*) en plantas de tomate, en las cuales se observó un mayor desarrollo al utilizar la combinación de quitosano con las bacterias, en comparación al aplicar estas de manera individual (Murphy *et al.*, 2003).

De manera similar, Agbodjato *et al.*, (2016), reportan un mayor desarrollo de plantas *in vitro* e *in vivo* de maíz al combinar quitosano con algunas rizobacterias (*Azospirillum lipoferum*, *P. fluorescens* y *P. putida*) en comparación al aplicarlos de manera individual. Mientras que, Costales *et al.*, (2017), reportan que la reproducción de *Bradyrhizobium* se vio favorecida por la aplicación de quitosano, ya que la bacteria presentó una mayor producción de unidades formadoras de colonias.

Kraśniewska y Gniwosz (2012), mencionan que el quitosano a una baja concentración mínima inhibitoria (0.01- 1 %) y con un bajo peso molecular no posee efecto inhibitorio en contra de bacterias.

Estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio ya que las concentraciones más bajas de Q-Bs (0.04, 0.02 y 0.08 %) efectivamente promovieron un mayor desarrollo de *B. subtilis* (Figura 9), mientras que la concentración más alta de Q-Bs (0.16 %) se observó un menor desarrollo de bacteria y un menor efecto inhibitorio ya que su desarrollo aunque se muestran numéricamente mejor que el testigo, estadísticamente se comportan similar a *B. subtilis* sin quitosano, lo cual demuestra que a bajas concentraciones promueve el crecimiento y con ello la inhibición del hongo, mientras que cuando se aumenta el contenido de quitosano se detiene el crecimiento de la bacteria.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición *in vitro* de *Bacillus subtilis* más Q-Bs en contra de *Botrytis cinerea*.

Tratamientos	%inhibición Medias	CV	Límite de confianza mín.	Límite de confianza máx.
T3= Q 0.04%+ <i>B. subtilis</i>	74.57 A	1.61	58.70	60.52
T2= Q 0.02%+ <i>B. subtilis</i>	69.59 AB	7.01	59.88	68.79
T4= Q 0.08%+ <i>B. subtilis</i>	64.03 BC	4.66	70.56	76.69
T5= Q 0.16%+ <i>B. subtilis</i>	59.44 C	4.67	65.89	72.00
T1= <i>B. subtilis</i>	48.48 D	3.51	46.93	50.30
Testigo	0.00 E	0.00	0.00	0.00

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P> 0.05).

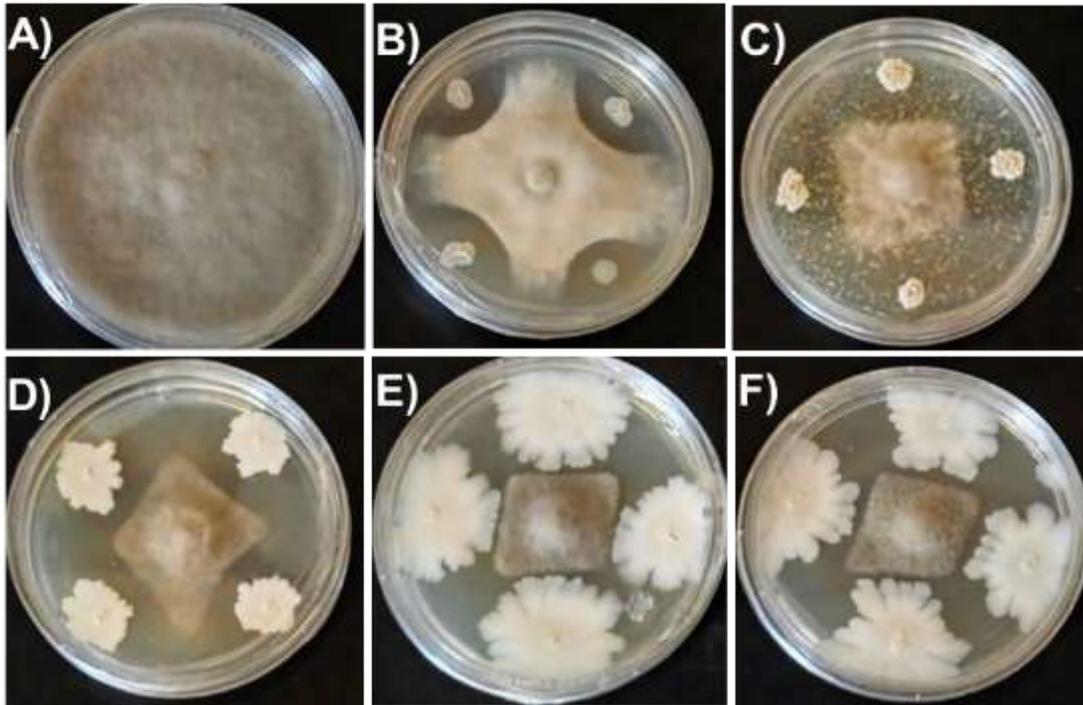


Figura 9. Inhibición *in vitro* de *B. subtilis* en combinación con quitosano en contra de *B. cinerea*. A) Testigo. B) T1- *B. subtilis* sin Q- Bs. C) T-5 *B. subtilis* mas Q- Bs al 0.16 %. D) T-4 *B. subtilis* mas Q-Bs al 0.08 %. E) T-2 *B. subtilis* mas Q-Bs al 0.02 %. F) T-3 *B. subtilis* mas Q-Bs al 0.04 %.

Cabe mencionar que los estudios en relación con la compatibilidad del quitosano con bacterias antagonistas en el control de enfermedades aún son escasos, por lo cual, los resultados obtenidos en esta investigación son de gran importancia hacia futuros estudios en relación a investigar los efectos que pudiera tener el quitosano en *B. subtilis*, si este biopolímero además de favorecer su desarrollo podría favorecer la capacidad de producir compuestos antimicrobianos de la bacteria, lo cual favorecería su efecto en las aplicaciones en campo.

Tal y como se observó en este trabajo fue notorio el crecimiento de *B. subtilis* en las placas de cultivo con quitosano en bajas concentraciones, así como su mayor efecto inhibitorio hacia *B. cinerea*.

6. CONCLUSIONES

Se aisló e identificó morfológicamente *Botrytis cinerea* como agente causal de moho gris de flores y frutos de arándanos. Mediante fermentación bacteriana de cáscara de camarón se obtuvo sólidos de quitina la que fue desacetilada con NaOH para la obtención de quitosano, el cual demostró tener actividad inhibitoria en contra del hongo fitopatógeno, ya que logró inhibir su crecimiento hasta un 51.12 % a una concentración de 0.16 %, además, los cuatro tratamientos inhibieron la esporulación del hongo. De igual forma, se demostró su compatibilidad con *Bacillus subtilis*, ya que la bacteria presentó un mayor desarrollo a las concentraciones de quitosano del 0.04, 0.02 y 0.08 %, las cuales, además, presentaron mayor porcentaje de inhibición (74.57, 69.59 y 64.03 %) respectivamente, en comparación con el tratamiento de *B. subtilis* (48.48 %) por sí solo. Por lo anterior, consideramos al quitosano como una bioalternativa compatible con *B. subtilis* para el control de *B. cinerea*.

7. LITERATURA CITADA

- Agbodjato, N., A.; Noumavo, P., A.; Adjanohoun, A.; Agbessi, L.; Baba-Moussa, L. (2016). Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and chitosan on *in vitro* seeds germination, greenhouse growth, and nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.). *Biotechnology research international*. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7830182>
- AGRIOS, G. (1996). *Fitopatología*. 2ª ed. México. Limusa S.A. de C.V. 638 p. <http://biblioteca.utsemmorelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA%20-%20George%20N-Agrios.pdf>
- Agrios, G. N. (2004). *Fitopatología*. Limusa. México. 638 p. <http://biblioteca.utsemmorelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA%20-%20George%20N-Agrios.pdf>
- Arbia, W.; Arbia, L.; Adour, L.; Amrane, A. (2013). Chitin extraction from crustacean shells using biological methods. *Food technol. biotechnol*, 51 (1) 12-25. <https://hrcak.srce.hr/file/146860>
- Arbito, P. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *trichoderma* spp. frente a *fusarium* spp. Universidad politécnica Salesiana. Cuenca <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14419/1/UPS-CT007088.pdf>
- Argüelles, W.; Peniche, C. (1993). Preparation and characterization of a mercaptan derivative of chitosan for the removal of mercury from brines.

- Barnett, H., L.; Hunter, B., B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 4rd ed.
https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf
- Bautista, S.; Velázquez, M., G.; Bosquez, E.; Hernández, A., N.; Sánchez, D. (2005). Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 7(1),1-6.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81370102>
- Bautista-Baños, S.; Romanazzi, G.; Jiménez-Aparicio, A. (2016). Chitosan in the preservation of agricultural commodities. USA: Academic Press/Elsevier.
<http://store.elsevier.com/Chitosan-in-the-Preservation-of-Agricultural-Commodities/isbn-9780128027356/>
- Beaney, P.; Lizardi-Mendoza, J.; Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 80 (2): 145-150.
<http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.of%20chemical%20technology%20and%20Obiotechnology/2005/no.2/2005vol.80no.2p.145-150.pdf>
- Bhaskara, M., V.; Arul, P.; Angers, P.; Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. Journal of Agriculture and Food Chemistry 47: 208–1216.
http://agrobonsens.com/wp-content/uploads/2017/03/reddy_et_al_1999_chitosan_wheat_1_.pdf
- Bocanegra, S. (2021). Revisión documental sobre bioformulaciones a base de *Bacillus* sp. para el control biológico de *Botrytis Cinerea*.
<https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/2840/Sara>

%20Natalia%20Bocanegra%20Dur%c3%a1n%20Presentaciones%20Sara%20Bocanegra%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Bustos, R., O.; Romo, C., R.; Healy, M., G. (1994). Stabilisation of trypsin-like enzymes from antarctic krill: Effect of polyols, polysaccharides and proteins. J. Chem. Tech. Biotechnol. 65: 193-199. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199602\)65:2%3C193::AID-JCTB398%3E3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199602)65:2%3C193::AID-JCTB398%3E3.0.CO;2-T)

Calvo Garrido, C. (2013). 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. Doctoral dissertation, Universitat de Lleida. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/134607/Tccg1de1.pdf;jsessionid=D1EAEB8AD752427E97F1D8817CDD6657?sequence=2>

Calvo, P., Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecología Aplicada. 9:31-39. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>

CANNA. (2022). *Botrytis cinerea*: un exterminador de cosechas altamente infeccioso – detallado. https://www.canna.es/botrytis_cinerea_detallado

Castaño, Z., J. (2002). Principios básicos de fitoepidemiología. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. <https://books.google.com.pe/books?id=a6a5zmyGdDUC&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false>

Castillo, R., F.; Hernández, C., F., D.; Gallegos, M., G.; Flores, O., A.; Rodríguez, H., R. y Aguilar, C., N. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6(3): 549-562.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000300009&script=sci_abstract

- Cisneros, P. I.; Curbelo, C.; Vinicio, C. M; y Molina D. I. (2019). Método alternativo para la desacetilación de la quitina. *Universidad Ciencia y Tecnología*, 2: 162-169.
<https://www.uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/80>
- Cisternas, E.; France, A. (2009). Manual de campo de plagas, enfermedades y desordenes fisiológicos del arándano en Chile.
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/7276/NR36471.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Colina, M.; Ayala, A.; Rincón, D.; Molina, J.; Medina, J.; Ynciarde, R.; Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 15(1), 21-43. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2014-colina.pdf>
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Costales, D.; Nápoles, M., C.; Falcón, A., B.; González, A., G.; Ferreira, A.; Rossi, A. (2017). Influencia de quitosanas en la nodulación y el crecimiento vegetativo de soya (*Glycine max* L. Merrill). *Cultivos Tropicales*, 38(1), 138-146.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362017000100018&lng=es&lng=es.
- Dutta, P., K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G., K.; Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>

- Escudero, N.; Lopez, M., F.; Ghahremani, Z.; Zavala, G., E., A.; Alaguero, C., A.; Ros, I., C.; Lopez, L., L., V. (2017). Chitosan increases tomato root colonization by *Pochonia chlamydosporia* and their combination reduces root-knot nematode damage. *Frontiers in plant science*, 8, 1415. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01415>
- Esmel, C., E.; Duval, J., R.; Steven, A., A. (2004). The influence of calcium thiosulfate on yield and postharvest quality of 'Sweet Charlie' strawberry. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 117, 48-51. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.4.853D>
- Espinosa-Cavazos, K., G.; A. Sáenz-Galindo, A.; Castañeda-Facio, A., O. (2020). Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, México <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/377418/470720>
- Estela, W.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Quillama, E.; Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus Plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología* 14 (2): 271-275. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300014
- Estrada, L.; Del Carmen, Y. (2012). Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/427/1/T-UCE-0017-5.pdf>
- Fernández-Ortuño, D.; Pérez-García, A.; Torés, J., A.; de Vicente, A. (2017). Resistencia a múltiples fungicidas en *Botrytis cinerea* en fresa. *Agrícola Vergel*. https://www.researchgate.net/publication/330666767_Resistencia_a_multiples_fungicidas_en_Botrytis_cinerea_en_fresa
- Ferrada, E., E.; Latorre, B., A.; Zoffoli, J., P.; Castillo, A. (2016). Identification and characterization of *Botrytis* blossom blight of Japanese plums caused by

Botrytis cinerea and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106(2), 155-165. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0143-R>

Ferrada, E., E.; Lolas, M.; Pacheco, C.; Díaz, G., A. (2017). Occurrence of severe outbreak of calyx-end rot associated with *Botrytis cinerea* in *Malus domestica* cv. Cripps pink during harvest in the Maule Region, Chile. *Plant Disease*, 101(12), 2149-2149. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0636-PDN>

Figuroa, D.; Guerrero, J.; Bensch, E. (2010). Efecto de momento de cosecha y permanencia en huerto sobre la incidencia de hongos de poscosecha en arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. berkeley, brigitta y elliott durante la temporada 2005-2006. *Idesia* (Arica), 28(2), 9-19. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292010000200002

FIRA. (2016). Panorama agroalimentario. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial, México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200633/Panorama_Agroalimentario_Berries_2016.pdf

France, A. (2013). Manejo de enfermedades en frutilla. Manual de Frutilla. Boletín INIA N° 62: 62-71. <https://studylib.es/doc/7905802/manual-de-frutilla---inia-biblioteca-digital>

Gamal, R., F.; El-Tayeb, T., S.; Raffat, E., I.; Ibrahim, H., M., M.; Bashandy, A., S. (2016). Optimization of low molecular weight chitosan production by a local isolated *Bacillus subtilis* strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 598-608. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.008>

Ganan, M.; A., V.; Carrascosa, A., V.; Martínez-Rodríguez, A., J. (2009). Antimicrobial activity of chitosan against *Cam-pylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. *Journal of Food Protection* 72: 1735-1738. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.8.1735>

- García, Z., T.; Roca, O.; Johana, M. (2008). Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en unguento con efecto cicatrizante. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial*, 11(2), 24-32. <https://www.redalyc.org/pdf/816/81619829004.pdf>
- Gepp, V.; Vero, S.; Cassanello, M., E.; Romero, G.; Silvera, E.; González, P.; Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia* (Uruguay) http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482012000100012
- Ghorbani, R; Wilcockson, S; Koocheki, A.; Leifert, C. (2008). Soil management for sustainable crop disease control. *Journal Environmental Chemistry Letters*, vol. 6:149-162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10311-008-0147-0>
- Gómez, R., H. (2014). Técnicas de aislamiento y preservación de hongos entomopatógenos. https://repositorio.senasa.gob.pe/bitstream/SENASA/264/1/2014_Gomez_Ficha-tecnica-16-Tecnicas-aislamiento-conservacion-hongos.pdf
- Gordillo Chamba, T., M. (2021). Monitoreo de la sensibilidad, resistencia y diversidad genética de *Botrytis cinerea* a fungicidas SDHI en rosas de exportación (Bachelor's thesis, Quito: UCE). <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/24190/1/UCE-FAG-GORDILLO%20TANIA.pdf>
- Gunnar, T. (2008). Extraction and functional properties of ultrasonicated chitin and chitosan from crustacean by products. Doctoral Dissertation <https://www.proquest.com/docview/304565526>
- Gutiérrez-Martínez, P.; Chacón-López, M.; Xoca-Orozco, L.; Ramos-Guerrero, A.; Velázquez-Estrada, R.; Aguilera-Aguirre, S. (2016). Chitosan and

changes in gene expression during fruit-pathogen interaction at postharvest stage.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027356000112?via%3Dihub>

Henics, T.; Wheatley, D. (1999). Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell wall. A view of new perspectives and features. *Biology of the Cell*, 91(7), 485-98.
[https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(00\)88205-2](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(00)88205-2)

Hernández, C., H.; Águila, A., E.; Flores, A., O.; Viveros, N., E., L.; Ramos, C., E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-35212009000300012

Hernández-Lauzardo, A., N.; Hernández-Martínez, M.; Velázquez-del Valle, M., G.; Guerra-Sánchez, M., G.; Melo-Giorgana, G., E. (2007). Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. *Revista mexicana de fitopatología*, 25 (2): 109-113.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000200003&lng=es&tlng=es.

Hua, L.; Yong, C.; Zhanquan, Z.; Boqiang, L.; Guozheng, Q.; Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119.
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>

INIA. (2017) Manual de manejo agronómico del arándano. Boletín INIA no. 6 55p. Instituto de Desarrollo Agropecuario-Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago, Chile.
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6673/NR40907.pdf?sequence=41&isAllowed=y>

- ITIS. (2022). Integrated Taxonomic Information System
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=181693#null
- Kim, M., J.; Han, J., K.; Park, J., S.; Lee, J., S.; Lee, S., H.; Cho, J.; Kim, K., S. (2010). Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:872-879
<https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1502.02003>
- Kloet, S., P., V. (1980). The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*. *Canadian Journal of Botany*, 58(10), 1187–1201.
<https://doi.org/10.1139/b80-148>
- Koike, S.; Bolda, M. (2016). Guía de producción: el Moho gris, o pudrición de fresa Introducción y significado. California: US Cooperative Extension
<https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>
- Kong, M.; Chen, X., G.; Xing, K.; Park, H., J. (2010). Anti-microbial properties of chitosan and mode of action. *International Journal of Food Microbiology* 144: 51-63 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kraśniewska, K.; Gniewosz, M. (2012). Substances with antibacterial activity in edible films. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4): 199–206.
<http://journal.pan.olsztyn.pl/pdf-98340-31096?filename=Substances%20with.pdf>
- Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances de Química* 1: 15-21
<https://www.redalyc.org/pdf/933/93310204.pdf>
- Latorre, B. (2015). Pudrición gris (*Botrytis cinerea*), un factor limitante de la producción de uva de mesa en Chile. *Fitopatología* 42(1):09-20.

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202015000300001

- Layton, C.; Maldonado, E.; Monroy, L.; Corrales, L., C.; Sánchez, L., C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>
- Li, Y.; Gu, Y.; Li, J.; Xu, M.; Wei, Q.; Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>
- Li, Y.; Yuan, S.; Hu, X.; Zhang, C. (2019). Cambio de sensibilidad en *Botrytis cinérea* a fungicidas de bencimidazol en invernadero que atribuyen a la disminución creciente de la subpoblación y su monitorización visual *in situ* mediante amplificación isotérmica. Beijing: Nature publishing Group <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6690993/>
- Lisboa, M., M., A.; Moreno, S., Y. (2003). Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid vinífera. Doctoral dissertation. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía). <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/919/3/MLisboaM.pdf>
- Liu, H.; Du, Y.; Wang, L.; Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 95: 147-55. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>
- Liu, L., L. (2004). Rapid N-phthaloylation of chitosan by microwave irradiation. *Carbohydr. Polym.* pp. 97–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.009>

- López, C., E. (2007). Fitopatología molecular. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
http://www.rnomics.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Fitopatologia_molecular/fitopatologia_molecular.pdf
- Marmol, Z.; Páez, G.; Rincon, M.; Araujo, K.; Aiello, C.; Cchandler, C.; Gutierrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Universidad Rafael Urdaneta. Zulia, Venezuela.
https://www.researchgate.net/profile/Cateryna-Aiello-Mazzarri/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones/links/02bfe51195a2862f9e000000/Quitina-y-Quitosano-polimeros-amigables-Una-revision-de-sus-aplicaciones.pdf
- Medina, J., G. (2014). Control biológico de *Botrytis cinerea* pers. en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizando aislados nativos de *Trichoderma* spp.
<http://repositorio.udec.cl/xmlui/bitstream/handle/11594/2253/Control%20biol%20de%20Botrytis%20cinerea%20pers.%20en%20ar%20c%20a%20ndano%20%28Vaccinium%20corymbosum%20L.%29%20utilizando%20aislados%20nativos%20de%20Trichoderma%20spp.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Montiel-Frausto, L., B.; Vásquez-López, A. (2021). *Botrytis cinerea*, agente causal de muerte de retoños de *Vaccinium corymbosum* L. cv. biloxi en Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 44(2), 261-261.
- Murphy, J., F.; Reddy, M., S.; Ryu, C., M.; Kloepper, J., W.; Li, R. (2003). Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. Phytopathology, 93(10), 1301-1307.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1301>

- Nakajima, M.; Akutsu, K. (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. Journal of General Plant Pathology, 80(1), 15-23. https://www.researchgate.net/publication/258161332_Virulence_factors_of_Botrytis_cinerea
- Nemtsev, S., V.; Gamzazade, A., I.; Rogozhin, S., V. (2002). Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. Applied biochemistry and microbiology 38, 521–526 <https://doi.org/10.1023/A:1020766325395>
- Nurshuhada, S.; Yussof, M. (2008). El efecto de la onda ultrasónica en el grado de desacetilación de la quitina en la producción de quitosano. https://books.google.com.ec/books/about/The_Effect_of_Ultrasonic_Wave_on_the_Deg.html?id=EGmtAQAACAA-J&redir_esc=y.
- Pacheco, A. (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Food and Nutrition. Université Claude Bernard - Lyon I; Université autonome métropolitaine (Universidad Autónoma Metropolitana) (Iztapalapa) <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00807945/document>
- Palma-Guerrero, J.; Lopez-Jimenez, J., A.; Pérez-Berná, A., J.; Huang, I., C.; Jansson, H., B.; Salinas, J.; Villalaín, J.; Read, N., D.; Lopez-Llorca, L., V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. Molecular microbiology, 75 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Papineau, A., M.; Hoover, D., G.; Knorr, D.; Farkas, D., J. (1991). Antimicrobial effect of watersoluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnology 5: 45–57. <https://doi.org/10.1080/08905439109549790>
- Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista facultad nacional de agronomía Medellín 62 (1): 4967-4982. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>

- Pasotti, V., S.; Avila, S., A., J.; Martinelli, M. (2020). Obtención de quitina y quitosán por método sustentable a partir de cáscaras de langostino. *Naturalia Patagónica*, 16. 111-131. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/147029/CONICET_Digital_Nro.67e6f828-ba4b-4224-803c-a695499e386b_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Pearce, R., B.; Ride, J., P. (1982). Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 20: 119–123. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90030-3](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90030-3)
- Peña, A.; Sánchez, N., S.; Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, 2013, 1-15. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/527549/>
- Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. 4:12–18. <https://doi.org/10.1021/bm025602k>
- Pillai, C.; Willi, P.; Chandra, P.; Sharma, P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34 641–678 https://www.researchgate.net/profile/Cks-Pillai/publication/223454608_Chitin_and_Chitosan_Polymers_Chemistry_Solubility_and_Fiber_Formation/links/5b0cf861aca2725783ec61e4/Chitin-and-Chitosan-Polymers-Chemistry-Solubility-and-Fiber-Formation.pdf
- Plascencia, M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo, M.; Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.*, 3:582–586 <https://doi.org/10.1002/mabi.200350024>

- Poveda, J.; Hermosa, R.; Monte, E.; Nicolas, C. (2019). *Trichoderma harzianum* favorece el acceso de hongos micorrícicos arbusculares a raíces de Brassicaceae no hospedadoras y aumenta la productividad de las plantas. Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Salamanca, Salamanca, España. Salamanca: Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-019-48269-z>
- Raafat, D.; Von Bargen, K.; Haas, A.; Sahl, H., G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3764-3773. <https://doi.org/10.1128%2FAEM.00453-08>
- Raaijmakers, J., M.; Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual reviews of phytopathology*. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Rabea, E, I.; Badawy, M.; Stevens, C.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of Action, *Biomacromolecules*. 4(6):1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Ramírez, M., Á.; Rodríguez, A., T.; Alfonso, L., P., C. (2010). Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada* v.27 n. 4; 270-276. https://www.researchgate.net/publication/275024120_Chitin_and_its_derivatives_as_biopolymers_with_potential_agricultural_applications
- Ramírez, Q., D., F. (2019). Detección temprana de *botrytis* sp. en dos variedades (pomodoro y gioele) de clavel (*dianthus caryophyllus* L.). utilizando la cámara húmeda con dos rangos de humedad relativa en la compañía sunshine bouquets sas. <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/2639/DETECCION%20TEMPRANA%20DE%20Botrytis%20sp.%20EN%20DOS%20VARIETADES%20%28POMODORO%20Y%20GIOELE%29>

%20DE%20CLAVEL%20%28Dianthus%20cary.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Ramírez, J.; Rosas, P.; Velásquez, M.; Ulloa, J.; Arce, F. (2011). Bacterias lácticas importancia en los alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente 2: 7. <https://prezi.com/ag5ugynzobjkq/bacterias-lacticas-importancia-en-los-alimentos-y-sus-efect/>
- Rautela, A.; Dwivedi, M.; Tewari, A., K.; Kumar, J. (2019). Enzymatic activity and secondary metabolite profile of *Trichoderma asperellum* in presence of chitosan. Indian Phytopathology, 72(3): 437- 444. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00158-1>
- Ren, J.; Liu, J.; Li, R.; Dong, F.; Guo, Z. (2012). Antifungal properties of chitosan salts in laboratory media. Journal of Applied Polymer Science, 124(3), 2501-2507. <https://doi.org/10.1002/app.33612>
- Retamales, J.; Hancock, J. (2018). Arándanos. Zaragoza, España: ACRIBIA S.A <https://latam.casadellibro.com/libro-arandanos/9788420012001/11529090>
- Reuveni, R.; Raviv, M. (1992). The effect of spectrally modified polyethylene films on the development of *Botrytis cinerea* in greenhouse grown tomato plants. Biol. Agric. Horticulture, 9, 77–86 <https://doi.org/10.1080/01448765.1992.9754618>
- Rivera, S., A.; Zoffoli, J., P.; Latorre, B., A. (2013). Determination of optimal sulfur dioxide time and concentration product for postharvest control of gray mold of blueberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 83, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.007>
- Rodríguez, D. (2020). Identificación y manejo de las principales enfermedades en arándano en México. Hortifrut, México.

<https://docplayer.es/211534527-Identificacion-y-manejo-de-las-principales-plagas-y-enfermedades-emergentes-para-el-arandano-en-mexico.html>

Roller, S.; Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47: 67–77. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00006-9)

Rosas, O., F. (2016). Perspectivas. Temporada mundial de los berrys, 2016-2017. RCounseling Group. 4° Seminario de Berrys. Temuco, Chile. Disponible en: http://www.fedefruta.cl/2016/wp-content/uploads/2016/12/1430-1500_Rosas-1.pdf.

Rosmawati, A.; Rumhayati, B.; Srihardyastutie, A. (2019). Biorecovery of chitin from shrimp shell waste (*Litopenaeus vanamme*) using fermentation and co-fermentation of *L. plantarum* and *B. thuringiensis* <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/546/2/022019/pdf>

SADER. (2018). Cultivo del arándano en México, reto superado. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/cultivo-del-arandano-en-mexico-reto-superado>

SADER; SIAP. (2021). Datos abiertos de producción agrícola, panorama agroalimentario arándano. http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>

Sagheer, F., A. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate polymers*. Vol.77 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.032>

Sandoval, F., M., G.; Jiménez, M., R.; Santoyo, G.; Alva, M., P., N.; López, M., J., E.; Loeza, L., P., D. (2018). Compósitos de quitosano-ácidos grasos

reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha. Nova scientia 21(10): 207–227. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-07052018000200207&script=sci_abstract&tlng=en

Sedaghat, F.; Yousefzadi, M.; Toiserkani, H.; Najafipour, S. (2015). Chitin from *Penaeus merguensis* via microbial fermentation processing and antioxidant activity. International journal of biological macromolecules, 82, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.070>

Shahidi, F.; Arachchi, J., K., V.; Jeon, Y. (1999). Food applications of chitin and chitosans, Trends in food science & technology.10: 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00017-5)

Shao, W.; Zhao, Y.; Ma, Z. (2021). Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. Phytopathology, 111(3), 455-463. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-20-0313-ia>

SIAP. (2021). Arándano un fruto con maravillosas propiedades. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/arandano>

SYNGENTA. (2018). *Botrytis*, biología del patógeno: la base de un control químico eficiente. <https://www.syngentaornamentales.co/news/articulo/botrytis-biologia-del-patogeno-la-base-de-un-control-quimico-eficiente>

Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N., A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Crit. Rev. Food Sci., 43: 145–171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>

Tacca, B., L.; Yataco, R., J., Y.; Farfán, A., A.; Calderón, L., M.; Cantoral, J., C., A. (2022). Antibiosis y micoparasitismo de hongos endófitos sobre el

agente causal del moho gris del arándano (*botrytis cinerea*). Bioagro, 34(3), 209-222. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8554065>

Tejera-Hernández, B.; Rojas-Badía, M., M.; Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42:131-138. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

Terrones-Salgado, J.; Nieto-Angel, D.; Nava-Díaz, C.; Téliz-Ortiz, D.; García-Velasco, R.; Vallejo-Pérez, M., R.; Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. Revista mexicana de fitopatología, 37(3), 365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>

Turechek, W.; Peres, N.; Werner, N. (2006). Pre- and postinfection activity of pyraclostrobin for control of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant. Dis. 90(7), 862-868. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0862>

Undurraga, P.; Vargas, S. (2013). Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7627>

Urribarri, L.; Vielma, A.; Páez, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z.; Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Revista científica FCV-LUZ XIV (4): 297-302. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914403.pdf>

USDA. (2021). Fruit and tree nuts data: Blueberries <https://data.ers.usda.gov/reports.aspx?programArea=fruit&top=5&HardCopy=True&RowsPerPage=25&groupName=Noncitrus&commodityName=Blueberries&ID=17851>

- Vásquez, S.; Suarez, H.; Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición* 36 (1): 64-71. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182009000100007
- Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, Ch., V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* 164: 268-283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Vieira, E., R.; Antunes, A., A.; Alviano, C., S.; Alviano, D., S.; Bergter, E., B.; Luna, M., C.; da Silva, A., R., F.; de Campos, T., G., M. (2020). *Rhizopus arrhizus* ucp1295 como fonte econômica para produção de biopolímeros funcionais quitina e quitosana utilizando substratos renováveis. *Brazilian Journal of Development*, 6(10): 76444- 76456. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-170>
- Wang, X.; Wang, L.; Wang, J.; Jin, P.; Liu, H.; Zheng, Y. (2014). *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. 9(11): e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- Williamson, B.; Tudzynski, B.; Tudzynski, P.; van kan, J., A., L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wisniewsky, M.; Wilson, Ch.; Droby, S.; Chalutz, E.; El Ghaouth, A.; Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In *biological control a global perspective*. Eds Vincent, C., Goettel, M.S., & Lazarovits, International. pp 262-273. <https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/6167/biocontrol%20chap-29.pdf>

- Yang, J., K.; SHih, I., L.; Tzeng, Y., M.; Wang, S., L. (2000). Production and purification of protease from *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 406-413. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00164-7)
- Yousseff, E. (2019). Efecto sinérgico de una nueva formulación basada en nanocompuestos de quitosano / silice contra el moho gris de las uvas de mesa y su posible modo de acción. *International journal of biological macromolecules*, 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.249>
- Zhang, H.; Li, R.; Liu, W. (2011). Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 917-934. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083681/>
- Zulay, M.; Páez, G.; Rincón, M.; Araujo, K.; Aiello, C.; Chandler, C.; Gutierrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Universidad Rafael Urdaneta. Zulia, Venezuela. https://www.researchgate.net/profile/Cateryna-Aiello-Mazzarri/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones/links/02bfe51195a2862f9e000000/Quitina-y-Quitosano-polimeros-amigables-Una-revision-de-sus-aplicaciones.pdf

Anexos

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%in	15	0.92	0.89	20.34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

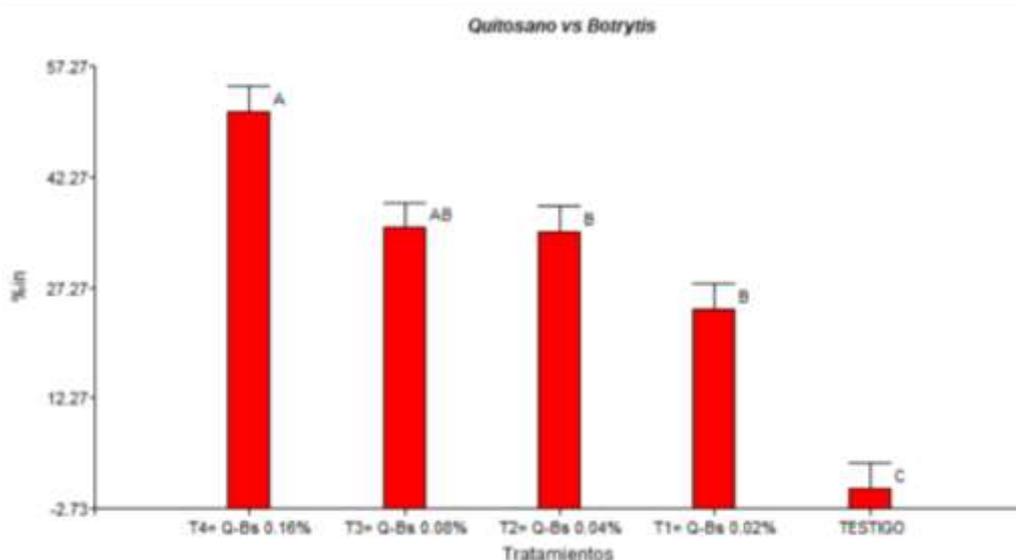
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4282.08	4	1070.52	30.50	<0.0001
Tratamientos	4282.08	4	1070.52	30.50	<0.0001
Error	350.98	10	35.10		
Total	4633.06	14			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=15.91966

Error: 35.0979 gl: 10

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4= Q-Bs 0.16%	51.13	3	3.42	A
T3= Q-Bs 0.08%	35.33	3	3.42	A B
T2= Q-Bs 0.04%	34.90	3	3.42	B
T1= Q-Bs 0.02%	24.30	3	3.42	B
TESTIGO	0.00	3	3.42	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Medidas resumen

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
T1= Q-Bs 0.02%	%in	3	24.30	9.69	5.60	39.88	16.08	34.99
T2= Q-Bs 0.04%	%in	3	34.90	3.54	2.05	10.16	31.10	38.12
T3= Q-Bs 0.08%	%in	3	35.33	0.73	0.42	2.07	34.87	36.17
T4= Q-Bs 0.16%	%in	3	51.13	8.27	4.78	16.18	45.39	60.61
TESTIGO	%in	3	0.00	0.00	0.00	sd	0.00	0.00

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%in	15	1.00	1.00	4.3E-05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

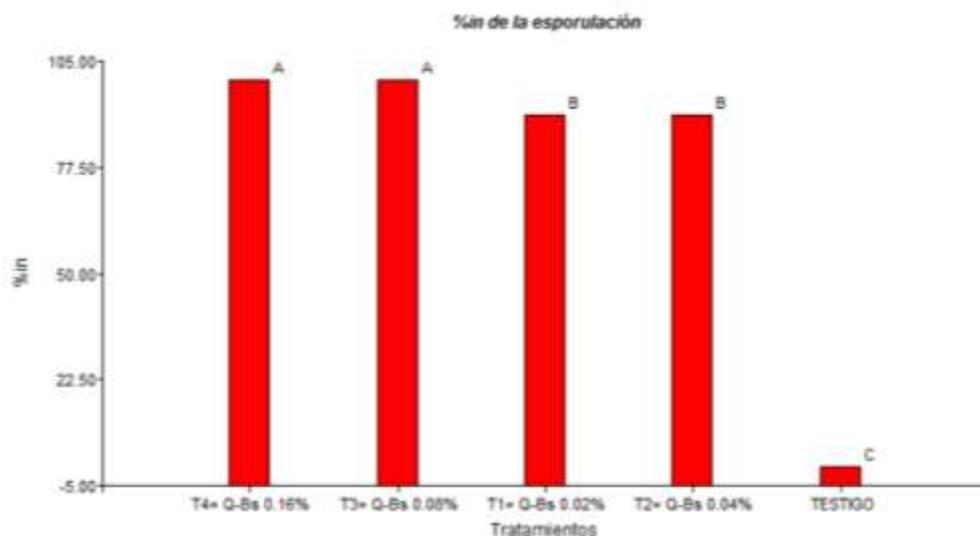
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22115.69	4	5528.92	5020432213808.21	<0.0001
Tratamientos	22115.69	4	5528.92	5020432213808.21	<0.0001
Error	1.1E-08	10	1.1E-09		
Total	22115.69	14			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00009

Error: 0.0000 gl: 10

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4= Q-Bs 0.16%	100.00	3	1.9E-05	A
T3= Q-Bs 0.08%	100.00	3	1.9E-05	A
T1= Q-Bs 0.02%	90.91	3	1.9E-05	B
T2= Q-Bs 0.04%	90.91	3	1.9E-05	B
TESTIGO	0.00	3	1.9E-05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Medidas resumen

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
T1= Q-Bs 0.02%	%in	3	90.91	0.00	0.00	0.00	90.91	90.91
T2= Q-Bs 0.04%	%in	3	90.91	0.00	0.00	0.00	90.91	90.91
T3= Q-Bs 0.08%	%in	3	100.00	5.2E-05	3.0E-05	5.2E-05	100.00	100.00
T4= Q-Bs 0.16%	%in	3	100.00	5.2E-05	3.0E-05	5.2E-05	100.00	100.00
TESTIGO	%in	3	0.00	0.00	0.00	sd	0.00	0.00

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%in	18	0.99	0.99	5.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

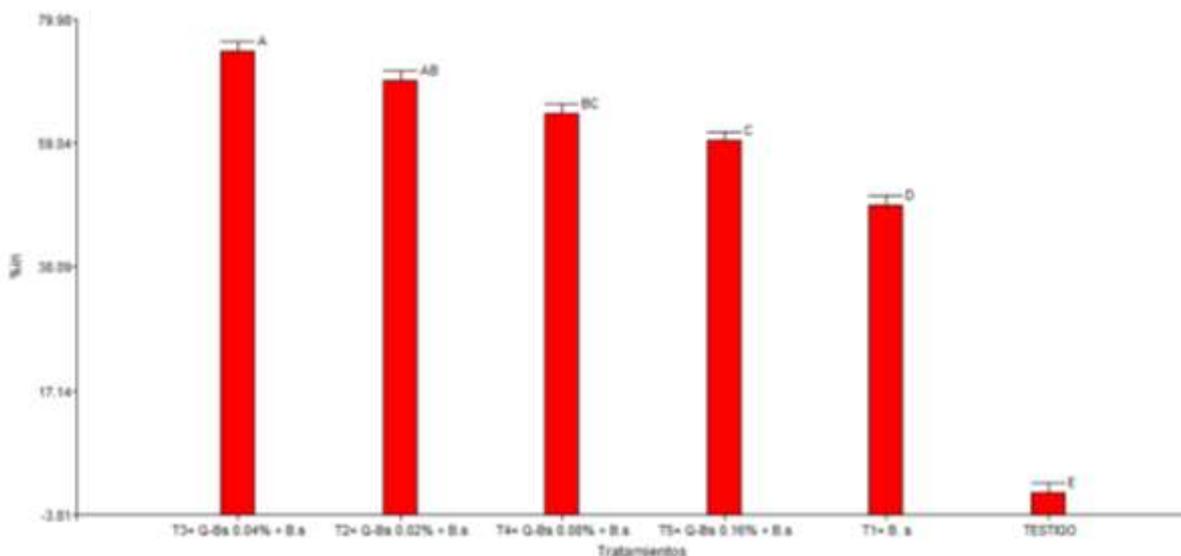
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11196.61	5	2239.32	288.59	<0.0001
Tratamientos	11196.61	5	2239.32	288.59	<0.0001
Error	93.11	12	7.76		
Total	11289.73	17			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7.63965

Error: 7.7596 gl: 12

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T3= Q-Bs 0.04% + B.s	74.57	3	1.61	A
T2= Q-Bs 0.02% + B.s	69.59	3	1.61	A B
T4= Q-Bs 0.08% + B.s	64.03	3	1.61	B C
T5= Q-Bs 0.16% + B.s	59.44	3	1.61	C
T1= B. s	48.48	3	1.61	D
TESTIGO	0.00	3	1.61	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)



Medidas resumen

Tratamientos	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
T1= B. s	%in	3	48.48	1.70	0.98	3.51	46.93	50.30
T2= Q-Bs 0.02% + B.s	%in	3	69.59	3.25	1.88	4.67	65.89	72.00
T3= Q-Bs 0.04% + B.s	%in	3	74.57	3.47	2.00	4.66	70.56	76.69
T4= Q-Bs 0.08% + B.s	%in	3	64.03	4.49	2.59	7.01	59.88	68.79
T5= Q-Bs 0.16% + B.s	%in	3	59.44	0.96	0.55	1.61	58.70	60.52
TESTIGO	%in	3	0.00	0.00	0.00	sd	0.00	0.00